

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



**EFFECTOS E IMPLICACIONES DEL USO DE BACTERIÓFAGOS,
BACTERINAS Y MONENSINA SÓDICA EN LA SALUD DE BOVINOS
JÓVENES**

Tesis

Que presenta LEVI NORBERTO ESPINOSA GARCÍA
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Diciembre, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



**EFFECTOS E IMPLICACIONES DEL USO DE BACTERIÓFAGOS,
BACTERINAS Y MONENSINA SÓDICA EN LA SALUD DE BOVINOS
JÓVENES**

Tesis

Que presenta LEVI NORBERTO ESPINOSA GARCÍA

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

1500

Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Director UAAAN

Dr. Javier Morán Martínez
Director externo (UAdeC)

Torreón, Coahuila

Diciembre, 2022

**EFFECTOS E IMPLICACIONES DEL USO DE BACTERIÓFAGOS,
BACTERINAS Y MONENSINA SÓDICA EN LA SALUD DE BOVINOS
JÓVENES**

Tesis

Elaborada por LEVI NORBERTO ESPINOSA GARCÍA como requisito parcial
para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Producción Agropecuaria
con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría

1500

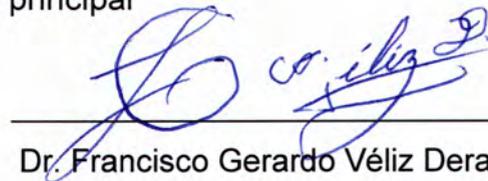
Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno

Asesor principal



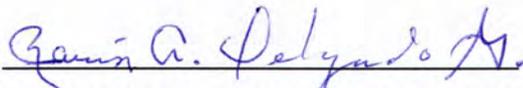
Dr. Javier Morán Martínez

Asesor



Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras

Asesor



Dr. Ramón Alfredo Delgado González

Asesor

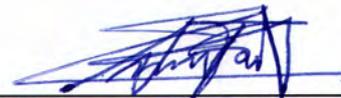


Dra. Leticia Romana Gaytán Alemán

Asesor

1500

Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Antonio Flores Naveda
Subdirector de Postgrado

Torreón, Coahuila

Diciembre, 2022

Agradecimientos

A la **vida**; he visto muchos compañeros irse tempranamente y yo sigo aquí, haciendo mis sueños realidad. Le agradezco haciendo lo que más me gusta.

A mis **asesores**: Dra. Dalia, Dr. Ramón, Dr. Francisco, Dr. Javier y Dra. Lety. Me atrevo a llamarlos por su nombre porque, más que asesores, son amigos que nunca me dejaron solo, me han enseñado tanto que no podría pagarles; gracias.

A las **personas** que estuvieron para brindarme su apoyo, una opinión, un consejo, una motivación, cuando pude haber desistido, estuvieron para motivarme; les agradezco de todo corazón.

Al **Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria**, por confiar en mi capacidad para responder a las exigencias que conlleva la adquisición de este grado académico.

Al **CONACyT**, por el apoyo brindado durante mi formación en el posgrado.

Dedicatoria

A mi **esposa**, porque siempre estuvo ahí, en las buenas y en las malas; no imagino terminar este proyecto sin su apoyo. Perdón por el tiempo que no te dediqué por estar en este sueño que ahora se hace realidad.

A mis **padres y hermana**, porque han confiado en mis decisiones, y cada paso logrado los llena de orgullo.

A los **animales**, a ellos les debo este camino emprendido, su bienestar es lo que me motiva a seguir adelante.

Carta de aceptación de artículo



<http://revistabiociencias.uan.edu.mx>

ISSN 2007-3380

<https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1363>



Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Intoxicación accidental por monensina sódica en un hato lechero al norte de México

Accidental monensin sodium poisoning in a dairy herd in northern Mexico

Authors/Autores: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Gaytán L., Véliz F.G., Morán J., Delgado R.A.

ID: e1363

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1363>

Received/Fecha de recepción: May 24th 2022

Accepted /Fecha de aceptación: September 29th 2022

Available online/Fecha de publicación: October 20th 2022

Please cite this article as/Como citar este artículo: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Gaytán L., Véliz F.G., Morán J., Delgado R.A. (2022). Accidental monensin sodium poisoning in a dairy herd in northern Mexico. *Revista Bio Ciencias*, 9 e1363. <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1363>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Envío de artículo

Livestock Science

Effect of the Administration of Bacteriophages to Calves Infected with *Cryptosporidium* spp. on the Health Status, Nutrition, and Survival Rate --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Behaviour, Health and Welfare
Keywords:	bacterial resistance; bovine; diarrhea; parasite; phage
Corresponding Author:	Dalia Ivette Carrillo Moreno, PhD Antonio Narro Agrarian Autonomous University Unit Laguna MEXICO
First Author:	Levi Norberto Espinosa García,
Order of Authors:	Levi Norberto Espinosa García, Ramón Delgado Leticia Gaytán, PhD Francisco Véliz, PhD Javier Morán, PhD Lee Jung-Jin, PhD Dalia Ivette Carrillo Moreno, PhD
Abstract:	<p><i>Cryptosporidium</i> spp., together with enteropathogenic bacteria, induces diarrhea, which could cause death to the calf. The treatment includes antibiotics, however, in recent years bacterial resistance has required the search for other alternatives. The objective of this work was to evaluate the use of bacteriophages in calves infected with <i>Cryptosporidium</i> spp. on their state of health, nutritional aspect, and survival rate. A farm with calves infected with this protozoan was selected. For its control, decoquinatate (2.5 mg/Kg) was used. They were used 72 pre-weaned calves, divided into two groups. The treated group (n= 36) received 5 g of bacteriophages by mouth; the control group did not receive bacteriophages. The treated group had a higher survival rate (100 vs 86,11%, p= 0.05). The total number of days with diarrhea was lower for the treated group (4.69 ± 2.29 vs 13 ± 4.88 d, p= 0.04) and the range of appearance was wider. The diarrheas appeared earlier in the control group (13 vs 18 d, p= 0.03). The treated group obtained a lower probability of receiving antibiotics treatment (OR = 0.05). Similarly, better results were obtained in the daily weight gain (0.634 ± 0.01 vs 0.562 ± 0.02 kg, p= 0.03), weight (77.35 ± 1.47 vs 71.38 ± 1.62 kg, p= 0.01), and height (92.21 ± 0.8 vs 89.2 ± 0.59 cm, p= 0.009). The treated group reported the highest value of leukocytes on day 10 and the lowest on day 5 (p= 0.04). The supplementation with bacteriophages to calves infected with <i>Cryptosporidium</i> spp. improves the survival rate, the days of diarrhea decrease, and the appearance of diarrhea is delayed. Additionally, the use of antibiotics is reduced. While improving the health of calves, it is also improved their nutritional state.</p>
Suggested Reviewers:	Alex Solís Corrales, PhD University of Panama alex.solis@up.ac.pa He works with cattle and is a data analyst Homero Salinas González, PhD National Institute of Forestry Agriculture and Livestock Research salinas.homero@inifap.gob.mx He works with ruminants, is a data analyst and an objective person when analyzing articles

Envío de artículo

[ERA] Acuse de recibo de envío

Dr. Efraín de la Cruz Lázaro <editorera1@ujat.mx>

Jue 12/05/2022 01:14 PM

Para: Usted

Levi Espinosa:

Gracias por enviar el manuscrito "EL ESTRÉS CALÓRICO INFLUYE EN LAS REACCIONES ADVERSAS POSINMUNIZACIÓN EN BECERRAS HOLSTEIN-FRIESIAN" a Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. Con nuestro sistema de gestión de revistas en línea, podrá iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial.

URL del manuscrito: <https://era.ujat.mx/index.php/rera/authorDashboard/submission/3363>

Nombre de usuario/a: leviespinosa05

En caso de dudas, contacte conmigo. Gracias por elegir esta revista para publicar su trabajo.

Dr. Efraín de la Cruz Lázaro

_____ Ecosistemas y Recursos Agropecuarios <http://era.ujat.mx>

[Responder](#) | [Reenviar](#)

Índice general

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Principales enfermedades infecciosas de las becerras lactantes	3
2.1.1 Criptosporidiosis	3
2.1.1.1 Ciclo de vida.....	5
2.1.1.2 Daño a los enterocitos	8
2.1.2 Diarreas de origen bacteriano	10
2.1.2.1 Prevención	12
2.1.3 Neumonía de origen bacteriano	15
2.1.3.1 Vacunación y estrés calórico.....	16
2.2 Uso de antibiótico y su resistencia.....	21
2.3 Bacteriófagos.....	23
2.3.1 Breve historia	24
2.3.2 Taxonomía	25
2.3.3 Estructura	26
2.3.4 Modo de acción	28
2.3.5 Los bacteriófagos, ¿están vivos?	33
2.3.6 Beneficios.....	35
2.4 Eficientar la ganancia de peso: Implicaciones de la monensina sódica...	37
III. ARTÍCULOS	39
IV. CONCLUSIONES GENERALES	87
V. LITERATURA CITADA	88

Lista de figuras

Figura 1. Especies de <i>Cryptosporidium</i> y sus principales huéspedes	5
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.	8
Figura 3. Adherencia del esporozoito a célula entérica y formación del trofozoito	9
Figura 4. Las imágenes ilustran un esporozoíto de <i>Cryptosporidium</i> que invade las células epiteliales del huésped (izquierda) y un trofozoíto de <i>Cryptosporidium</i> dentro de la vacuola parasitófora (derecha). Adaptado de invasión parasitarias en células huésped	9
Figura 5. Histología de intestino delgado sin infección (izquierda) y con infección (derecha) de <i>Cryptosporidium parvum</i> . Es notable el cambio histológico donde los mecanismos de adaptación hacen que en el intestino dañado se incrementen la tasa de mitosis.....	10
Figura 6. Descripción del estrés calórico en el sistema inmunológico y otros parámetros del ganado lechero	19
Figura 7. ITH y sus diferentes niveles en ganado Holstein Friesian	20
Figura 8. Estructura representativa de los fagos del orden <i>Caudoviridae</i>	25
Figura 9. Familias de los bacteriófagos y sus características	26
Figura 10. Estructura gráfica de un bacteriófago (izquierda) e imagen real de un fago tomado con microscopía electrónica (derecha).....	28
Figura 11. Ciclo de vida del bacteriófago: los fagos líticos se adhieren e infectan una célula bacteriana, lo que da como resultado la reproducción de fagos y la lisis de la célula huésped. El ciclo lisogénico da como resultado la integración de un genoma de fago en el genoma bacteriano llamado profago, el cual, bajo las condiciones de activación, podrá entrar al ciclo lítico	29
Figura 12. Modelo de adsorción del fago T4 a la superficie del huésped	31
Figura 13. Mecanismos de comunicación dentro de la bacteria huésped infectada por fagos	32
Figura 14. Representación esquemática del sistema holina / endolisina encargado de la lisis desde dentro de una bacteria	33

I. INTRODUCCIÓN

La crianza de beceras es una de las etapas más importantes en un sistema de producción bovina. Su importancia radica en que, en ella, está todo el trabajo de mejora genética implementado en el hato, y, por lo tanto, son el futuro de la producción. Diversos estudios han demostrado que la calidad de la nutrición que se implemente en este periodo se verá reflejado en los primeros ciclos de producción láctea (Soberón, 2012; Soberón & Van Amburgh, 2016). Por eso, es común ver, en animales jóvenes, el uso de sustancias como la monensina sódica para mejorar la conversión alimenticia (Łowicki & Huczynski, 2013).

La buena calidad nutritiva sólo se alcanza si la becerca está sana y libre de estrés. Esta relación entre la salud y la nutrición es muy estrecha; debido a que, si el animal está sano va a nutrirse adecuadamente y viceversa. El problema reside en que, en la etapa neonatal, es donde las terneras están más susceptibles a enfermarse porque su sistema inmunológico aún no está desarrollado completamente; y como consecuencia, se produce con mayor regularidad enfermedades como neumonías y diarreas principalmente (Tao et al., 2012). La USDA (2021) recomienda un parámetro de mortalidad del 5 %. Sin embargo, en la región de La Comarca Lagunera, el promedio de mortalidad causada por diarreas es del 15 % y si se combina con neumonías este porcentaje puede ascender a 28 %. Con estas elevadas tasas de mortalidad, la morbilidad puede alcanzar hasta 100 % (Rocha et al., 2019) lo que impide que puedan nutrirse adecuadamente y, por lo tanto, no alcanzarán su potencial lechero, no podrán inseminarse en los tiempos establecidos y tendrán mayor probabilidad de ser enviadas a sacrificio tempranamente (Ferreira et al., 2020).

Cuando una becerca se enferma, regularmente es tratada con antibióticos y antiinflamatorios. No obstante, en los últimos años, se ha tratado de buscar otras alternativas por el incremento de la resistencia bacteriana (Diao et al., 2017; Low et al., 2021). La mejor forma de evitar que las beceras se enfermen de diarrea o neumonías es a través de la prevención. Dos métodos que han probado su efectividad previniendo diarreas y neumonías es el uso de bacteriófagos y la

bacterinización, respectivamente (Ahmad et al., 2014; Alomari et al., 2021). Aunque, en la práctica diaria, estas herramientas conllevan implicaciones que es importante descubrir. Por un lado, es relevante conocer todas las posibles aplicaciones de los bacteriófagos en el campo de la producción para prevenir diarreas. También, es necesario saber los efectos adversos a las bacterinas que se pudieran presentar bajo condiciones de estrés. Y, además, es importante conocer las implicaciones del uso de sustancias como la monensina sódica en bovinos. Aunque muchos de los efectos e implicaciones de estas estrategias ya se saben, hay otros que aún no se conocen o se conocen muy poco, como el uso de bacteriófagos bajo un ambiente de infección parasitaria o bien la bacterinización bajo condiciones de estrés calórico; circunstancias altamente comunes en muchas áreas ganaderas. Aunado a esto, el uso de distintas sustancias para alcanzar los parámetros nutricionales y de salud, como la monensina sódica, implica escenarios de intoxicación si su manejo no se realiza adecuadamente. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar los efectos e implicaciones del uso de bacteriófagos, bacterinas y monensina sódica en la salud de bovinos jóvenes; con la finalidad de que en un futuro se apliquen correctamente en las unidades de crianza de los hatos ganaderos, contribuyendo a obtener animales sanos y bien nutridos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Principales enfermedades infecciosas de las becerras lactantes

Las terneras lactantes, en sus primeros 60 días son muy susceptibles a enfermarse. Hay que recordar que, técnicamente, aún son recién nacidas. En este periodo se encuentra la etapa perinatal (del parto hasta las primeras 48 h) donde el 8 % de las terneras mueren, esto en Estados Unidos (Mee, 2008), en México esta cifra puede ser más alta. Una vez que se pasa el riesgo de la etapa perinatal, las terneras sobrevivientes pasarán aproximadamente 60 días en jaulas individuales donde estarán expuestos a diferentes retos, entre ellos, el riesgo de presentar alguna alteración patológica. Existe una amplia gama de enfermedades que las podríamos clasificar en: infecciosas y no infecciosas. En el primer grupo encontramos enfermedades de origen viral, bacteriana, fúngica y parasitarias. Por su parte, en el segundo grupo encontramos alteraciones metabólicas, congénitas y hereditarias.

A nivel práctico, las enfermedades más importantes son las del primer grupo, particularmente aquellos involucrados en el desarrollo de diarreas y neumonías. Por el lado de las diarreas, se encuentran diferentes parásitos, tal es el caso de *Cryptosporidium* spp. y bacterias como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* o *Clostridium perfringens*. Y, por el otro lado, las principales bacterias causantes de neumonías son *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* e *Histophilus somni* (Buczinski & Pardon, 2020; Cho et al., 2013). Estas bacterias son causantes de las principales muertes de becerras y producen grandes pérdidas económicas a nivel mundial. De manera que es importante conocerlas, para poder afrontar sus cuadros clínicos, así como prevenir su aparición.

2.1.1 Criptosporidiosis

Las especies de *Cryptosporidium* son protozoarios distribuidos en todo el mundo que causan infecciones gastrointestinales en animales y el hombre, este parásito

del phylum *Apicomplexa* merece una revisión especial por lo relevante que resulta en la crianza de becerras, se le identifica con el responsable de la enfermedad criptosporidiosis, que afecta principalmente a individuos malnutridos o inmunodeprimidos; los bovinos son los reservorios más importantes (Thomson et al., 2017). Los signos clínicos incluyen: diarrea, falta de apetito, fiebre y malabsorción, lo que causa pérdidas económicas asociadas con una disminución en la tasa de crecimiento y mortalidad en los animales infectados. *Cryptosporidium* spp. son capaces de causar enfermedades, sin embargo, los cuadros graves están asociados con la interacción de otras bacterias y Giardia (Díaz et al., 2021; Santin, 2020).

Por mucho tiempo, se refirió a este parásito como una coccidia, es decir, que era un parásito intracelular obligado que solo se replicaba dentro de un huésped adecuado, y que los ooquistes excretados en las heces podían sobrevivir en el medio ambiente pero no podían multiplicarse. Sin embargo, recientemente se observó que *Cryptosporidium* spp. pueden producir nuevas etapas extracelulares y completar su ciclo de vida en ausencia de un huésped. Por lo que se reubicó formalmente de coccidia a una nueva subclase: *Cryptogregarina* (antes pertenecía a la subclase *Coccidiasina*), es decir, son parásitos gregarinos (U. Ryan et al., 2016). Entonces, la principal diferencia que se reconoció es que no necesitan de un huésped para reproducirse, pueden hacerlo incluso en el bioma del agua, como los estanques utilizados en las crianzas que posteriormente se utilizan para hidratar a las becerras.

La importancia de este parásito es su capacidad de invasión en diferentes especies animales, incluyendo al hombre. Hay al menos 44 especies validadas de *Cryptosporidium* (muchas de las cuales se identificaron originalmente como genotipos y luego se describieron como especies); seis *Cryptosporidium* spp. aviarios (*C. ornithophilus*, *C. proventriculi*, *C. avium*, *C. galli*, *C. baileyi* y *C. meleagridis*); cuatro especies de peces (*C. abrahamseni*, *C. bollandi*, *C. huwi*, *C. molnari*); una especie de anfibio (*C. fragile*); cuatro especies de reptiles (*C. serpentis*, *C. varanii*, *C. testudines* y *C. ducismarci*) y 29 especies de mamíferos

(Figura 1) (U. M. Ryan et al., 2021). De todas las anteriores la especie principal que afecta a las terneras es *C. parvum*, aunque también puede ser parasitada por otras especies. En consecuencia, es de importancia epidemiológica conocer su ciclo de vida y patogenia, haciendo énfasis en la afección en terneras.

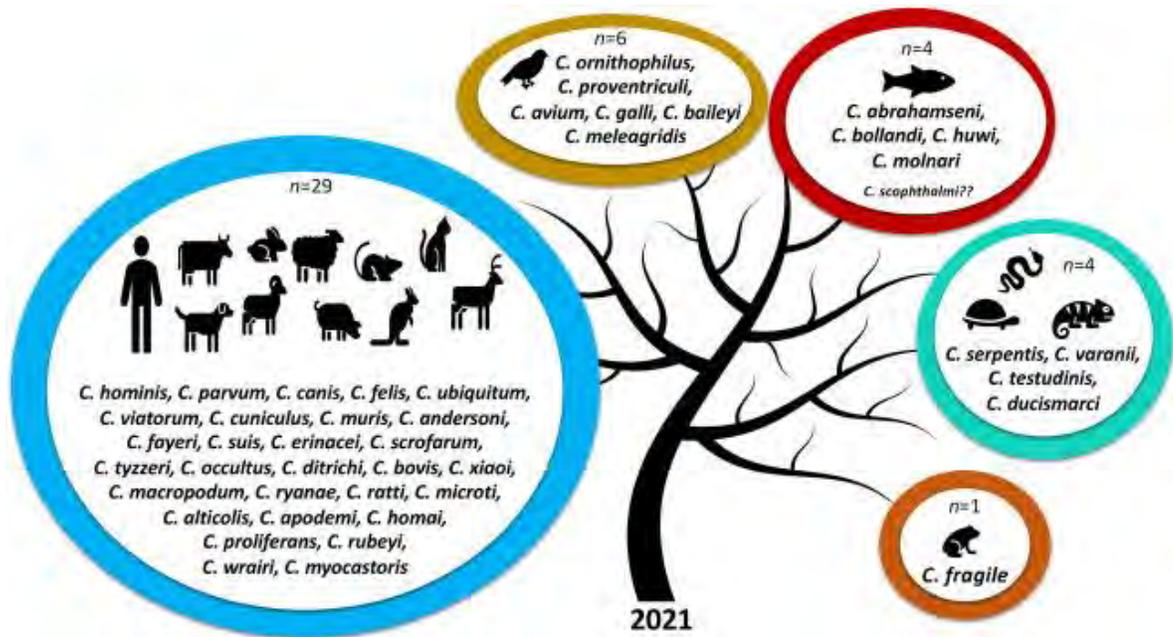


Figura 1. Especies de *Cryptosporidium* y sus principales huéspedes (Imagen tomada de Ryan et al., 2021).

2.1.1.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. se puede dividir en seis fases principales de desarrollo: desenquistamiento (liberación de esporozoitos infecciosos), merogonia (multiplicación asexual dentro de las células huésped), gametogonia (formación de micro y macrogametos), fertilización (unión de micro y macrogametos), formación de la pared del ooquiste (para producir la etapa ambientalmente resistente responsable de la transmisión de la infección de un huésped a otro) y esporogonia (formación de esporozoitos infecciosos) (Bouزيد et al., 2013). Durante todo el ciclo, todas las formas del parásito quedan confinadas a la membrana celular de los enterocitos. Las formas infecciosas se adhieren a la membrana y se internalizan dentro de un compartimento

intracelular, pero extracitoplasmático separado del citoplasma. El parásito se encuentra dentro de un compartimento cerrado del plasmalema del enterocito, descrito como la vacuola parasitófora, donde está protegido del ambiente intestinal y la célula huésped le suministra energía y nutrientes a través de un orgánulo alimentador, su complejo apical (Thompson et al., 2005).

El ciclo de vida comienza con la ingestión de los ooquistes esporulados por parte del huésped; los ooquistes se exquistan y liberan cuatro esporozoitos infecciosos (Figura 2). Este desenquistamiento de los ooquistes se desencadena ante la presencia de varios factores, como el dióxido de carbono, la temperatura, las enzimas pancreáticas y las sales biliares (Bouzid et al., 2013). La exquistación permite la salida de los cuatro esporozoitos infecciosos. Los esporozoitos liberados se deslizan sobre la célula intestinal y los invaden ayudados por su motilidad. Esta forma de motilidad de los esporozoitos de *C. parvum* experimentan movimientos de deslizamiento circulares y helicoidales. Durante la motilidad deslizante, los esporozoitos depositan rastros de proteínas, que están involucradas en la unión e invasión de las células huésped. Los esporozoitos de *Cryptosporidium* spp. poseen un complejo apical compuesto por micronemas, una sola roptría y gránulos densos que permiten que el esporozoito se adhiera e invada la célula, induciendo a la membrana celular a encerrar al parásito en su interior; la vacuola parasitófora. Estos orgánulos secretores están involucrados en la unión e invasión de la célula huésped y también están presentes en otros parásitos apicomplejos como: *Toxoplasma*, *Plasmodium* y *Eimeria* (Tomley & Soldati, 2001).

Cada esporozoito se desarrolla en un trofozoito esférico, que sufre merogonia y forma un meronte tipo I que contiene ocho merozoítos. Estos merozoítos se liberan y se adhieren nuevamente a la superficie de una célula epitelial, donde experimentan merogonía una vez más y forman un meronte de tipo I adicional o un meronte de tipo II. Un meronte tipo II contiene cuatro merozoítos. Estos merozoítos, cuando se liberan, se adhieren nuevamente a la célula epitelial, pero en lugar de convertirse en más merontes, inician la gametogonía. Los merozoítos

individuales producen microgamontes o macrogamontes. Cada microgamonte emprende la división nuclear y se diferencia para formar hasta 16 microgametos que, cuando se liberan de la vacuola parasitófora, localizan y fertilizan un macrogametocito unicelular que se ha desarrollado a partir de un macrogamonte (Bouzid et al., 2013).

El producto de la fertilización, el cigoto, experimenta dos ciclos asexuales de esporogonía para producir un ooquiste con una pared gruesa o una pared delgada, que contiene cuatro esporozoítos. Los ooquistes de paredes gruesas se liberan en la luz del intestino, se excretan del huésped en las heces y son inmediatamente infecciosos, lo que permite la propagación de la infección a otros huéspedes susceptibles. Además, *Cryptosporidium* spp. es capaz de autoinfectar al mismo huésped. La autoinfección se produce a través de los ooquistes de paredes delgadas, que se desenquistan una vez que se separan del epitelio, y el ciclo comienza de nuevo. La autoinfección y el reciclaje de merontes tipo I brindan una explicación para la infección crónica persistente (Bouzid et al., 2013; Sinski & Behnke, 2004; Tomley & Soldati, 2001)

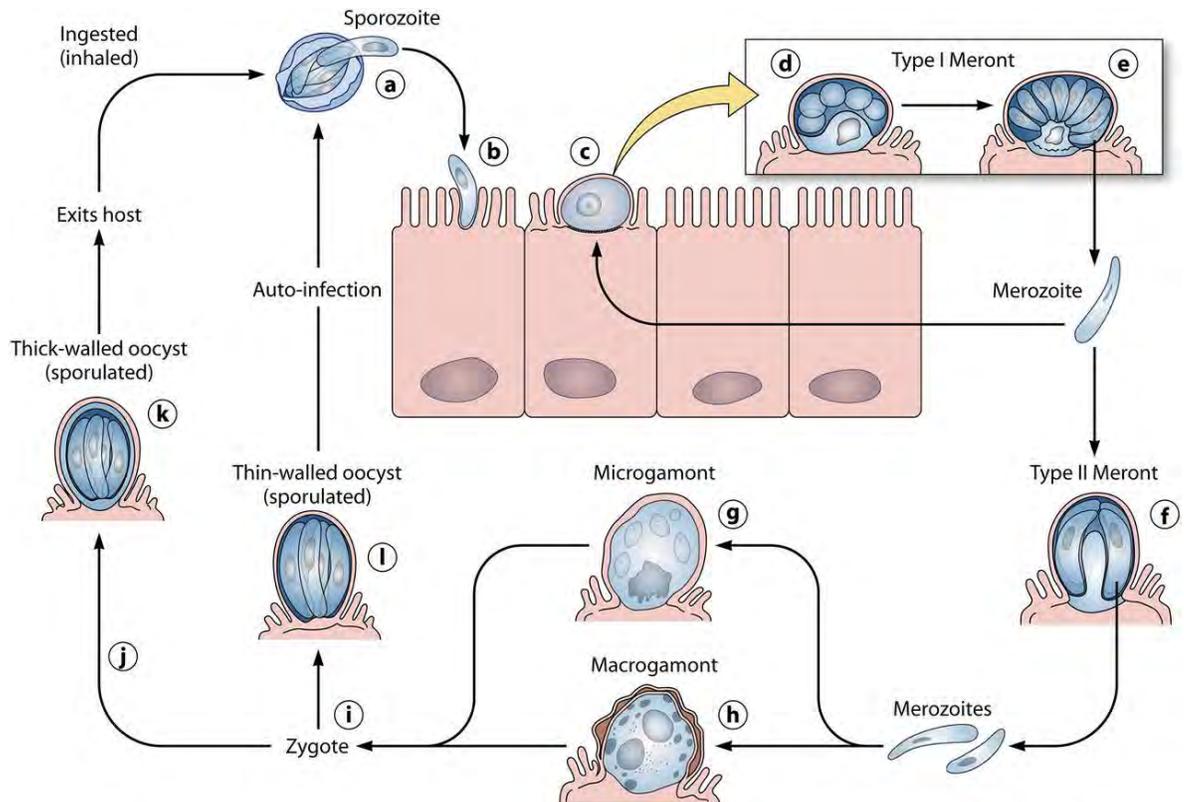


Figura 2. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (Imagen tomada de Bouzid et al., 2013).

2.1.1.2 Daño a los enterocitos

Como parte del ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp., al llegar al tracto gastrointestinal, los esporozoitos invaden el epitelio entérico de las terneras (Santín, 2020). Estas se adhieren a las células epiteliales del íleon (Figura 3), concretamente en la unión ileocecal en el caso de *C. parvum*. Después de la unión, los esporozoítos se incorporan dentro de una vacuola parasitófora formada por la membrana de la célula huésped, pero permanecen extracitoplasmáticos. Un orgánulo alimentador, exclusivo de *Cryptosporidium* spp. y presente en todas las etapas intracelulares, actúa como interfaz entre el parásito y la célula huésped. El orgánulo alimentador permite que el parásito obtenga todos los nutrientes necesarios del huésped mientras aún está protegido de la respuesta inmune del huésped y las condiciones intestinales hostiles (Figura 4) (Thomson et al., 2017).

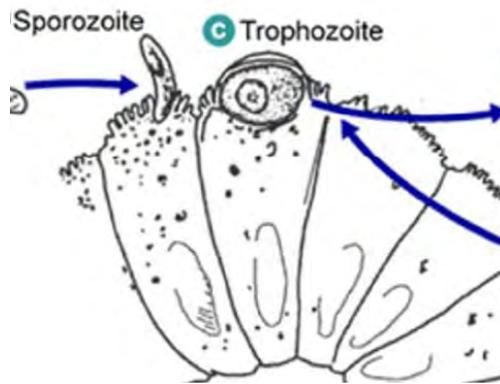


Figura 3. Adherencia del esporozoito a célula entérica y formación del trofozoito. (Imagen tomada de Thomson et al., 2017).

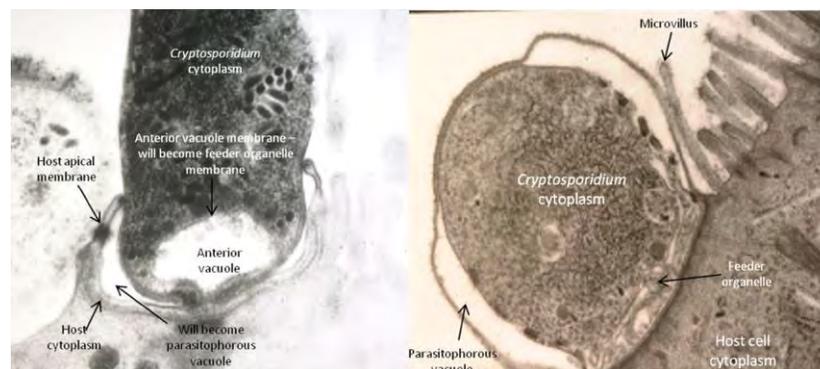


Figura 4. Las imágenes ilustran un esporozoíto de *Cryptosporidium* que invade las células epiteliales del huésped (izquierda) y un trofozoíto de *Cryptosporidium* dentro de la vacuola parasitófora (derecha). (Adaptado de invasión parasitarias en células huésped [fotografía] por Thomson et al., 2017).

En este proceso de adhesión, se presenta alteración de la membrana celular del enterocito, puesto que es el lugar donde se fija el parásito. Regularmente, el enterocito no se destruye inmediatamente, porque el parásito necesita que la célula viva para alimentarlo y completar sus fases biológicas, aunque sí le causa daño. Si la respuesta inmune es eficiente, el parásito será destruido y la célula podrá repararse. Pero si no, ésta experimentará el punto de no retorno debido al daño a su membrana y sufrirá necrosis (López et al., 2017). Si la célula muere,

será reemplazada por otra. En este punto y dependiendo del grado de invasión y de la respuesta inmunitaria, el tejido experimentará cambios de mecanismos de adaptación al principio y necrosis después, donde las criptas intestinales serán destruidas alterando el equilibrio de absorción y secreción. Los cambios a nivel histológico son evidentes en animales infectados y no infectados (Figura 5) (Sateriale et al., 2021).

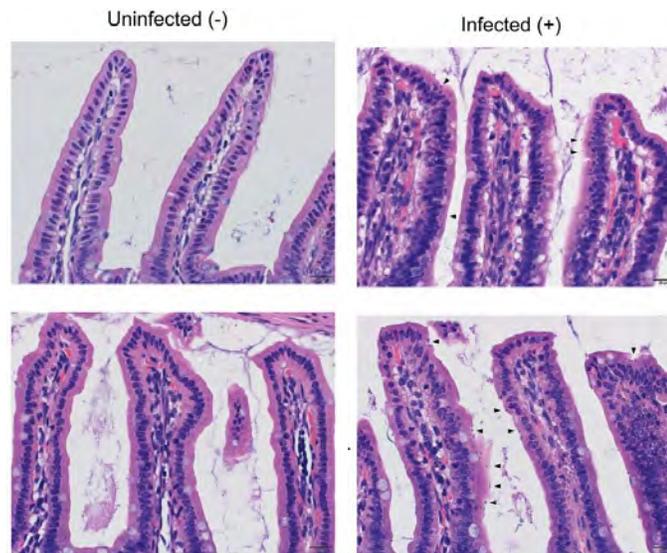


Figura 5. Histología de intestino delgado sin infección (izquierda) y con infección (derecha) de *Cryptosporidium parvum*. Es notable el cambio histológico donde los mecanismos de adaptación hacen que en el intestino dañado se incrementen la tasa de mitosis. (Adaptado de Sateriale et al., 2021)

2.1.2 Diarreas de origen bacteriano

La diarrea se define como la secreción de heces anormalmente líquidas acompañada de un mayor volumen de heces y una mayor frecuencia de defecación, que implica pérdida excesiva de líquidos y como consecuencia, deshidratación y desequilibrio electrolítico (Trigo & Germán, 2015; Zachary, 2022). En el desarrollo de la diarrea, puede estar involucrado un solo agente o bien múltiples de estos. De igual manera, puede ser causado por virus, bacterias,

parásitos o trastornos alimentarios. En esta sección se hará énfasis solo en diarreas de origen bacteriano. Estos patógenos se dividen en dos categorías principales: los que inducen la secreción intestinal y los que son invasivos.

El primer grupo (patógenos que inducen secreción intestinal), por lo general lo hacen a través de las endotoxinas que producen. Estos organismos, producen diarreas no inflamatorias, debido a que sus toxinas regularmente alteran a la fisiología de la célula a nivel bioquímico; es decir, los mecanismos de absorción o secreción de los enterocitos, pero sin destruir a la célula (Zachary, 2022). En este grupo se encuentran bacterias como *Escherichia coli* enterotoxigénica. También está *Clostridium perfringens* tipo D con su angiotoxina que como su nombre lo dice, afecta a los vasos sanguíneos (Nasr & Meghawery, 2007). Por lo general, pero no siempre, las diarreas no inflamatorias afectan las porciones más proximales del intestino. Si el origen de la diarrea fue por uno de estos microorganismos, en la inspección histológica no se observan células dañadas (Zachary, 2022).

En el otro grupo, están los patógenos que son invasivos. Estos microorganismos producen inflamación ya sea por la activación directa de citoquinas que intervienen en la inflamación o bien por daño a los enterocitos que conlleva a una respuesta inflamatoria; algunos de ellos producen citotoxinas. Aquí entran microorganismos como *Salmonella* spp. Generalmente, no siempre, las diarreas inflamatorias afectan el íleon, el ciego o el colon (Trigo & Germán, 2015; Zachary, 2022).

Cualquiera que sea el tipo de diarrea, la consecuencia es el desarrollo de desórdenes entéricos como: mala absorción, exudación (por el incremento de la permeabilidad vascular) e hipermotilidad. Las consecuencias, son anorexia y una grave deshidratación que pudiera llegar a choque hipovolémico o séptico (Cho et al., 2013; Zachary, 2022).

Los enteropatógenos bacterianos más importantes capaces de causar diarrea en los terneros son *E. coli* enterotoxigénica (que produce toxinas), *Salmonella* spp.,

y *C. perfringens*, este último produce una enterotoxemia bovina caracterizada por una alta tasa de letalidad, muerte súbita, lesiones de enteritis necrótica y hemorrágica del intestino delgado y, a veces, con ausencia de otros signos clínicos.

Estas bacterias patógenas son las más comunes y son, sin duda una de las causas bacterianas más importante de infección entérica en animales domésticos (Nasr & Meghawery, 2007).

2.1.2.1 Prevención

Prevenir las diarreas es posible, sin embargo, requiere de un complejo de actividades interrelacionadas y que están encaminadas a mantener el equilibrio de la microbiota intestinal, ese es el objetivo final. Para ello, se requieren que no entren bacterias ajenas o bien, que la carga bacteriana no sea mayor de la que debería estar. Este desequilibrio puede suceder por diferentes factores:

- Ausencia o mala implementación de un adecuado programa de vacunación en las vacas previos al parto y en los primeros días de vida de las beceras. Este punto es de suma importancia debido a que los animales necesitan tener los anticuerpos necesarios para poder combatir la invasión de cualquier bacteria. Además, con esta medida se previene la infección de agentes virales, que en muchas ocasiones son la puerta de entrada de bacterias oportunistas, aunado a que por sí solo también producen alteraciones entéricas (Heinrichs, 2017).
- Mal suministro de calostro. Este punto está relacionado con el anterior. El calostro es la primera secreción láctea proveniente de la madre. Este líquido es de suma importancia ya que es la principal fuente de anticuerpos para las terneras. Debido al tipo de placentación epiteliocorial de las vacas, los anticuerpos maternos no pueden ser transferidos al feto, por lo que la única vía es a través del calostro. Estos anticuerpos, al ser grandes moléculas proteicas, solo pueden ser absorbidos las primeras 24 horas de vida, aunque lo ideal es ser consumido en la primera hora de vida, ya que,

después de ese tiempo, comienza a disminuirse su absorción (Chamorro et al., 2017). Por lo tanto, si la vaca no tiene suficientes anticuerpos, si el calostro es de mala calidad o si no se le suministra calostro a la ternera en los tiempos establecidos, la transferencia inmunitaria se verá disminuida y las terneras estarán más susceptibles a enfermarse.

- Suministro de leche en mal estado o bien, una suplementación de leche sólida inadecuado. Hay que recordar que la leche es un buen medio para la propagación de bacterias, y esto lo podemos ver incluso con un buen sistema de almacenamiento. Por lo tanto, es importante garantizar que la leche esté libre de patógenos, lo cual será posible a través de la pasteurización. Es muy común que se cometan errores en este punto, así que es de relevancia siempre considerarlo. Si se ofrece leche en polvo, asegurarse que este bien mezclado y que sea de buena digestibilidad (McGrath et al., 2016).
- Un mal suministro de alimentos. No importa si los alimentos, ya sea leche o alimento sólido, están inocuos, un cambio abrupto en la frecuencia o en el volumen puede tener efectos deletéreos. Estos cambios deben hacerse paulatinamente, adaptando el sistema digestivo a los ingredientes nuevos, al volumen o la frecuencia. Como ejemplo es la leche, si se da en grandes cantidades, esta no será capaz de digerirse correctamente lo que puede provocar diarrea mecánica que puede ser un factor determinante para que surjan diarreas infecciosas. Lo mismo pasa con el concentrado sólido que puede ser capaz de cambiar el pH gástrico entérico, favoreciendo la replicación de bacterias indeseadas.
- Sistema de desinfección de las instalaciones deficiente. Esta actividad puede obviarse, pero muchas veces pasa desapercibido el riesgo que representa tener instalaciones y equipos contaminados. Se incluyen contenedores, almacenadores y por supuesto, también las jaulas. Hay que recordar que, en este sistema de producción, las becerras entran y salen constantemente, por lo que ya hubo animales que estuvieron usando los

mismos equipos e instalaciones, por lo que los patógenos pueden estar activos o en latencia esperando un nuevo huésped.

- Exposición a factores de estrés. Un animal estresado ya sea por el manejo o por factores ambientales, suelen liberar cortisol y otras citocinas que tienen un impacto directo al sistema inmune, como la disminución de la actividad leucocitaria (Bagath et al., 2019). Esto, tendrá como consecuencia que la respuesta inmunitaria ante los patógenos no sea la adecuada, sea sobrepasada y como consecuencia, el desarrollo de la enfermedad.
- Una mala terapia antibiótica. El uso de los antibióticos es, sin duda, una de las mejores herramientas que existen para el tratamiento de las enfermedades. Sin embargo, también puede ser contraproducente si no se hace un buen uso de ellos. Estos tienen efectos secundarios o tóxicos en diversos órganos como riñón, hígado u oído, y así mismo, son capaces de alterar la microbiota intestinal. Recordemos que en la microbiota intestinal hay bacterias y por lo tanto, están susceptibles al efecto bactericida o bacteriostático de los antimicrobianos. Si se desequilibra este sistema, puede haber una proliferación de bacterias oportunistas capaces de producir enfermedad (Hommerich et al., 2019).
- Una mala calidad el agua. El agua es el nutriente esencial más importante, las becerras necesitan beber agua para su metabolismo y bienestar. Pero también puede ser un vector en la transmisión de innumerables microorganismos que causan enfermedades. Y dado que los terneros recién nacidos tienen sistemas inmunológicos y digestivos en desarrollo, la mala calidad del agua puede afectar la salud y el rendimiento de los terneros (Senevirathne et al., 2018).

Cada uno de estos puntos aporta en sí, un valor importante en la prevención de las diarreas. Pero no pueden ser manejadas como estrategias separadas si no, como se dijo al principio, como estrategia integral que abarque a todos. Si estos factores se controlan adecuadamente, es poco probable que una ternera desarrolle diarrea.

2.1.3 Neumonía de origen bacteriano

El complejo respiratorio bovino (CRB) es el término que se utiliza para describir la enfermedad respiratoria bovina aguda y grave de causa clínicamente indeterminada. Médicamente, el CRB incluye neumonía enzoótica bovina (etiología multifactorial); manheimiosis neumónica (*Mannheimia haemolytica*); histofilosis respiratoria (*Histophilus somni*); *Mycoplasma bovis*; infecciones virales respiratorias, tales como rinotraqueítis bovina infecciosa (IBR)/herpesvirus bovino 1 (BoHV-1), virus de la parainfluenza bovina 3 (BPIV-3) y virus respiratorio sincitial bovino (BRSV); además de neumonías intersticiales no infecciosas, como edema y enfisema pulmonar bovino, síndrome de reinfección y muchas otras (Buczinski & Pardon, 2020; Zachary, 2022). En este trabajo sólo nos enfocaremos el origen bacteriano producido por: *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni*.

La manheimiosis neumónica es la enfermedad respiratoria más importante de los bovinos, particularmente en animales que han pasado por procesos de estrés, convirtiéndose en la principal causa de neumonía bacteriana grave. Las terneras son muy susceptibles a procesos de estrés, por lo que siempre están en riesgo de desarrollar este tipo de neumonía. *M. haemolytica* biotipo A, serotipo 1 es el agente etiológico más comúnmente responsable de las lesiones pulmonares graves (Zachary, 2022). Lo que vuelve a *M. haemolytica* uno de los patógenos más peligrosos, es que suele encontrarse en las vías respiratorias altas, esperando una oportunidad para poder causar daño. Además de esto, produce una leucotoxina que provoca necrosis, apoptosis o activación de leucocitos de rumiantes (Confer & Ayalew, 2018). Algunos investigadores aún consideran a *P. multocida* y otros serotipos de *M. haemolytica* como principales causas de esta enfermedad, porque, junto a otros serotipos, especialmente serotipo 2 y serotipo 6 podrían estar asociados con el 40 % de todos los casos. Esta enfermedad se caracteriza por una bronconeumonía fibrinosa aguda severa y la presencia de exudados fibrinosos en la cavidad pleural (Crouch et al., 2012). Lo que refleja el

hecho de que la muerte generalmente ocurre de manera temprana o en una etapa aguda.

La histofilosis respiratoria es causada por *H. somni*, que presenta al menos ocho formas clinicopatológicas, cada una de las cuales afecta a órganos diferentes. Este complejo incluye septicemia, encefalitis (conocida como meningoencefalitis trombótica), neumonía (histofilosis respiratoria), pleuritis, miocarditis, artritis, oftalmatitis, conjuntivitis, otitis y aborto. La forma respiratoria de histofilosis bovina es el resultado de la capacidad de la bacteria para inducir bronconeumonía supurativa y fibrinosa. Al igual que *M. haemolytica*, requiere factores predisponentes como el estrés o una infección viral previa para producir enfermedad. La capacidad de *H. somni* para causar septicemia e infecciones localizadas en los pulmones, cerebro, ojos, oído, corazón, la glándula mamaria, los órganos genitales o la placenta es atribuible a factores de virulencia específicos, como las proteínas de unión a inmunoglobulina y los lipooligosacáridos (Zachary, 2022). Además, *H. somni* tiene la capacidad de sufrir variaciones estructurales y antigénicas, evadir la fagocitosis al promover la apoptosis leucocitaria, inhibir la destrucción intracelular, reducir las concentraciones de transferrina e inducir la apoptosis endotelial en los pulmones de los terneros afectados (McGill & Sacco, 2020). Las infecciones pulmonares mixtas de *H. somni*, *M. haemolytica*, *P. multocida* son las más comunes en terneros que junto a las diarreas, causan elevados porcentajes de morbilidad, lo que repercute en pérdidas económicas.

2.1.3.1 Vacunación y estrés calórico

Las neumonías tienen un gran impacto económico en las unidades de crianza, pero estas se pueden evitar. En general hay dos maneras de prevenirlas: por un lado, está la inmunización, a través del calostro y por medio de vacunas y bacterinas. Y por el otro, está el evitar situaciones de estrés que puedan deprimir el sistema inmune haciendo que los patógenos aprovechen y produzcan alteraciones.

La inmunización, es de las formas más eficientes de evitar el desarrollo de neumonías. En ellas se utilizan antígenos contra virus y bacterias involucradas en el complejo respiratorio bovino. Esta se puede hacer de dos maneras: inmunizando a la madre, quien, a través del calostro podrá pasar los anticuerpos a la cría; o bien, inmunizando a la ternera, ya sea por vía parenteral o nasal. En la mayoría de las neumonías el mayor daño lo provocan bacterias, pero es importante prevenir la infección por virus debido a que son estos los que “abren” el paso para que la infección por las bacterias se desarrolle (McGill & Sacco, 2020; Oliveira et al., 2020). Por el lado de las bacterias, estas se pueden prevenir inmunizando con bacterinas. El término “bacterina” hace referencia a un compuesto biológico que contiene Patrón Molecular Asociado a Patógenos (PAMP) y otros compuestos que funcionan como antígenos al momento de inocularlo. Aunque también puede usarse el término “vacuna” para describir al mismo compuesto, tal y como se hace con las vacunas virales (Confer et al., 2009).

El inconveniente del uso de las bacterinas es la reacción adversa que pueden desencadenar. Aunque cada vez se mejora la calidad de las bacterinas, regularmente se usan lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas como antígenos. Estos LPS son los que también se liberan en caso de endotoxemia que conduce al desarrollo de choque séptico (López et al., 2017). La endotoxemia es un factor importante en la patogenia de varias condiciones clínicas, desde acidosis ruminal, síndrome de muerte súbita hasta laminitis, debido a infecciones por Gram negativos y positivos. Las endotoxinas (como los lipopolisacáridos) son partes estructurales de la pared celular bacteriana. Están compuestos por unidades repetitivas de oligosacáridos; y el tipo, secuencia y enlace de estos sacáridos determinan la especificidad antigénica. Por lo tanto, la cadena lateral se conoce como la cadena lateral específica de O y se usa para la tipificación serológica de bacterias Gram negativas (Andersen, 2003).

La administración de endotoxinas al ganado bovino desencadena una cascada de eventos fisiológicos y fisiopatológicos donde la manifestación clínica en el

animal va a depender de la dosis. Si esta es muy alta, los signos que se presentan son similares al de un choque séptico. Se observan alteraciones de órganos y sistemas como el respiratorio, cardiovascular, gastrointestinal y tegumentario. Las endotoxinas bacterianas dañan los tejidos y desencadenan la liberación de sustancias vasoactivas (histamina, cininas y leucotrienos) que conduce al desarrollo del choque (Zachary, 2022). En general, las endotoxinas se consideran moderadas en cuanto a su toxicidad y antigenicidad, pero el ganado bovino es particularmente sensible a ellas. La liberación de estas sustancias puede ocurrir en cualquier etapa, desde la fabricación del producto hasta su manejo en sí, como la agitación excesiva, exposición a rayos UV o congelación, lo que puede aumentar la concentración de endotoxina liberada debido a la destrucción de las bacterias, aumentando la probabilidad de efectos adversos (Rashid et al., 2009; Richeson et al., 2019).

La otra forma de prevenir las neumonías, además de la inmunización, es mediante el manejo de los animales. Con “manejo” se hace referencia a las acciones tomadas en la crianza desde el parto de las terneras hasta el destete. Algunas de estas acciones son las mismas que se mencionaron en el apartado de prevención de diarreas. En general, lo que se pretende es disminuir el mayor estrés posible en las terneras para evitar que se inmunodepriman. Aunque, hay un tipo de estrés que, en ocasiones, ya sea por omisión o por falta de recursos, se pasa por alto. Y es el estrés calórico.

El estrés por calor ocurre cuando un animal no puede mantener el equilibrio entre la acumulación y la disipación de calor. Los factores climáticos que influyen en la acumulación de calor en el ganado lechero incluyen la temperatura ambiente (°C), la humedad relativa (%), la radiación solar (W/m²) y la velocidad del viento (m/s). El impacto del estrés calórico también está influenciado por el genotipo, la salud y el estado inmunológico individual de cada animal (Bagath et al., 2019). Durante el estrés agudo la producción de cortisol actúa como un estímulo para el sistema inmunitario. Sin embargo, durante el estrés crónico, la secreción de cortisol se ha asociado con la supresión inmunitaria. Por ejemplo, bajo estrés

agudo, los leucocitos aumentan entre 21 – 26 % en por la involución timo linfática. Este aumento podría deberse a una movilización acelerada de neutrófilos maduros desde la médula, debido a la liberación de glucocorticoides. Pero en estrés crónico el número de linfocitos y leucocitos disminuye (Figura 6) (Bagath et al., 2019; Jin, Y., Hu, Y., Han, D., Wang, 2011). Además, el estrés calórico reduce las barreras naturales a las bacterias y también aumenta potencialmente el nivel de endotoxinas, lo que puede tener más efectos indeseables en las vacunas que contienen células enteras, como el caso de las bacterinas que se usan para la prevención de neumonías (Lambert, 2009).

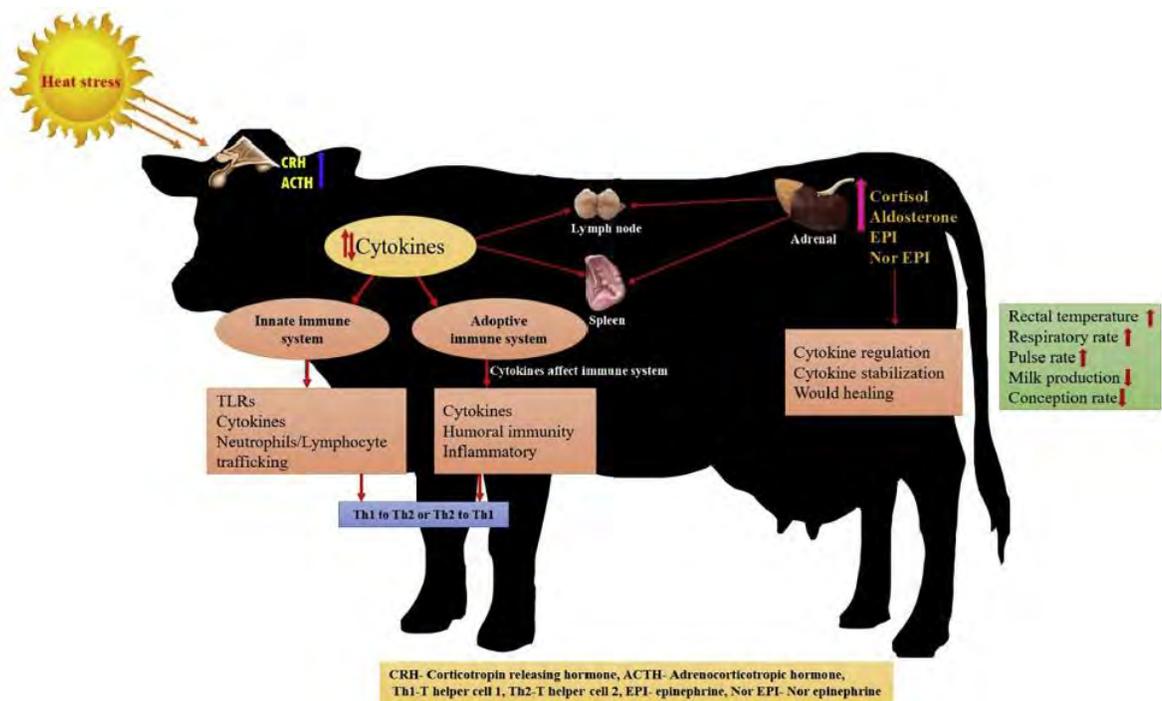
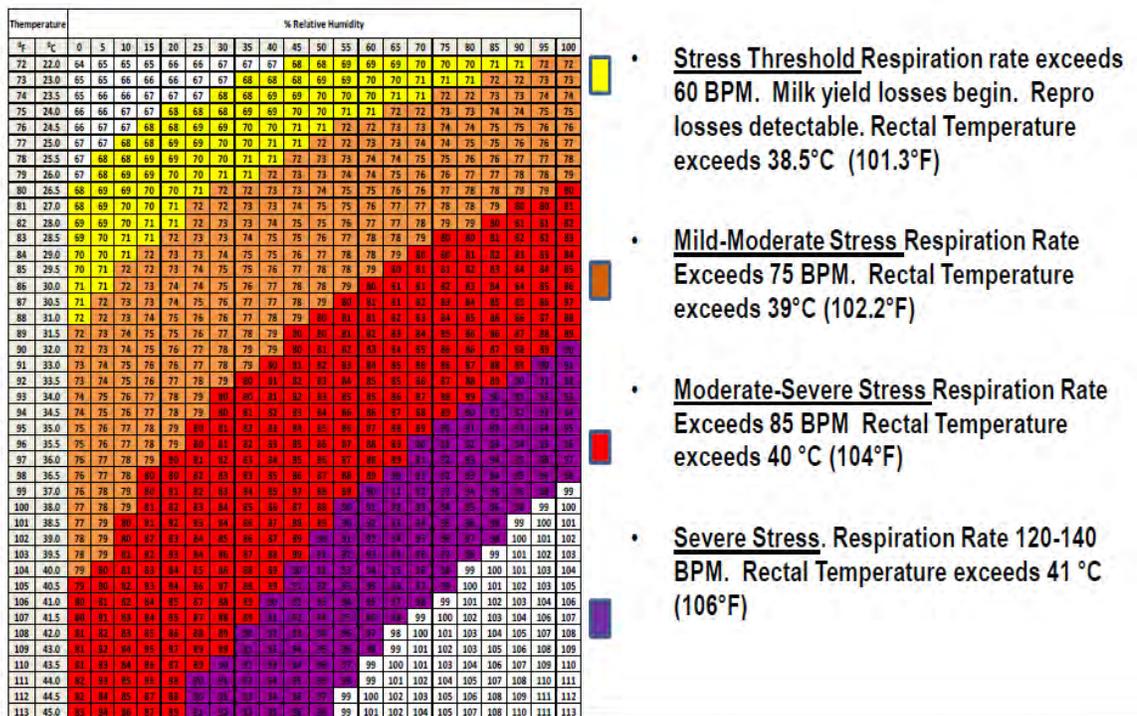


Figura 6. Descripción del estrés calórico en el sistema inmunológico y otros parámetros del ganado lechero. (Imagen tomada de Bagath et al., 2019)

Ahora que se sabe como influye el estrés calórico en la respuesta inmune, es importante saber, cuándo una vaca está sometida bajo estrés calórico. El ganado lechero es sensible al estrés por calor debido a la alta producción metabólica de

calor y al consumo de alimento asociado con la fermentación del rumen y la producción de leche. Asimismo, por las mismas razones, el ganado lechero es relativamente resistente al estrés por frío. El estrés por calor en el ganado se caracteriza por un aumento de la temperatura rectal, tasas de respiración elevadas y una menor ingesta de alimento, lo que contribuye a la disminución de la producción de leche (Collier et al., 2012). Muchos estudios publican sobre el efecto de la temperatura sobre diferentes variables productivas y fisiológicas. Pero en la respuesta al clima no solo influye la temperatura sino otros factores, por eso se utiliza el índice de temperatura y humedad (ITH), esta medida combina la temperatura ambiente y la humedad relativa, aunque algo más preciso sería medir también la velocidad del viento. Así pues, a un ITH de 68, el estrés calórico comienza a estar presente, y entre más aumenta, sus efectos deletéreos son más marcados en el ganado Holstein Friesian (Figura 7).



- **Stress Threshold** Respiration rate exceeds 60 BPM. Milk yield losses begin. Repr losses detectable. Rectal Temperature exceeds 38.5°C (101.3°F)
- **Mild-Moderate Stress** Respiration Rate Exceeds 75 BPM. Rectal Temperature exceeds 39°C (102.2°F)
- **Moderate-Severe Stress** Respiration Rate Exceeds 85 BPM Rectal Temperature exceeds 40 °C (104°F)
- **Severe Stress**. Respiration Rate 120-140 BPM. Rectal Temperature exceeds 41 °C (106°F)

Figura 7. ITH y sus diferentes niveles en ganado Holstein Friesian. (Imagen tomada de Collier et al., 2012).

2.2 Uso de antibiótico y su resistencia

Un antibiótico es una sustancia natural o sintética que mata las bacterias o bloquea su crecimiento. Los antibióticos actúan sobre la bacteria atacando ya sea su pared celular, su membrana citoplasmática, su metabolismo de síntesis de proteínas, su ácido nucleico (ARN y ADN), o incluso más de uno de estos elementos (Mbarga et al., 2022). En muchos hatos ganaderos, las diarreas (al igual que las neumonías), son tratadas con antibióticos sin previo diagnóstico. Sin embargo, esto no debería ser así. No es que este mal usar antibióticos, sino que, antes de administrar cualquier terapia es importante hacer un examen físico que, junto a la anamnesis y pruebas de laboratorio complementarias (si fuera necesario), nos dará un diagnóstico donde podremos elegir el tratamiento adecuado. Entonces, caeríamos en cuenta que muchas veces ni siquiera es necesario usar antibióticos.

El uso indiscriminado de estos antimicrobianos ha ido en aumento en los últimos años. En el ramo de la veterinaria y específicamente en el sector productivo, su uso ha sido desmedido. Por la naturaleza de esta industria, muchas veces no se tratan animales aislados, sino que, frecuentemente se presentan alteraciones en un grupo de ellos con las mismas características. Por lo que hacer un examen físico a cada uno de ellos se vuelve impráctico. Además, no solo se utiliza como tratamiento de enfermedades sino como promotor de crecimiento, donde se añade antibiótico a animales clínicamente sanos. Solo en los Estados Unidos, uno de los países con mayor control del uso de estos fármacos, se ha estimado que aproximadamente el 80 % de los antibióticos se utilizan en la cría de ganado como aditivos alimentarios o promotores del crecimiento para mejorar la calidad y el rendimiento de la producción (Mbarga et al., 2022) lo cual, desde un punto de vista médico, está mal.

Aplicar antibiótico ha funcionado a través del tiempo. Pero, en los últimos años su efectividad no ha sido la misma. Se observan problemas de resistencia antimicrobiana. La resistencia a los antibióticos se define como la capacidad de una bacteria para resistir la actividad inhibidora o destructiva de un

antimicrobiano al que no era resistente (Palma et al., 2020). El problema de usar antibiótico para todo se exagera por el mal uso de la terapia; no se les aplica ni las dosis correctas ni el tiempo indicado. Favoreciendo aún más a la resistencia. Y no es que solo en el ramo veterinario se hagan malas prácticas, esto también se observa en medicina humana. Todos estos factores han llevado a que la comunidad científica haya comenzado desde hace algunos años, su preocupación por este problema.

Aunque la resistencia a los antibióticos parece ser un problema actual, lo cierto es que los primeros reportes de resistencia datan de los años 40's. por lo que la resistencia no está dado por estos últimos años, sino por la exposición de la bacteria a un antibiótico en sí. Por ejemplo, a finales de los años 20's, Alexander Fleming (1929) informó sobre el descubrimiento de la penicilina, lo que vino a revolucionar el mundo de la medicina respecto al manejo de las infecciones bacterianas. Tiempo después, Rammelkamp y Maxon (1942) reportaron la primera resistencia de la penicilina a *Staphylococcus aureus*. Es decir, *S. aureus* le tomó solo 14 años crear resistencia a la penicilina que en ese momento se producía. Y este mismo caso se fue replicando para los antibióticos que se generaban al punto que actualmente, se tiene reporte de resistencia para casi cualquier antibiótico. Y de los que aún no se reportan, se cuidan para evitar crear resistencia (Saga & Yamaguchi, 2009).

Los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos incluyen los sistemas de exportación activa dentro de las membranas de las bacterias, la prevención de la entrada de antimicrobianos en las células de las bacterias patógenas, la destrucción enzimática de los agentes antimicrobianos, la producción de biopelículas gruesas y los sitios de acción bacterianos que han cambiado para protegerlos ante la acción de los antibióticos (Varela et al., 2021). Por eso es de suma importancia hacer uso correcto de los antibióticos y no llegar al punto de prohibirlos incluso entre los profesionales de la salud como la media que tomó el gobierno en Chile, donde restringió 17 clases de antimicrobianos a los profesionales veterinarios. Prohibiendo su registro, fabricación, venta y

utilización. La medida se sustentó en las determinaciones tomadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que los ha clasificado a estos antibióticos como de importancia crítica para la salud humana, por lo que, según sus decisiones, restringieron su uso en medicina veterinaria para evitar el desarrollo de resistencia antimicrobiana, y así mantener su eficacia al aplicarlos en las personas que los requieran para determinado tratamiento de una enfermedad (Resolución 1012/2022: Prohíbe El Registro, Fabricación, Importación, Distribución, Venta, Tenencia y Uso de Los Sigüientes Antimicrobianos y Deroqa Resolución N° 5.340 Exenta, de 2020, 2022).

Dado este grave problema de salud mundial, se están buscando alternativas que puedan suplir el uso de antibióticos. Muchas de estas alternativas prácticas que actualmente se están implementando en el campo de la producción, están enfocadas en mejorar el bioma natural del animal o bien, en crear un sistema inmune más efectivo, capaz de responder eficientemente ante la invasión de microorganismos (Low et al., 2021; Mbarga et al., 2022). Pero, a pesar de esto, sigue siendo necesario estrategias que se enfoquen en destruir a la bacteria en sí, porque si bien, las anteriores alternativas pueden funcionar, los animales de producción son muy susceptibles al estrés, que puede alterar el sistema inmune. Una alternativa viable es el uso de bacteriófagos, un virus capaz de destruir a una bacteria independientemente si es o no resistente a los antibióticos, y que además se encuentra de forma natural en el medio ambiente (Borie et al., 2014; Dueñas et al., 2017; Jeong et al., 2021; Van Belleghem et al., 2017).

2.3 Bacteriófagos

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan únicamente a bacterias (células procariotas) (Squires, 2018). Estos microorganismos se multiplican dentro de su célula diana mediante la utilización a su favor de la maquinaria biosintética, lo que al final de su proceso de replicación, produce la destrucción de la bacteria, logrando reprimir el crecimiento de éstas (Jeong et al., 2021). Al tener esta propiedad de controlar grupos específicos de estos microorganismos, también puede destruir bacterias

patógenas, mostrando un gran potencial para diversas aplicaciones para la salud animal y humana (Abedon et al., 2011).

2.3.1 Breve historia

La terapia con fagos comenzó en 1896 cuando Ernest Hankin informó por primera vez de la existencia de actividad antibacteriana contra *Vibrio cholera*, el agente causante del cólera que se consideraba uno de los peligros más mortales que los humanos habían enfrentado (Ul Haq et al., 2012). Tiempo después, en 1915, Frederick Twort planteó la hipótesis de que la actividad antibacteriana podría deberse al virus (fago), sin embargo, su planteamiento no fue tomado en cuenta. En un contexto histórico narrativo, el crédito es de Félix d'Herelle, quien también descubrió a los bacteriófagos en 1917. En esas fechas, Félix d'Herelle anunció que descubrió un microbio invisible dotado de efectos antagónicos hacia el bacilo Shiga, y desde allí comenzó a hablar de bacteriófagos. (Hermoso et al., 2007; Roux, 2007)

El interés en estos virus comenzó a incrementarse, y en 1919 se usaron por primera vez fagos como agentes terapéuticos en humanos (Summers, 1999). Después, en 1925, d'Herelle reportó un tratamiento para la peste utilizando fagos. Este suceso atrajo aún más la atención hacia la terapia con estos nuevos virus por lo que se continuó investigando como posibles tratamientos a infecciones médicas y quirúrgicas (D'Herelle, 1931; Hermoso et al., 2007).

Todo marchaba muy bien como para revolucionar el mundo con el uso de bacteriófagos, pero a finales de 1920 Sir Alexander Fleming (1929) descubrió la penicilina. Esta nueva sustancia era muy efectiva contra las bacterias evitando infecciones graves, y además no era irritante ni tóxica para los animales a grandes dosis. Así pues, se convirtió en un antiséptico eficiente para la aplicación en áreas infectadas con microbios sensibles a la penicilina. Por lo tanto, transformó los tratamientos médicos de la época, siendo un tesoro valioso para la medicina. Por su parte, los fagos fueron perdiendo interés. Sin embargo, del lado europeo en lo que fue la Unión Soviética, continuaron las investigaciones

con los bacteriófagos y aun se continúa haciendo. Incluso el interés en ellos ha vuelto a resurgir en casi todo el mundo debido a las mayores dificultades para curar infecciones causadas por cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, y por el mayor conocimiento que se ha generado de los bacteriófagos (Nilsson, 2014; Ul-Haq et al., 2012)

2.3.2 Taxonomía

Mencionar la taxonomía de los fagos es desglosar una lista enorme de grupos; todas son importantes. Sin embargo, regularmente al referirse a ellos, se hace mencionando la familia al que pertenece. Hay siete familias poliédricas, filamentosas y pleomórficas que están separadas por profundas diferencias en el contenido y la estructura de los ácidos nucleicos. Todas las familias son pequeñas, a veces tienen un solo miembro y taxonómicamente no presentan problemas. Los viriones de cuatro grupos contienen lípidos y dos de ellos tienen envolturas de lipoproteínas. Los fagos que más se estudian son del orden *Caudoviridae* (de “cauda”, que en latín significa cola). Morfológicamente, se han clasificado en tres familias: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* (Figura 8 y 9) todos ellos con contenido de ADN. En la figura X se muestran las familias y la forma de sus fagos (Ackermann, 2011; Nobrega et al., 2018).

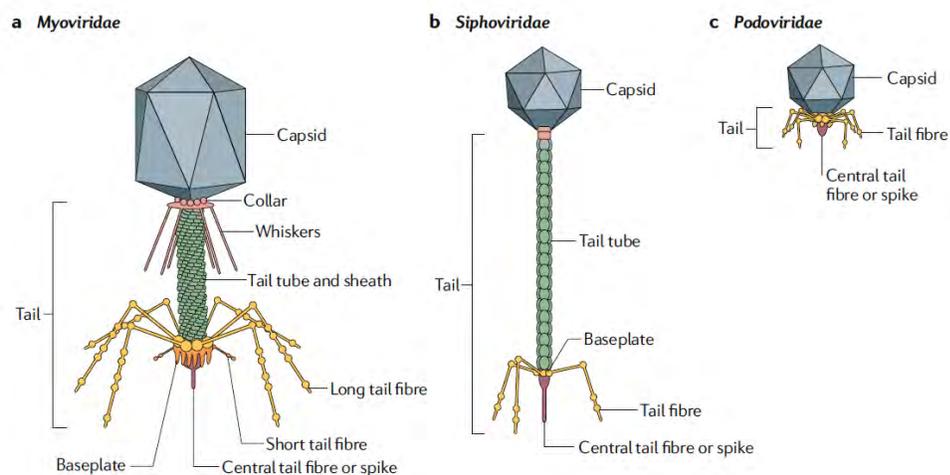


Figura 8. Estructura representativa de los fagos del orden *Caudoviridae*. (Imagen tomada de Nobrega et al., 2018)

Shape	Order or family	Nucleic acid, particulars, size	Member	Number*
	Caudovirales	dsDNA (L), no envelope		
	Myoviridae	Tail contractile	T4	1312
	Siphoviridae	Tail long, noncontractile	φ	3262
	Podoviridae	Tail short	T7	771
	Microviridae	ssDNA (C), 27 nm, 12 knoblike capsomers	φX174	38
	Corticoviridae	dsDNA (C), complex capsid, lipids, 63 nm	FM2	37
	Tectiviridae	dsDNA (L), inner lipid vesicle, pseudo-tail, 60 nm	φFD1	19
	Leviviridae	ssRNA (L), 23 nm, like poliovirus	MS2	38
	Cystoviridae	dsRNA (L), segmented, lipidic envelope, 70–80 nm	φ6	3
	Inoviridae	ssDNA (C), filaments or rods, 85–1950 x 7 nm	φd	66
	Plasmaviridae	dsDNA (C), lipidic envelope, no capsid, 80 nm	MM2	5

* From reference 1. C, circular; L, linear.

Figura 9. Familias de los bacteriófagos y sus características. (Imagen tomada de Ackermann, 2011).

2.3.3 Estructura

Para que el fago complete su ciclo de replicación, estos han desarrollado partículas estructurales que se mantienen estables en periodos de tiempo bajo diferentes circunstancias; algunas de ellas, muy adversas. Estas partículas estructurales son los que le dan forma al bacteriófago, como la cápside, formada de proteínas que resguardan el material genético.

Los fagos varían de tamaño, desde 25 a 200 nm. Así también, el material genético que resguardan varía en dimensión, lo que da como resultado una amplia gama de longitudes de genoma, de 10 a más de 500 kilopares de bases (kbp) acomodados dentro de la cápside. De igual forma, la cápside también varía en extensión, desde aproximadamente 30 a 160 nm de diámetro. La mayoría de los fagos, alrededor del 80 al 90 %, forman cápsides con simetría icosaédrica, mientras que el 10 al 20 % restante forman cápsides alargadas (Luque et al., 2020). Se hace énfasis en la cápside, porque es una de las partes más importantes en su estructura.

Las cápsides de los fagos son generalmente simétricas, con muchas copias de la misma proteína debido a que su genoma es relativamente pequeño y no pueden codificar muchas proteínas diferentes. Algunos fagos tienen en sus cápsides proteínas que se unen a moléculas presentes en matrices donde es probable que se encuentren bacterias huésped, por ejemplo, mucinas para unirse en pulmones o intestinos de animales. Los fagos también pueden tener estructuras diseñadas para el monitoreo ambiental; mostrar ciertas proteínas solo cuando se encuentra con un huésped adecuado en las condiciones idóneas donde es probable que la infección y posterior replicación, sea exitosa (Sanz-Gaitero et al., 2019).

La representación clásica de un bacteriófago es citando a uno de la familia *Myoviridae*. Estos fagos infectan enterobacterias y tienen colas largas y contráctiles. El tubo de cola está unido a la cápside y, en el otro extremo, al complejo de la placa base. Está rodeado por una vaina contráctil que facilita la punción de la envoltura celular bacteriana y la entrega del ADN viral. La interacción entre las fibras de la cola, las espigas de la cola y la espiga central de la cola, y la superficie bacteriana desencadena la contracción. Las colas contráctiles son las estructuras más complejas utilizadas para la entrega de genomas de fagos. La placa base T4 tiene fibras de cola cortas y largas (Figura 10) (Jansen et al., 2018; Nobrega et al., 2018). Cada una de toda esta maquinaria es indispensable para que estos virus puedan realizar su ciclo de replicación exitosamente.

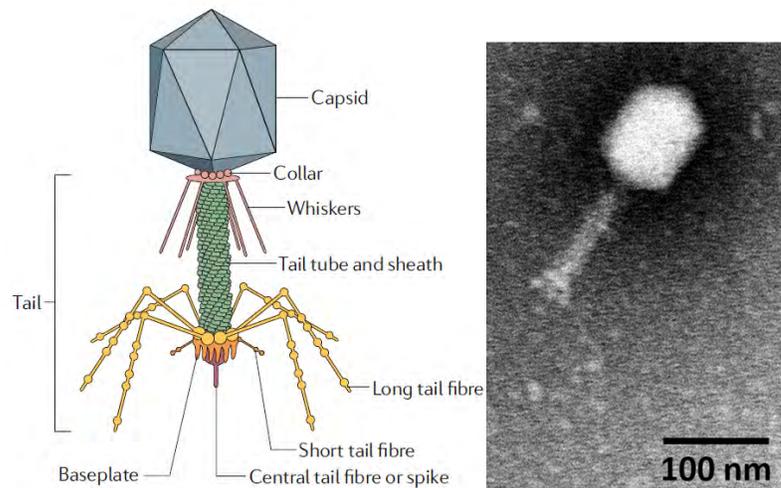


Figura 10. Estructura gráfica de un bacteriófago (izquierda) e imagen real de un fago tomado con microscopía electrónica (derecha). (Imagen tomada de Jansen et al., 2018; Nobrega et al., 2018)

2.3.4 Modo de acción

Los bacteriófagos destruyen a las bacterias por medio de la lisis de éstas. La forma de acción se clasifica en dos formas: un proceso lítico y el otro lisogénico (Barr, 2017) que se detallan a continuación:

El proceso lítico lo realizan los denominados “bacteriófagos líticos o virulentos”. Aquí, el genoma del fago se inyecta en la bacteria, donde utilizan los sistemas metabólicos del huésped alterando su metabolismo. Esto resulta en la lisis al final del ciclo por acción de lisozimas codificadas por los fagos, que permite la liberación de la progenie viral que se ha formado, los cuales pueden infectar a nuevos huéspedes y repetir el ciclo lítico (Batinovic et al., 2019; Borie et al., 2014).

Por otro lado, los “bacteriófagos lisogénicos o atemperados” utilizan la vía lisogénica, donde el genoma del fago, luego de ser inyectado en el citoplasma bacteriano, integra su material genético en el genoma del huésped o bien, forma un plásmido circular o lineal dentro del citoplasma. Una vez dentro, se replica como parte su genoma, pero no lisa inmediatamente a la bacteria, permaneciendo latente por períodos prolongados. En este punto, se le denomina

“profago” porque es lo que posteriormente originará a los fagos al momento de activarse. Si la bacteria huésped enfrenta condiciones ambientales adversas, este profago puede activarse y regresar al ciclo lítico, produciendo en consecuencia, la lisis bacteriana (Figura 11) (Batinovic et al., 2019; Borie et al., 2014).

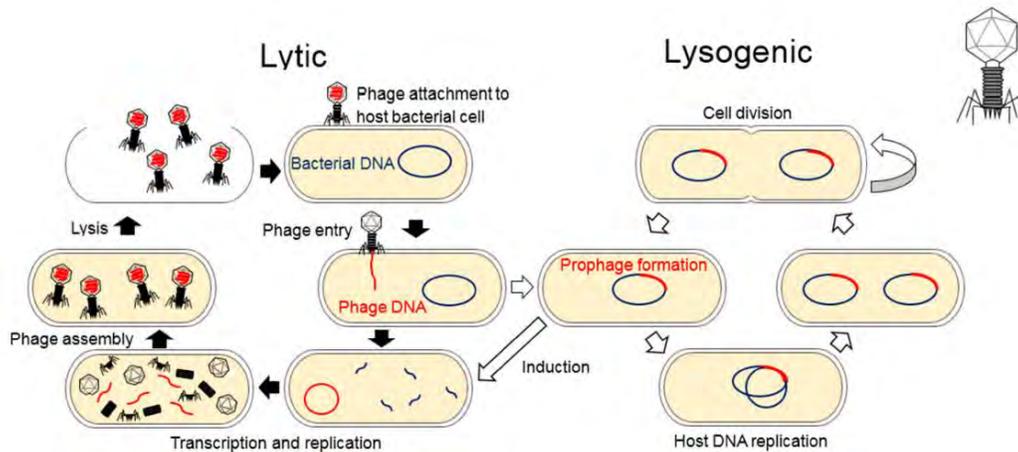


Figura 11. Ciclo de vida del bacteriófago: los fagos líticos se adhieren e infectan una célula bacteriana, lo que da como resultado la reproducción de fagos y la lisis de la célula huésped. El ciclo lisogénico da como resultado la integración de un genoma de fago en el genoma bacteriano llamado profago, el cual, bajo las condiciones de activación, podrá entrar al ciclo lítico. (Imagen tomada de Batinovic et al., 2019).

El ciclo de infección del fago sucede de la siguiente manera:

01. Reconocimiento de una bacteria adecuada para infectar. Esta etapa lo hace mediante el reconocimiento de estructuras celulares bacterianas específicas por medio de sus fibras o espículas de la cola. Las estructuras de la cola son determinantes clave de la especificidad del huésped y del proceso de infección de los respectivos fagos. Muchos fagos con cola usan proteínas de unión al receptor (RBP, por sus siglas en inglés) en el extremo distal de su cola para interactuar con los receptores en la superficie de la célula bacteriana. Para ello, el fago puede utilizar como receptor a las cápsulas bacterianas, diferentes

lipopolisacáridos, flagelos, fimbrias y algunas otras proteínas de superficie, oligosacáridos y porinas. La cola del fago es la máquina molecular que reconocen específicamente las células huésped bacterianas, penetran la envoltura celular y entregan el genoma del fago al citoplasma. Todos los fagos con cola tienen un genoma de ADN y pertenecen al orden de los *Caudovirales* (Nobrega et al., 2018; Sanz-Gaitero et al., 2019).

Cuando un fago localiza a un huésped, las seis fibras de la cola larga alternan entre conformaciones plegadas y extendidas (Figura 12a). Una fibra de cola larga extendida hace el contacto inicial con su receptor huésped específico, es decir, LPS o proteína C de membrana externa (OmpC) (Figura 12b). Esto es seguido inmediatamente por el contacto de una segunda fibra de cola larga antes de que la primera se haya dissociado. La repetición de este proceso utilizando diferentes fibras de cola larga extendidas transitoriamente permite que el fago se mueva y encuentre un sitio óptimo para la adsorción irreversible y la eyección del genoma (Figura 12c). La unión reversible es el primer paso que determina el rango de host de T4. Cuando dos o tres de las seis fibras de cola larga se unen a sus receptores, se transmite una señal a la placa base y cambia de conformación, lo que permite que algunas fibras de cola corta se unan irreversiblemente a su receptor, es decir, la región central externa de LPS. Después de un mayor cambio conformacional y expansión de la placa base, las fibras restantes de la cola corta se unen y orientan el virión para la eyección de ADN (Figura 12d). La contracción de la vaina (Figura 12e) es un proceso rápido que empuja el tubo de la cola a través de la membrana externa bacteriana (Figura 12f). El ensamblaje de la cola y la cápside se trasladan y giran alrededor del eje del tubo de la cola. La combinación de traslación y rotación permite que la punta del tubo de cola atraviese de manera efectiva la membrana huésped para posteriormente inyectar el material genético (Nobrega et al., 2018).

2. Transferencia del material genómico al huésped. El fago inyecta el genoma en la bacteria huésped, esto es facilitado por una enzima presente en la punta de la cola del fago que degrada el peptidoglicano. Esta introducción del genoma viral

depende de la energía, obtenida del ATP disponible o del potencial de membrana de la bacteria (Borie et al., 2014).

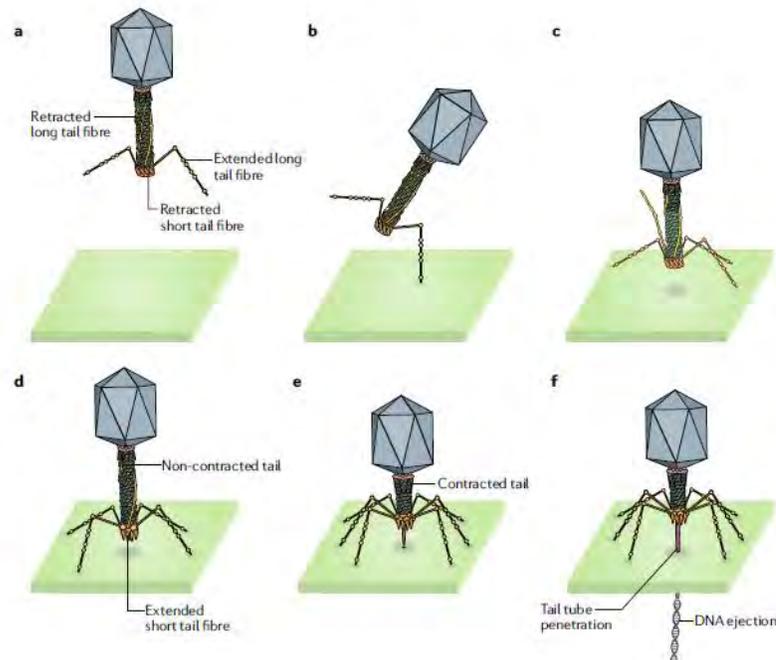


Figura 12. Modelo de adsorción del fago T4 a la superficie del huésped. (Imagen tomada de Nobrega et al., 2018)

03. Subversión de la maquinaria metabólica del huésped para producir nuevas partículas de fagos. Esto sucede primero con la expresión génica temprana en fagos y síntesis de proteínas tempranas. Que están implicadas en la intervención de los sistemas enzimáticos bacterianos y la replicación del genoma viral. Posteriormente, se da la replicación del genoma del fago. Luego, la expresión de proteínas de fagos tardíos, que están implicadas en la formación de nuevas partículas virales, la formación de la cápside viral y la lisis de la bacteria huésped. Y, por último, el ensamblaje de cabezas y colas de fagos, y compactación del genoma viral (Borie et al., 2014; Sanz-Gaitero et al., 2019).

Algunos fagos tienen la capacidad de “decidir” si causar lisis o lisogenia. La comunicación de este mecanismo está mediada por la producción y secreción de un hexapéptido (AimP) durante el ciclo lítico. Una vez internalizado, AimP reduce

la expresión del regulador negativo de la lisogenia, AimX, al unirse al factor de transcripción, AimR, promoviendo la lisogenia. AimR presenta plasticidad intrínseca y comparte características estructurales con la familia de detección de quórum RRNPP. AimR se une a un operador inusual con un espaciador largo que interactúa de manera no específica con el dominio TPR del receptor, mientras que el dominio HTH reconoce canónicamente dos repeticiones invertidas. AimP estabiliza una conformación compacta de AimR que se aproxima a las hélices de reconocimiento de ADN, evitando que AimR se una a la región promotora de *aimX* (Figura 13) (Gallego del Sol et al., 2019).

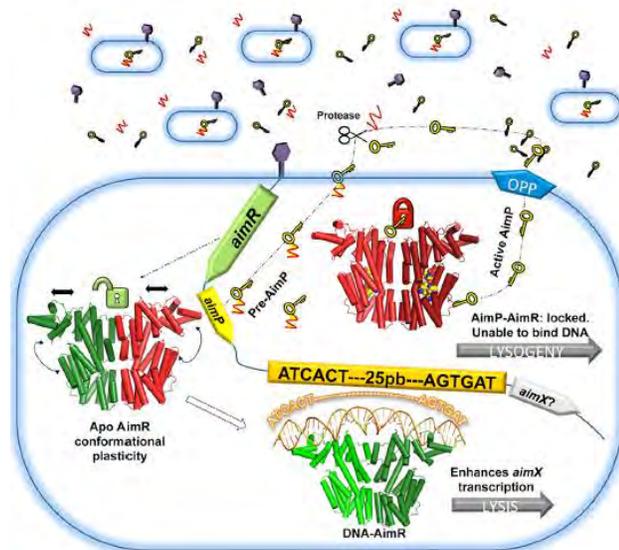


Figura 13. Mecanismos de comunicación dentro de la bacteria huésped infectada por fagos. (Imagen tomada de Gallego et al., 2019)

04. Lisis de la célula huésped y liberación de nueva progenie de fagos. Los bacteriófagos han desarrollado diversos mecanismos de lisis para liberar progenie de fagos de células huésped infectadas. La lisis de células bacterianas inducida por fagos se basa en el desequilibrio osmótico causado por la degradación de la pared celular después de una acción coordinada de proteínas líticas codificadas por bacteriófagos. Las principales proteínas líticas pertenecen a tres clases funcionales: endolisinas, holinas y espaninas, que a menudo están

codificadas por genes organizados en un grupo de genes, conocido como casete de lisis. La endolisina y la holina degradan la pared celular y la membrana plasmática respectivamente, la destrucción ocurre debido a la incapacidad estructural para resistir la presión osmótica interna. (Borie et al., 2014; Sanz-Gaitero et al., 2019). Las holinas son proteínas transmembrana que se acumulan inofensivamente en el citoplasma hasta desencadenar la formación de agujeros en la membrana citoplasmática, a través de estos poros pasará la endolisina y actuará degradando el peptidoglicano. Esto desencadenará el aumento de la presión osmótica en el interior del citoplasma y la bacteria explotará (Figura 14). Esta ruptura de la pared celular y las membranas permite la liberación de la progenie viral previamente formada, lo que permite una infección posterior de otras bacterias (Gutiérrez-Fernández, D., Fernández-Llamas, L., Rodríguez-González, A., & García-Suárez, 2020; Zampara et al., 2020).

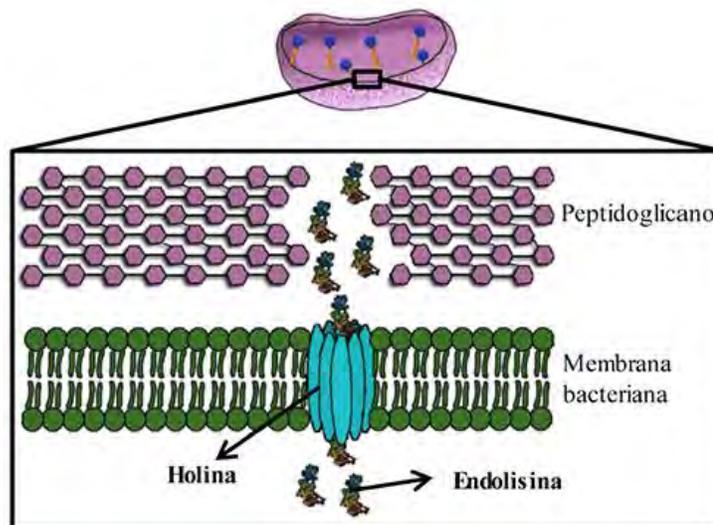


Figura 14. Representación esquemática del sistema holina / endolisina encargado de la lisis desde dentro de una bacteria. (Imagen tomada de (Gutiérrez-Fernández et al., 2020).

2.3.5 Los bacteriófagos, ¿están vivos?

La respuesta a sí los virus y en este caso, los bacteriófagos, están vivos o no, ha sido un tema de discusión durante muchos años. Para responder a ello, es

necesario conocer que es un organismo vivo. El término "organismo vivo" se usa generalmente para describir algo que muestra todas las características de los seres vivos. Y esas características, según el Dr Kadhila (2009) de la universidad de Cambridge son:

1. Nutrición. Los seres vivos toman materiales de su entorno que utilizan para crecer o para proporcionar energía.
2. Respiración. La respiración es la liberación de energía de las sustancias alimenticias en todas las células vivas.
3. Movimiento. Todos los seres vivos se mueven.
4. Excreción. Tienen que deshacerse de materiales tóxicos, los productos de desecho del metabolismo y las sustancias en exceso.
5. Crecimiento. Es aumento en el número y/o tamaño de las células.
6. Reproducción. Tienen la capacidad de producir descendencia.
7. Sensibilidad. son capaces de sentir y responder a los estímulos que los rodean, como la luz, la temperatura, el agua, la gravedad y las sustancias químicas.

Basado en lo anterior y en un sentido estricto de la biología, los virus no están vivos, puesto que no cumplen con todas las características mencionadas. Sin embargo, sí muestran comportamientos similares. Tradicionalmente, se ha considerado que los virus, se encuentran en el límite entre lo vivo y lo no vivo porque incluso la comunidad científica aún no se pone de acuerdo.

En el caso de los fagos se ha definido como "elementos genéticos semiautónomos que en algún momento de su ciclo de vida existen como genomas encapsidados, particularmente cápsides infecciosas que no se encuentran dentro de los límites de las células huésped" (Hobbs & Abedon, 2016). El concepto de no vivo, puede aceptarse cuando los virus no están en su célula huésped. Pero algunos autores han propuesto que durante la etapa

intracelular de su ciclo de reproducción pueden considerarse como "vivos" (Jean-Michel, 2006). Entonces, ¿cómo manejar este concepto?

El Dr. Forterre (2017) ha propuesto el concepto de "virocell" que implica la transformación de todo o parte del huésped infectado en un "organismo vivo" viral. En la virocell, el virus expresa su propio metabolismo y autonomía ya que el "objetivo" de la célula infectada ya no es dar dos células hijas sino producir tantos viriones como sea posible para permitir la reproducción y multiplicación de la información viral. El concepto virocell termina por considerar a los virus como organismos celulares durante parte de su ciclo de reproducción. Al ser organismos, pueden ser parásitos estrictos, pero también vivir en simbiosis con la célula infectada.

Desde un punto de vista personal, creo que el concepto de vida debe rebatirse desde un sentido filosófico y biológico. Ya que, si decimos que un virus no está vivo, entonces, ¿está muerto? Porque incluso en la propia definición de entidad biológica, que es el término que a veces se les da, es confuso al mencionar que tiene características de reproducción propias de organismos vivos. Dado a lo anterior, es complicado darle una definición precisa sobre que es un virus. Incluso en investigaciones especializadas, el tema como "Understanding Viruses: Philosophical Investigations" de Pradeu et al., (2016) no se llega a una conclusión válida. Es necesario reunir a la comunidad científica y hacer una concluir sobre su estado biológico.

2.3.6 Beneficios

Mencionar las ventajas de los bacteriófagos es hablar sobre la efectividad de estos respecto a los antibióticos. Y si se habla de ello, entonces los fagos tienen más ventajas puesto que en teoría no existe alguna bacteria que no pueda ser lisada. Los fagos están más capacitados para matar bacterias; han estado aquí durante miles de años, a diferencia de los antibióticos. Esa efectividad en la forma de lisar bacterias ha hecho que sean muy específicas, y esa es una de sus ventajas. Aunque esto puede sonar como algo negativo, no es así, ya que evita

los problemas más importantes relacionados con la administración de antibióticos: la alteración de la microbiota intestinal (debido a la eliminación de bacterias potencialmente beneficiosas) y el crecimiento excesivo de patógenos secundarios, además de la aparición de bacterias resistentes (Ul-Haq et al., 2012). Esto se ha demostrado en diversos estudios, por ejemplo, Sarker et al. (2012), administraron durante dos días un coctel oral de nueve fagos de *E. coli* tipo T4 a 15 adultos sanos. Después de un lavado de cinco días, a pesar de que los fagos se pudieron detectar en las heces de casi todos los sujetos tratados, no se evidenció ninguna modificación de la composición de la microbiota intestinal. Hay seguridad en no alterar la microbiota, lo cual es fundamental para controlar bacterias oportunistas del tracto digestivo.

La seguridad que brindan es otra de sus ventajas, y no solo al no destruir otras bacterias potencialmente benéficas, sino también al lisar solo a microorganismos procariotas, las células eucariotas como el de cualquier mamífero, queda intacta; no hay daños a tejidos del huésped (Nobrega et al., 2018). Recientemente se han estudiado otros beneficios como la influencia que tienen para mantener activo el sistema inmune del huésped. Ya se sabe que los fagos influyen en la inmunidad indirectamente a través de los efectos en el microbioma de los mamíferos. Sin embargo, ha quedado claro que los fagos también tienen un impacto directo en la inmunidad, en formas que suelen ser antiinflamatorias. Los fagos pueden modular la inmunidad innata a través de la fagocitosis y las respuestas de citoquinas, pero también pueden afectar la inmunidad adaptativa a través de los efectos sobre la producción de anticuerpos y la polarización de los efectores. Por lo tanto, los fagos pueden tener efectos profundos sobre el resultado de las infecciones bacterianas mediante la modulación de la respuesta inmunitaria (Van Belleghem et al., 2019).

Siendo los fagos tan seguros, pudiera administrarse durante varios días. Sin embargo, no es necesario, y esta es otra de sus ventajas ante los antibióticos, porque pueden permanecer en el cuerpo humano por períodos de tiempo relativamente prolongados, y mientras haya bacterias que lisar, se seguirán

replicando. En general, se necesitan muy pocas dosis debido al aumento en la concentración de bacteriófagos en el sitio de infección después de la administración inicial (Principi et al., 2019). Por último, en un futuro cercano, el uso de fagos podría ser menos costoso que el de los antibióticos, cuyos fármacos de última generación son cada vez más caros contrario a los fagos que, gracias a los avances en investigación, sus costos van disminuyendo. Estas solo son algunas de sus ventajas. Como se ha descrito, los bacteriófagos son una muy buena alternativa para afrontar esta crisis de resistencia antimicrobiana que permite tratar enfermedades que afectan a las beceras lactantes.

2.4 Eficientar la ganancia de peso: Implicaciones de la monensina sódica

Un animal con un esquema de vacunación eficiente, sin ningún tipo de estrés y una óptima alimentación alcanzará los estándares de ganancia diaria de peso, peso final y altura al destete. Cuando el rumen del bovino ya es funcional, pueden utilizarse sustancias como la monensina sódica, la cual, ha demostrado su efectividad en la ganancia de peso (Łowicki & Huczyński, 2013).

La monensina sódica forma parte de un grupo de ionóforos derivados a partir de metabolitos de *Streptomyces cinnamonensis*. Los ionóforos forman un complejo con los cationes y los transportan a través de la bicapa fosfolipídica. La monensina sódica, tiene propiedades antibacterianas que provoca un cambio en el potencial de hidrógeno y el balance del sodio / potasio dentro de la célula, lo que conlleva a un desbalance crítico en los procesos celulares, resultando en la muerte celular (Łowicki & Huczyński, 2013; Zachary, 2022). La actividad antimicrobiana de esta sustancia se ha observado principalmente contra bacterias Gram positivas de los géneros *Micrococcus*, *Bacillus*, y *Staphylococcus*. Esta afinidad a las bacterias Gram positivas, está relacionada con la estructura de su pared bacteriana, ya que, las bacterias Gram negativas, tienen una pared más compleja que, incluso, no permite la entrada de antibióticos formados de grandes moléculas (Huczynski et al., 2008).

Los ionóforos son muy útiles y han sido utilizados para tratar problemas de pH ruminal, así como mejorar la conversión alimenticia de los bovinos. Sin embargo, pese a estos beneficios, existe el inconveniente que los bovinos son muy susceptibles a sufrir intoxicaciones por el uso de esta sustancia. Fuera de los límites terapéuticos, la farmacodinamia de esta sustancia comienza a llevarse a cabo en las células somáticas del animal moviendo cationes monovalentes (calcio y sodio) a través de la pared celular a cambio de iones de potasio e hidrógeno (Ensley, 2020; Łowicki & Huczyński, 2013). La unión a estos iones causa la pérdida de potasio intracelular, lo que resulta en la inhibición de la producción de ATP en las mitocondrias, alterando así, uno de los puntos de “no retorno de la célula” y como resultado, la célula muere. La muerte celular se evidencia con mayor claridad en tejidos del corazón, provocando alteración de otros órganos (Aleman et al., 2007; Zachary, 2022).

Las intoxicaciones por ionóforos no son exclusivas de bovinos; también se han reportado en búfalos (Rozza et al., 2006), cabras (Deljou et al., 2014), borregos (Ashrafihelan et al., 2014) cerdos y aves (de Carvalho et al., 2021; Roder, 2011). Pero los bovinos son altamente susceptibles y la intoxicación se ha reportado en diferentes lugares (Andrade et al., 2020; Espinosa et al., 2022; Omidí et al., 2008). Estos eventos podrían explicarse, por un lado, por la dinámica en sí de la monensina al interactuar con la célula somática del animal, y, por otro lado, porque el manejo en masa de estos animales lo expone a cometer errores en su formulación, mezclado y administración, específicamente en sistemas de producción intensiva (Espinosa et al., 2022).

III. ARTÍCULOS



<http://revistabiociencias.uan.edu.mx>

ISSN 2007-3380

<https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1363>



Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Intoxicación accidental por monensina sódica en un hato lechero al norte de México

Accidental monensin sodium poisoning in a dairy herd in northern Mexico

Authors/Autores: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Gaytán L., Véliz F.G., Morán J., Delgado R.A.

ID: e1363

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1363>

Received/Fecha de recepción: May 24th 2022

Accepted /Fecha de aceptación: September 29th 2022

Available online/Fecha de publicación: October 20th 2022

Please cite this article as/Como citar este artículo: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Gaytán L., Véliz F.G., Morán J., Delgado R.A. (2022). Accidental monensin sodium poisoning in a dairy herd in northern Mexico. *Revista Bio Ciencias*, 9 e1363. <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1363>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de *Revista Bio Ciencias* para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.



Intoxicación accidental por monensina sódica en un hato lechero al norte de México Accidental monensin sodium poisoning in a dairy herd in northern Mexico

Intoxicación de becerros/calf poisoning

Espinosa L.N.¹ , Carrillo D.I.¹ , Gaytán L.¹ , Véliz F.G.¹ ,
Morán J.² , Delgado R.A.¹ *

¹Posgrado en Producción Agropecuaria, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, periférico y carretera a Santa Fe, Valle Verde, 27054, Torreón, Coahuila, México.

²Departamento de Biología Celular y Ultra estructura, Universidad Autónoma de Coahuila, Centro 27000, Torreón, Coahuila, México.

*Corresponding Author:

[Ramón Alfredo Delgado-González](mailto:ramon.alfredo.delgado-gonzalez@uan.mx), Posgrado en Producción Agropecuaria, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, periférico y carretera a Santa Fe, Valle Verde, 27054, Torreón, Coahuila, México. Teléfono (871) 1079275. E-mail: raldego@gmail.com

RESUMEN

La monensina sódica se utiliza en bovinos para aumentar la eficiencia alimenticia. Sin embargo, es fácil que se produzcan intoxicaciones por sobredosificación. El objetivo de este trabajo es informar sobre un caso de intoxicación accidental por monensina sódica en un sistema de producción láctea intensiva del norte de México. En este reporte, 306 animales Holstein-Friesian de cinco meses de edad fueron alimentados accidentalmente con una ración que contenía una alta concentración de monensina sódica. Estos animales presentaron signos de diarrea, depresión, anorexia, ataxia, disnea, sialorrea, taquicardia, distensión yugular, atonía ruminal, edema y deshidratación. En el análisis bioquímico se encontró alta actividad sérica de creatinfosfoquinasa. De los animales intoxicados, murieron 82 (26.79 % de mortalidad). Se practicaron nueve necropsias donde encontraron miopatía degenerativa con áreas blanquecinas multifocales en corazón, hidrotórax, hidropericardio, congestión y edema pulmonar. La evaluación histopatológica reveló que el 100 % presentó algún tipo de miocarditis supurativa, o no supurativa, con degeneración de fibras miocárdicas. En hígado se encontró hepatitis supurativa y necrótica. Otros hallazgos importantes fueron, bronconeumonía fibrinosa, supurativa o fibrinopurulenta con pleuritis fibrinosa y vasculitis necrótica. El 55.55 % mostró arteritis fibrinoide y 55.55 % congestión y edema pulmonar. Se suspendió la dieta y se trataron los signos; no se registraron más muertes. Con base en estos hallazgos se concluyó con la presentación de un caso de intoxicación por monensina sódica en becerros.



PALABRAS CLAVE: Becerras, envenenamiento, Holstein-Friesian, ionóforos.

ABSTRACT

Monensin sodium is used in cattle to increase feed efficiency. However, intoxications due to overdosage are frequent. This study aimed to report a case of accidental monensin sodium poisoning in an intensive dairy production system in northern Mexico. For the present analysis, 306 five-month-old Holstein-Friesian animals were accidentally fed with a ration containing a high concentration of monensin sodium. These animals manifested symptomatology of diarrhea, depression, anorexia, ataxia, dyspnea, sialorrhea, tachycardia, jugular distension, ruminal atony, edema, and dehydration. In the biochemical analysis, high serum creatine phosphokinase activity was found. Of the intoxicated animals, 82 died (26.79 % mortality). Nine necropsies were performed showing degenerative myopathy with multifocal whitish areas in the heart, hydrothorax, hydropericardium, congestion, and pulmonary edema were found. Histopathological evaluation revealed that 100% presented some type of suppurative or non-suppurative myocarditis, with degeneration of myocardial fibers. Suppurative and necrotic hepatitis was found in the liver. Other important findings were fibrinous, suppurative, or fibrinopurulent bronchopneumonia with fibrinous pleuritis and necrotic vasculitis. 55.55 % showed fibrinoid arteritis and 55.55 % pulmonary congestion and edema. The diet was discontinued and the signs were treated; no further deaths were recorded. Based on such findings, the present study ends with the presentation of a case of monensin sodium poisoning in calves.

KEY WORDS: Calves, poisoning, Holstein-Friesian, ionophores.

Introducción

La monensina sódica es un componente producido por especies de *Streptomyces cinnamonensis*. En bovinos, se utiliza para aumentar la eficiencia alimenticia y la producción de leche, esto sucede gracias a que altera la microflora ruminal; lo que controla coccidias; mejora la eficiencia de bacterias que intervienen en la producción de energía y grasas en leche; disminuye la cetosis; previene la acidosis y problemas pulmonares (Novilla, 2018; Pereira *et al.*, 2019; Roder, 2011), además, reduce el consumo de alimento y la producción de metano sin afectar el desempeño de los bovinos (Tedeschi *et al.*, 2003).

Su uso en dosis terapéuticas no produce efectos adversos; sin embargo, es fácil que se produzca intoxicación accidental al mezclar los ingredientes, ingerir pre mezclas o productos concentrados alterados, por consumo fortuito por otra especie o por la ingestión de desechos de aves (Roder, 2011) e incluso potenciar la intoxicación de otros metales como el cobre (Lopes *et al.*, 2022).

En la célula animal, este ionóforo, mueve cationes monovalentes como el calcio y el sodio a través de la pared celular a cambio de iones de potasio e hidrógeno (Ensley, 2020; Łowicki & Huczynski, 2013). La unión a estos iones puede causar la pérdida de potasio intracelular, lo que resulta en la inhibición de la producción de ATP en las mitocondrias, y como resultado, se disminuye la producción de energía que conlleva



a la muerte de la célula. Esta muerte celular, provoca daño a diferentes tejidos, entre ellos el cardíaco, que, a su vez, afecta a otros órganos (Aleman *et al.*, 2007; Zachary, 2022).

Se han reportado diversas intoxicaciones en especies productivas como bovinos (Andrade *et al.*, 2020; Omid *et al.*, 2008), búfalos (Rozza *et al.*, 2006), cabras (Deljou *et al.*, 2014), borregos (Ashrafihelan *et al.*, 2014) cerdos y aves (de Carvalho *et al.*, 2021; Roder, 2011). Pero en México, en los sistemas intensivos de producción lechera no se ha descrito. El objetivo de este trabajo es informar sobre un caso de intoxicación accidental por monensina sódica en un sistema de producción láctea intensiva del norte de México.

Material y Métodos

En este reporte, se describe un caso remitido al Laboratorio de Análisis Clínicos y Patología Veterinaria de La Laguna S.C. en colaboración con el laboratorio de la Unidad de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Los eventos ocurrieron en agosto de 2021 en un hato lechero de La Comarca Lagunera al norte de México. 306 animales hembras de la raza Holstein-Friesian de cinco meses de edad procedentes de la misma granja, fueron alimentados accidentalmente con una ración que contenía una alta concentración de monensina sódica. La ración consistió en una mezcla de heno de alfalfa, un alimento sólido balanceado comercial mezclado con una cantidad errónea de monensina sódica de 16 mg/Kg que se incluía para mejorar la conversión alimenticia y como coccidiostato.

Los animales afectados presentaban diferentes signos como: diarrea, depresión, anorexia, ataxia, disnea, sialorrea, taquicardia, distensión yugular, atonía ruminal, edema y deshidratación. Se tomaron muestras sanguíneas para medición sérica de creatinfosfoquinasa (CPK) en un analizador automatizado de química clínica (H-100, HLAB®). De los animales que murieron, a nueve se les practicó necropsia y se tomaron muestras para la evaluación histopatológica de corazón, pulmón e hígado.

Una vez diagnosticado la intoxicación, se suspendió el suministro de la dieta y dado a que no hay un antídoto para este tipo de envenenamiento (González *et al.*, 2005) se administró vitamina E y selenio como antioxidantes y protectores de membrana, además de un protector hepático a base de complejo B. Se cambió la dieta y el número de muertes fue disminuyendo hasta llegar a cero.

Resultados y Discusión

La adición de ionóforos en la dieta de los bovinos es una práctica común. Gracias a sus múltiples beneficios es un elemento indispensable en las explotaciones ganaderas (Novilla, 2018). Sin embargo, cuando hay un aumento en la concentración, no solo las células procariotas se afectan sino también las células eucariotas del animal, resultando en daños severos. A diferencia de los equinos (Aleman *et al.*, 2007), los bovinos son menos susceptibles a los efectos adversos de los ionóforos. Pero este margen de seguridad se reduce si aumenta la concentración (Ensley, 2020). Hasta donde se sabe este es el primer reporte del norte de México de intoxicación por monensina sódica en bovinos de la raza Holstein-Friesian.



En este trabajo, de los 306 animales que estuvieron expuestos a la monensina sódica, 82 murieron en 30 días (26.79 % de mortalidad). La dosis ofrecida fue mayor a la recomendada por vía oral (1 mg/Kg). En bovinos, la LD50 es de 50 – 80 mg/Kg (Zachary, 2022) aunque algunos autores consideran esta letalidad desde los 26 mg/Kg (Łowicki & Huczyński, 2013). Por la dosis ofrecida y el porcentaje de mortalidad, estos resultados coinciden con la letalidad de Łowicki & Huczyński (2013). El porcentaje de mortalidad depende de la dosis ingerida; se han reportado hasta el 100 % con dosis muy altas (22 388 mg/kg) (Ashrafihelan *et al.*, 2014). De igual manera, los signos que se manifiestan están determinados en gran medida a la dosis. Aunque, siempre que se reporta mortalidad la mayoría de los signos coincide. En este trabajo se presentaron signos como diarrea, depresión, anorexia, ataxia, disnea, sialorrea, taquicardia, atonía ruminal, edema y deshidratación. Mismos que se han observado en otros estudios de intoxicación (Andrade *et al.*, 2020; Ashrafihelan *et al.*, 2014; García *et al.*, 2020; Omid *et al.*, 2008). La mayoría de estos signos son consecuencia de la alteración que se lleva a cabo en tejidos con alta actividad energética como el músculo, principalmente el cardíaco y esquelético, así como tejido nervioso ocasionando falla mitocondrial y agotamiento del trifosfato de adenosina (ATP) celular (Ashrafihelan *et al.*, 2014; Litwak *et al.*, 2005; Omid *et al.*, 2008).

En un caso como este, los análisis bioquímicos resultan de gran ayuda para determinar el daño celular y su monitoreo. Aquí, la media del análisis bioquímico de CPK fue 2913.6 ± 2402.29 (SD). Estos resultados varían dependiendo de la severidad de la lesión. Cuando los niveles de CPK son de 1639.8 ± 2797.31 (SD) se han reportado menos mortalidad a diferencia de grandes concentraciones, como 30115 ± 1703 (SD), donde la mortalidad ha sido mayor (Andrade *et al.*, 2020). Este biomarcador, al igual que la troponina cardíaca I, es un apoyo importante para indicar necrosis cardíaca o gravedad de daño al miocardio que puede usarse para evaluar la progresión o recuperación del daño muscular (Andrade *et al.*, 2020; Gonzalez *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2009)

En las necropsias realizadas, los principales hallazgos macroscópicos fueron miopatía degenerativa con áreas blanquecinas multifocales en corazón (figura 1), hidrotórax (Figura 2), hidropericardio, congestión y edema pulmonar, estas alteraciones se reportan como consecuencia de la falla cardíaca. Lesiones similares se han encontrado en otros reportes de intoxicación por ionóforos (Andrade *et al.*, 2020; Bence *et al.*, 2018; De La Cruz-Hernández *et al.*, 2012; Rozza *et al.*, 2006). De los órganos más importantes, se tomaron muestras para su evaluación histológica, lo cual reveló que las principales lesiones se encontraron en corazón, pulmón e hígado. De las becerras que se les practicó necropsia, el 100 % presentó miocarditis supurativa o no supurativa con degeneración de fibras miocárdicas (Figura 3). En hígado se encontró hepatitis supurativa y necrótica. El 100 % presentó algún tipo de bronconeumonía fibrinosa, supurativa o fibrinopurulenta con pleuritis fibrinosa y vasculitis necrótica. El 55.55% mostró arteritis fibrinoide y 55.55 % congestión y edema pulmonar. El tejido cardíaco es uno de los órganos más afectados por su alta actividad cinética, y el hígado se afecta debido la congestión y a que en este órgano se lleva a cabo el metabolismo de los ionóforos. Las alteraciones al corazón e hígado ya se han reportado previamente con lesiones similares (Andrade *et al.*, 2020; Bence *et al.*, 2018; De La Cruz-Hernández *et al.*, 2012; Omid *et al.*, 2008). Sin embargo, el daño al pulmón es atípico en este tipo de intoxicaciones. La mayor posibilidad es que sea un evento aislado porque estas lesiones no se han reportado con anterioridad. La ausencia previa de infecciones respiratorias en los animales expuestos y el hallazgo

de alteraciones pulmonares en todas las becerras estudiadas, sugiere que pudiera estar relacionado con la intoxicación, probablemente por síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Pero, dado la ausencia de un grupo control, no podemos concluir totalmente con este descubrimiento. Se sugiere hacer énfasis en el daño al tejido pulmonar en los reportes que surjan en el futuro.



Figure 1. Degenerative myopathy with muscle pallor (arrow) is observed in a calf heart intoxicated with monensin sodium.

Figura 1. Se observa miopatía degenerativa con palidez muscular (flecha) en un corazón de becerro intoxicado con monensina sódica.



Figure 2. Hydrothorax due to congestive heart failure in calves intoxicated by monensin sodium.

Figura 2. Hidrotórax debido a insuficiencia cardíaca congestiva en becerros intoxicados por monensina sódica.

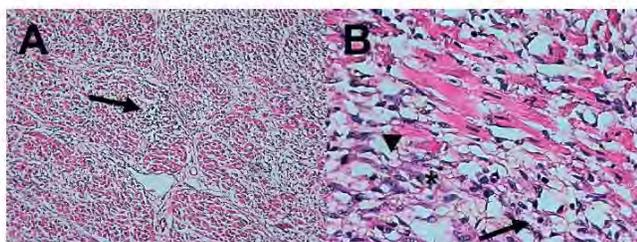


Figure 3. Histology of a calf heart intoxicated with monensin sodium. A. Cellular arrangement of myofibers is disrupted by inflammatory cells (arrow). B. Inflammatory cells (arrow), fibrosis (asterisk), fragmented cardiomyocytes, necrosis, and loss of transverse striae (arrowhead) are observed.

Figura 3. Histología de un corazón de becerro intoxicado con monensina sódica. A. El arreglo celular de las miofibras es interrumpido por células inflamatorias (flecha). B. Se observan células inflamatorias (flecha), fibrosis (asterisco), cardiomiocitos fragmentados, necrosis y pérdida de estrias transversales (cabeza de flecha).

Conclusiones

Con base en los hallazgos clínicos, bioquímicos, diagnósticos morfológicos e histopatológicos, se concluye que se trata de un caso de intoxicación por monensina sódica en becerros. Es relevante notar que desde su descubrimiento se han informado casos de toxicosis, y aun se continúan reportando, lo cual evidencia lo fácil que resulta cometer errores que conllevan a este tipo de eventos. Se recomienda tener un minucioso cuidado al manejar este tipo de sustancias.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo: Espinosa L.N., Delgado R.A; desarrollo de la metodología: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Gaytán L., Véliz F.G., Morán J., Delgado R.A; manejo de software: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Véliz F.G.; validación experimental: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Gaytán L., Véliz F.G., Morán J., Delgado R.A; análisis de resultados: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Gaytán L., Véliz F.G., Morán J., Delgado R.A; Manejo de datos: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Gaytán L., Véliz F.G., Morán J., Delgado R.A; escritura y preparación del manuscrito: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Gaytán L., Véliz F.G., Morán J., Delgado R.A; redacción, revisión y edición: Espinosa L.N., Carrillo D.I., Gaytán L., Véliz F.G., Morán J., Delgado R.A;

"Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo"

Financiamiento

"Esta investigación no recibió financiamiento externo"



Agradecimientos

Al Laboratorio de Análisis Clínicos y Patología Veterinaria de La Laguna S.C. por su asistencia técnica.

Conflicto de interés

“Los autores declaran no tener conflicto de interés”.

Referencias

- Aleman, M., Magdesian, K. G., Peterson, T. S., & Galey, F. D. (2007). Salinomycin toxicosis in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(12), 1822–1826. <https://doi.org/10.2460/javma.230.12.1822>
- Andrade, E. S., Gottschalk, T., Sousa, C. H., & Brianezi, V. M. (2020). Outbreak of monensin poisoning in cattle due to supplementation error. *Ciência Rural*, 50(11), 1–5.
- Ashrafihelan, J., Eisapour, H., Erfani, A. M., Kalantary, A. A., Amoli, J. S., & Mozafari, M. (2014). High mortality due to accidental salinomycin intoxication in sheep. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(3), 173–176. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0024>
- Bence, A. R., García, J., Fernández, E., Morrell, E., & Cantón, G. (2018). Hallazgos clínico-patológicos compatibles con intoxicación con ionóforos en búfalos: primer reporte en Argentina. *Revista Veterinaria*, 29(2), 79. <https://doi.org/10.30972/vet.2923268>
- De Carvalho, A. Q., Wisser, C. S., Laskoski, F., Maturana, M. C., Cristani, J., & Traverso, S. D. (2021). Salinomycin intoxication in pigs associated with the use of tiamulin in the State of Santa Catarina, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(3), 1101–1110. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n3p1101>
- De La Cruz-Hernández, N. I., Argudin-Salomon, O. A., Zertuche-Rodríguez, J. L., Medellín-Ledezma, J. A., & Flores-Gutiérrez, G. H. (2012). Outbreak of sodium monensin intoxication in feedlot cattle from Mexico. *Revue de Médecine Veterinaire*, 163(2), 60–63. https://www.researchgate.net/publication/287729477_Case_report_Outbreak_of_sodium_monensin_intoxication_in_feedlot_cattle_from_Mexico
- Deljou, M., Aslani, M. R., Mohri, M., Movassaghi, A. R., & Heidarpour, M. (2014). Clinical, laboratory and pathological findings in sub-acute monensin intoxication in goats. *Veterinary Research Forum*, 5(3), 161–167. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4279640/pdf/vrf-5-161.pdf>
- Ensley, S. (2020). Ionophore Use and Toxicosis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 36(3), 641–652. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.07.001>
- García, E. N., Pistán, M. E., Lértora, W. J., Mastrantonio, G. E., & Cholic, L. A. (2020). Monensin poisoning in buffalo feedlot from Argentina. *Revista Veterinaria*, 31(1), 38–41. <https://doi.org/10.30972/vet.3114616>
- Gonzalez, M., Barkema, H. W., & Keefe, G. P. (2005). Monensin toxicosis in a dairy herd. *Canadian Veterinary Journal*, 46(10), 910–912.



- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255593/>
- Litwak, K. N., McMahan, A., Lott, K. A., Lott, L. E., & Koenig, S. C. (2005). Monensin toxicosis in the domestic bovine calf: A large animal model of cardiac dysfunction. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 44(3), 45–49. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15934724/>
- Lopes, F., dos Santos, R., Hamad, A., Costa de Oliveira, F., Freitas de Sousa, I., Sato, C., Satsuki, C., Coutinho, A., Barrêto, R., & Lippi, E. (2022). Effects of Sodium Monensin on Copper Metabolism of Brazilian Santa Inês Sheep Submitted to Different Dietary Copper. *Biological trace element research*, 1, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03132-7>
- Łowicki, D., & Huczyński, A. (2013). Structure and antimicrobial properties of monensin a and its derivatives: Summary of the achievements. *BioMed Research International*, 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/742149>
- Nogueira, V. A., Nascimento, T., & Vargas, P. (2009). Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(3), 191–197. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000300001>
- Novilla, M. N. (2018). Ionophores. In Novilla, M. N. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles Third Edit.* (pp. 1073–1092). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00078-7>
- Omid, A., Aslani, M. R., Movassaghi, A. R., Mohri, M., & Dadfar, M. (2008). Case Report Rapport de cas Accidental salinomycin intoxication in calves. *Canadian Veterinary Journal*, 51, 1143–1145. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2942056/>
- Pereira, M. C. S., Rigueiro, A. L. N., de Oliveira, C. A., de Soutello, R. V. G., Arrigoni, M. de B., & Millen, D. D. (2019). Different doses of sodium monensin on feedlot performance, carcass characteristics and digestibility of Nelore cattle. *Acta Scientiarum - Technology*, 41, 1–6. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v41i1.34988>
- Roder, J. D. (2011). Ionophore Toxicity and Tolerance. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27(2), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.02.012>
- Rozza, D. B., Vervuert, I., Kamphues, J., Da Cruz, C. E. F., & Driemeier, D. (2006). Monensin toxicosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(5), 494–496. <https://doi.org/10.1177/104063870601800515>
- Tedeschi, L., Fox, D., & TP, T. (2003). Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. *Journal of environmental quality*, 32, 1591–1602. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.1591>
- Zachary, J. (2022). *Pathologic basis of veterinary disease* (Seventh ed). Elsevier.

Livestock Science

Effect of the Administration of Bacteriophages to Calves Infected with *Cryptosporidium* spp. on the Health Status, Nutrition, and Survival Rate

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Behaviour, Health and Welfare
Keywords:	bacterial resistance; bovine; diarrhea; parasite; phage
Corresponding Author:	Dalia Ivette Carrillo Moreno, PhD Antonio Narro Agrarian Autonomous University Unit Laguna MEXICO
First Author:	Levi Norberto Espinosa García, PhD
Order of Authors:	Levi Norberto Espinosa García, PhD Ramón Delgado Leticia Gaytán, PhD Francisco Véiz, PhD Javier Morán, PhD Lee Jung-Jin, PhD Dalia Ivette Carrillo Moreno, PhD
Abstract:	<p><i>Cryptosporidium</i> spp., together with enteropathogenic bacteria, induces diarrhea, which could cause death to the calf. The treatment includes antibiotics, however, in recent years bacterial resistance has required the search for other alternatives. The objective of this work was to evaluate the use of bacteriophages in calves infected with <i>Cryptosporidium</i> spp. on their state of health, nutritional aspect, and survival rate. A farm with calves infected with this protozoan was selected. For its control, decoquinatate (2.5 mg/Kg) was used. They were used 72 pre-weaned calves, divided into two groups. The treated group (n= 36) received 5 g of bacteriophages by mouth; the control group did not receive bacteriophages. The treated group had a higher survival rate (100 vs 86.11%, p= 0.05). The total number of days with diarrhea was lower for the treated group (4.69 ± 2.29 vs 13 ± 4.88 d, p= 0.04) and the range of appearance was wider. The diarrheas appeared earlier in the control group (13 vs 18 d, p= 0.03). The treated group obtained a lower probability of receiving antibiotics treatment (OR = 0.05). Similarly, better results were obtained in the daily weight gain (0.634 ± 0.01 vs 0.562 ± 0.02 kg, p= 0.03), weight (77.35 ± 1.47 vs 71.38 ± 1.62 kg, p= 0.01), and height (92.21 ± 0.8 vs 89.2 ± 0.59 cm, p= 0.009). The treated group reported the highest value of leukocytes on day 10 and the lowest on day 5 (p= 0.04). The supplementation with bacteriophages to calves infected with <i>Cryptosporidium</i> spp. improves the survival rate, the days of diarrhea decrease, and the appearance of diarrhea is delayed. Additionally, the use of antibiotics is reduced. While improving the health of calves, it is also improved their nutritional state.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Alex Solís Corrales, PhD University of Panama alex.solis@up.ac.pa He works with cattle and is a data analyst</p> <p>Homero Salinas González, PhD National Institute of Forestry Agriculture and Livestock Research salinas.homero@inifap.gob.mx He works with ruminants, is a data analyst and an objective person when analyzing articles</p>

Highlights

Effect of the Administration of Bacteriophages to Calves Infected with *Cryptosporidium* spp. on the Health Status, Nutrition, and Survival Rate

Highlights:

- The use of bacteriophages in calves decreases the use of antibiotics.
- Bacteriophages reduce diarrhea in calves infected with *Cryptosporidium* spp.
- Bacteriophages decrease the mortality rate in calves infected with *Cryptosporidium* spp.
- The nutritional state of calves improves if bacteriophages are used.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **Effect of the Administration of Bacteriophages to Calves Infected with**
2 ***Cryptosporidium* spp. on the Health Status, Nutrition, and Survival Rate**

3 Levi Espinosa^{a1}, Ramón Delgado^a, Leticia Gaytán^a, Francisco Véliz^a, Javier Morán^b, Lee

4 Jung-Jin^{a2}, Dalia Carrillo^{a*}

5 ^aAutonomous Agrarian University Antonio Narro, Laguna Unit, Valle Verde, 27054,
6 Torreón, Coahuila, Mexico.

7 ^bAutonomous University of Coahuila, UAdeC. Department of Cellular Biology and
8 Ultrastructure, 27000 Torreón, Coahuila, México.

9 *Corresponding author: E-mail: dalia.ivettecm@gmail.com; Telephone number: +52 871
10 354 81 15; Correspondence address: Autonomous Agrarian University Antonio Narro,
11 Laguna Unit, Valle Verde, 27054, Torreón, Coahuila, Mexico.

12
13 ¹**Current affiliation:** Autonomous University of Chiapas, 29060, Tuxtla Gutierrez,
14 Chiapas, México

15 ²**Current affiliation:** CTCBIO, Inc., Seoul 05724, Korea.

16
17 **Highlights:**

- 18 • The use of bacteriophages in calves decreases the use of antibiotics.
- 19 • Bacteriophages reduce diarrhea in calves infected with *Cryptosporidium* spp.
- 20 • Bacteriophages decrease the mortality rate in calves infected with *Cryptosporidium*
21 spp.
- 22 • The nutritional state of calves improves if bacteriophages are used.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

Cryptosporidium spp., together with enteropathogenic bacteria, induces diarrhea, which could cause death to the calf. The treatment includes antibiotics, however, in recent years bacterial resistance has required the search for other alternatives. The objective of this work was to evaluate the use of bacteriophages in calves infected with *Cryptosporidium* spp. on their state of health, nutritional aspect, and survival rate. A farm with calves infected with this protozoan was selected. For its control, decoquinate (2.5 mg/Kg) was used. They were used 72 pre-weaned calves, divided into two groups. The treated group (n= 36) received 5 g of bacteriophages by mouth; the control group did not receive bacteriophages. The treated group had a higher survival rate (100 vs 86.11%, $p= 0.05$). The total number of days with diarrhea was lower for the treated group (4.69 ± 2.29 vs 13 ± 4.88 d, $p= 0.04$) and the range of appearance was wider. The diarrheas appeared earlier in the control group (13 vs 18 d, $p= 0.03$). The treated group obtained a lower probability of receiving antibiotics treatment (OR = 0.05). Similarly, better results were obtained in the daily weight gain (0.634 ± 0.01 vs 0.562 ± 0.02 kg, $p= 0.03$), weight (77.35 ± 1.47 vs 71.38 ± 1.62 kg, $p= 0.01$), and height (92.21 ± 0.8 vs 89.2 ± 0.59 cm, $p= 0.009$). The treated group reported the highest value of leukocytes on day 10 and the lowest on day 5 ($p= 0.04$). The supplementation with bacteriophages to calves infected with *Cryptosporidium* spp. improves the survival rate, the days of diarrhea decrease, and the appearance of diarrhea is delayed. Additionally, the use of antibiotics is reduced. While improving the health of calves, it is also improved their nutritional state.

Keywords: bacterial resistance, bovine, diarrhea, parasite, phage.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

Enteric and respiratory diseases are the main causes of morbidity and mortality in calves (Diao et al., 2017; Tora et al., 2021). A frequent origin of gastrointestinal diseases is the *Cryptosporidium* spp. infection (Thomson et al., 2017). This parasite damages the epithelial cells of the gastrointestinal tract, causing diarrhea; nevertheless, its mortality is low (Santin, 2020). However, when it is associated with bacteria, the disease becomes more severe and could cause death (Santin, 2013). To treat this enteric disease, antiparasitic and antimicrobial compounds are used. Nevertheless, the use of antibiotics has ceased to be efficient in the last decade due to the increase in bacterial resistance (Hommerich et al., 2019). Therefore, new environmentally friendly alternatives are being searched. An alternative is the use of bacteriophages (or phages). Phages are viruses that infect and lysate specific bacteria, even if the bacteria are resistant to antibiotics (Squires, 2018). In previous studies, it has been proved the effectiveness of phages in the digestive system to control bacteria (Jeong et al., 2021; Schmoeller et al., 2021). In addition, it has been found that the same strain could sometimes lysate other varieties and even other bacterial species, which makes wider its range of action (Dueñas et al., 2017; Moreno Switt et al., 2013). Hence, the objective of this study is to evaluate the use of bacteriophages in calves infected with *Cryptosporidium* spp. on their state of health, nutritional aspect, and survival rate.

Materials and methods

The present study was carried out on a dairy farm with prevalence of *Cryptosporidium* spp. The use of animals and experimental protocols were reviewed and approved by the Committee of Animal Research Ethics of the Antonio Narro Autonomous Agrarian

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

71 University (approval number 38111-425502002). The study was performed under the
72 ARRIVE and 2010/63/UE guidelines of the European Parliament (du Sert et al., 2020).

73 **Farm selection**

74 Samples of feces were taken randomly from different farms to diagnose
75 *Cryptosporidium* spp., which was carried out by the Ziehl Neelsen technique (Rekha et al.,
76 2016). A farm where the calves presented a certain degree of infection (+, ++, +++, +++)
77 was chosen. During the experiment, all the calves received decoquinate 2.5 mg/kg by mouth
78 as a prophylactic and the collection of samples continued at random to monitor the protozoan.

79 **Experimental scheme and treatment**

80 A random study was performed on a dairy farm in Torreón, Mexico, from February
81 to June of 2021. They were used 72 Holstein-Friesian pre-weaned female calves (37.5 ± 4.3
82 kg body weight), from their birth (d 1) to their weaning (d 60). The calves were divided into
83 two groups (control and phage) with 36 animals each and homogeneous in body weight. The
84 groups were assigned randomly at birth.

85 To the group phage (treated), 5 g of bacteriophages (eXolution® CTCBIO, Inc., Seúl,
86 Corea) were given per day, targeting *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*,
87 *Salmonella dublin*, *Salmonella derby*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* k99 and f41,
88 and *Clostridium perfringens* of types A and C. The phages were added every day to the
89 recipient where milk was given to each calf. The control group didn't receive phages.

90 **Accommodation and feeding**

91 At the moment of birth, the calves were subjected to a physical exam; they were
92 weighted, they received 4 L of colostrum of the same quality, and they were kept in individual
93 cages until weaning. The calves were fed with whole milk and balanced solid food (Iniciador
94 supra®, Nuplen S.A. de C.V.). The balanced food contained protein (21.5%), fiber (10%),

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

95 fat (2%) and ashes (14%). At every moment the calves had water ad libitum. The feeding
96 protocol (milk and balanced solid food) was adjusted every day according to age: 1 - 7 d: 6
97 L and 0.3 kg; 8 - 25 d: 8 L and 0.4 kg; 26 – 40 d: 10 L and 0.5 kg; 41 – 50 d: 8 L and 0.8 kg;
98 51 – 55 d: 6 L and 1.2 kg; 55 – 60 d: 0 L and 1.5 kg. Balanced solid food was offered once
99 and milk twice each day at 7:00 and 15:00 in equal amounts.

100 **Evaluated variables**

101 The presence of diarrhea and the use of antibiotics were evaluated according to the
102 methodology used by Chamorro et al. (2017). Those calves that presented some type of nasal
103 discharge (mucous, serous, or muco-serous) were considered positive for pneumonia. These
104 evaluations were performed every day in the mornings and afternoons. On day 60, the
105 survival rate was evaluated. When a calf presented diarrhea, a sample of the feces was taken
106 from the rectum and then taken to the laboratory of the Universidad Autónoma Agraria
107 Antonio Navarro to determine the growth of Salmonella spp. (Cho and Yoon, 2014) and
108 *Cryptosporidium* spp. In the same laboratory, the diagnosis for the death of the calves was
109 made.

110 The body weight was evaluated with a digital scale on the day of birth and after that
111 every 15 days until weaning. The daily weight gain (DWG) was evaluated by dividing the
112 body weight of the period in evaluation by the 15 last days. At the same time, the height at
113 withers was measured. These evaluations were carried out in the mornings before the
114 morning feeding.

115 The total leucocytes were measured on days 1, 5, 10, and 15. The blood sample was
116 taken from the jugular vein in a vacutainer tube with EDTA in the mornings. The reading
117 was made in an automated hematology analyzer for bovines (H-2000 vet, Hlab).

118 **Use of antibiotics**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

140 A significant difference was observed between the two groups regarding the survival
141 rate of the calves ($p= 0.05$). In the group that got phages, all (100%) survived, while in the
142 control group 86.11% survived.

143 **Diarrhea, antibiotic therapy, and pneumonia**

144 The total of days with diarrhea was lower in the phage group than in the control group
145 (4.69 ± 2.29 and 13 ± 4.88 , respectively, $p= 0.04$) (Figure 1). A significant difference was
146 observed between the groups regarding the beginning of diarrheas ($p= 0.03$). In the control
147 group they appeared faster (13 d) than in the group with bacteriophages (18 d) where, in
148 addition, the range of appearing was wider than in the control group (Figure 2). According
149 to the results of the Odds Ratio, the calves of the treated group tended to have a lower
150 probability of receiving antibiotics treatment compared to the control group (OR= 0.05, $p=$
151 0.005). In addition, it was observed that the treated group had a lower risk of developing
152 pneumonia (OR= 0.4), but this result was not significant ($p= 0.32$) (Table 1).

153 **DWG, weight, and height**

154 In the results at weaning, it was observed a significant difference in the DWG,
155 weight (77.35 ± 1.47 vs 71.38 ± 1.62 kg), and height (92.21 ± 0.8 vs 89.2 ± 0.59 cm). The
156 phage group had the highest mean ($p= 0.03$, 0.01 and 0.009 respectively) (Table 2 and
157 Figure 3).

158 **Leukocytes**

159 During the first 15 days, no significant differences were observed in the
160 concentration of leukocytes between the groups. Nevertheless, in the phage group, there

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

161 was a significant difference ($p = 0.04$), taking the highest value on day 10 and the lowest on
162 day 5 (Table 3).

163

164 **Discussion**

165 The infection by *Cryptosporidium* spp. is frequent and produces chronic diarrhea
166 which brings great economic losses (Shaw et al., 2020). To our knowledge, this is the first
167 study that evaluates bacteriophages in Holstein-Friesian pre-weaned calves infected with
168 *Cryptosporidium* spp.

169 During the study period, the diarrheas were not completely eradicated, probably due
170 to the presence of *Cryptosporidium* spp. (Santin, 2013), which was tried to be controlled by
171 administering decoquinat. Nevertheless, in the random sampling, some moderate to severe
172 (++, +++) infections were found. This drug reduces the number of oocysts, but sometimes it
173 is not enough to avoid the appearance of diarrheas (Åberg et al., 2020; Moore et al., 2003).
174 The origin of the diarrheas is multifactorial, and we cannot attribute them only to this
175 protozoan.

176 Even so, in the phage group, all the calves survived (100%) while in the control group,
177 86.11% survived. Most deaths were due to gastroenteric problems. This survival is similar to
178 the 99% obtained by Schmoeller et al. (2021), although in their study there was no
179 cryptosporidiosis. The deaths in the control group could be caused by enteropathogens such
180 as *E. coli*, *Salmonella* spp., and *C. perfringens* (Nasr and Meghawery, 2007; Thomson et al.,
181 2017). Not having mortality in the phage group complies with the most crucial indicator of
182 animal wellbeing (Uetake, 2013). Also, the diarrheas in the control group were treated with
183 antibiotics; therefore, not having deaths in the phage group would indicate that these are
184 better at controlling bacterial populations than the antibiotic.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

185 The phage group was the healthiest, presenting fewer days with diarrheas and
186 delaying their appearance even with the prevalence of *Cryptosporidium* spp. Similar results
187 have been obtained in other studies although they did not report infection by protozoans
188 (Alomari et al., 2021; Schmoeller et al., 2021). This explains why bacteriophages are
189 effective controllers for bacteria that cause diarrheas (Dueñas et al., 2017; Moreno Switt et
190 al., 2013), and giving it by mouth is effective despite the pH of the abomasum (Bicalho et
191 al., 2012). This control was observed in the phage group, where there was no growth of
192 *Salmonella* spp.; this did not happen in the control group. *Cryptosporidium* spp. opens the
193 opportunity to other agents (Santin, 2020), but if the enteropathogen bacteria are controlled,
194 the diarrheas decrease.

195 Diarrheas were treated with antibiotics, but the phage group obtained a lower
196 probability to receive antimicrobial therapy. Other therapies with bacteriophages have been
197 tried, where favorable results were also obtained (Alomari et al., 2021; Bicalho et al., 2012;
198 Kwiatek et al., 2020; Schmoeller et al., 2021). The phages are very effective for the lysate of
199 bacteria, so technically there is no need for the use of an antibiotic (Nobrega et al., 2018);
200 this also avoids the destruction of intestinal microbiota (Low et al., 2021). Hence
201 bacteriophages are a good alternative for addressing antimicrobial resistance (Hommerich et
202 al., 2019). If the diarrheas are eliminated, the pneumonias could also be diminished (Pardon
203 et al., 2015). In this study, it was obtained a preventive effect of the phages on the appearance
204 of pneumonias but without an acceptable statistical significance. Some complementary
205 studies are required to evaluate this effect in a total absence of *Cryptosporidium* spp.

206 The difference in DWG was not significant when being evaluated every 15 days, but
207 it was significant during the entire trial period (60 d); the phage group gained more weight.
208 These results agree with Jeong et al. (2021) but disagree with Schmoeller et al. (2021), who

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

209 obtained statistical differences in all the evaluated periods. Regarding the body weight, there
210 was a difference only in the second half of the study, including the weaning. Some studies
211 have reported differences (Schmoeller et al., 2021) but some others showed no difference
212 (Jeong et al., 2021). The statistical equality in the first month could be because it is the period
213 where the highest infection of *Cryptosporidium* spp. manifests (Åberg et al., 2020).
214 Otherwise, the difference could be observed since day 11 (Alomari et al., 2021). The most
215 evident effect was in the height, where in the whole period of study there was a statistical
216 difference except in birth, similar to that obtained by Schmoeller et al. (2021). This indicates
217 that, although the weights variate, the height growth is different (Ozkaya and Bozkurt, 2009).
218 The positive effects in the parameters of nutrition could be explained by the low morbidity
219 in the phage group (differently than the control) which allowed to have better nutrition (Tora
220 et al., 2021). Hence, although the bacteriophages are not nutrients, they improve the state of
221 health and, consequently, they improve nutritional efficiency.

222 The effect of phages in the leukocytes was not significant. Van Belleghem et al.
223 (2017) and other authors (Barr, 2017; Krut and Bekeredjian-Ding, 2018) mention that in high
224 concentrations, the phages migrate from the intestine to the bloodstream, where the activity
225 of macrophages and other immune cells increase. In the 5 g of the treatment, 5X10⁶ UFP of
226 each bacteriophage were administrated; nevertheless, no differences were obtained, which is
227 similar to that obtained by Jeong et al. (2021). In the phage group, there was a statistical
228 difference throughout time, but the values were in the range of the normal parameters (Brun-
229 Hansen et al., 2006). Further study is suggested with the purpose of knowing how the
230 concentrations of bacteriophages influence the health status of calves.

231
232

Conclusion

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

233 *Cryptosporidium* spp. causes diarrheas in pre-weaned calves which could complicate
234 with opportunistic bacteria, increasing the mortality rate. However, if bacteriophages are
235 administrated, the survival rate improves, the diarrhea days decrease and the appearance of
236 diarrhea is delayed. Additionally, the use of antibiotics is reduced, contributing to the strategy
237 of mitigating the bacterial resistance to these compounds. While improving the health of
238 calves, the nutritional state is also improved.

239

240 **Author statement**

241 Levi Espinosa: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing -
242 Original Draft, Project administration

243 Ramón Delgado: Conceptualization, Investigation, Resources

244 Leticia Gaytán: Investigation. Resources, Writing - Review & Editing

245 Francisco Véliz: Conceptualization, Methodology, Writing - Original Draft, Visualization

246 Javier Morán: Methodology, Investigation, Writing - Review & Editing

247 Lee Jung-Jin: Validation, Writing - Review & Editing

248 Dalia Carrillo: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - Review &
249 Editing, Supervision, Project administration

250

251 Conflicts of interest: Author Jung-Jin Lee is listed as inventor on patent applications filed
252 by CTCBIO Inc. All other authors declare no conflict of interest.

253

254 This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public,
255 commercial, or not-for-profit sectors.

256

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

257
258 Åberg, M., Emanuelson, U., Troell, K., Björkman, C., 2020. A single-cohort study of
259 *Cryptosporidium bovis* and *Cryptosporidium ryanae* in dairy cattle from birth to
260 calving. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 20, 100400.
261 <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100400>
262 Alomari, M.M.M., Dec, M., Nowaczek, A., Puchalski, A., Wernicki, A., Kowalski, C.,
263 Urban-Chmiel, R., 2021. Therapeutic and Prophylactic Effect of the Experimental
264 Bacteriophage Treatment to Control Diarrhea Caused by *E. coli* in Newborn Calves.
265 *ACS Infect. Dis.* 7, 2093–2101. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00010>
266 Barr, J.J., 2017. A bacteriophages journey through the human body. *Immunol. Rev.* 279,
267 106–122. <https://doi.org/10.1111/imr.12565>
268 Bicalho, M.L.S., Machado, V.S., Nydam, D. V., Santos, T.M.A., Bicalho, R.C., 2012.
269 Evaluation of oral administration of bacteriophages to neonatal calves: Phage survival
270 and impact on fecal *Escherichia coli*. *Livest. Sci.* 144, 294–299.
271 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.12.007>
272 Brun-Hansen, H.C., Kampen, A.H., Lund, A., 2006. Hematologic values in calves during the
273 first 6 months of life. *Vet. Clin. Pathol.* 35, 182–187. [https://doi.org/10.1111/j.1939-](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2006.tb00111.x)
274 [165X.2006.tb00111.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2006.tb00111.x)
275 Chamorro, M.F., Cernicchiaro, N., Haines, D.M., 2017. Evaluation of the effects of
276 colostrum replacer supplementation of the milk replacer ration on the occurrence of
277 disease, antibiotic therapy, and performance of pre-weaned dairy calves. *J. Dairy Sci.*
278 100, 1378–1387. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11652>
279 Cho, Y. il, Yoon, K.J., 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis,
280 and intervention. *J. Vet. Sci.* 15, 1–17. <https://doi.org/10.4142/JVS.2014.15.1.1>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

281 Diao, Q. yu, Zhang, R., Tu, Y., 2017. Current research progresses on calf rearing and
282 nutrition in China. *J. Integr. Agric.* 16, 2805–2814. [https://doi.org/10.1016/S2095-](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61767-2)
283 [3119\(17\)61767-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61767-2)

284 du Sert, N.P., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J.,
285 Clark, A., Cuthill, I.C., Dimagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S.T., Howells,
286 D.W., Karp, N.A., Lazic, S.E., Lidster, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J.,
287 Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E.S., Silberberg, S.D.,
288 Steckler, T., Würbel, H., 2020. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for
289 reporting animal research. *PLoS Biol.* 18, 9–10.
290 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

291 Dueñas, F., Rivera, D., Toledo, V., Tardone, R., Hervé-Claude, L.P., Hamilton-West, C.,
292 Switt, A.I.M., 2017. Short communication: Characterization of Salmonella phages
293 from dairy calves on farms with history of diarrhea. *J. Dairy Sci.* 100, 2196–2200.
294 <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11569>

295 Hommerich, K., Ruddat, I., Hartmann, M., Werner, N., Käsbohrer, A., Kreienbrock, L., 2019.
296 Monitoring Antibiotic Usage in German Dairy and Beef Cattle Farms—A
297 Longitudinal Analysis. *Front. Vet. Sci.* 6, 1–11.
298 <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00244>

299 IBM Corp. Released., 2017. IBM SPSS Statistics for Windows.

300 Jeong, S., Jo, N., Lee, J.J., Lee, J.H., Kam, D.K., Seo, J., Kebreab, E., Seo, S., 2021. Effects
301 of β -mannanase and bacteriophage supplementation on health and growth
302 performance of holstein calves. *Animals* 11, 1–12.
303 <https://doi.org/10.3390/ani11020372>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

304 Krut, O., Bekeredjian-Ding, I., 2018. Contribution of the Immune Response to Phage
305 Therapy. *J. Immunol.* 200, 3037–3044. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701745>

306 Kwiatek, M., Parasion, S., Nakonieczna, A., 2020. Therapeutic bacteriophages as a rescue
307 treatment for drug-resistant infections – an in vivo studies overview. *J. Appl.*
308 *Microbiol.* 128, 985–1002. <https://doi.org/10.1111/jam.14535>

309 Low, C.X., Tan, L.T.H., Mutalib, N.S.A., Pusparajah, P., Goh, B.H., Chan, K.G.,
310 Letchumanan, V., Lee, L.H., 2021. Unveiling the impact of antibiotics and alternative
311 methods for animal husbandry: A review. *Antibiotics* 10, 1–17.
312 <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050578>

313 Moore, D.A., Atwill, E.R., Kirk, J.H., Brahmabhatt, D., Alonso, L.H., Hou, L., Singer, M.D.,
314 Miller, T.D., 2003. Prophylactic use of decoquinatate for infections with
315 *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *J. Am. Vet.*
316 *Med. Assoc.* 223, 839–845. <https://doi.org/10.2460/JAVMA.2003.223.839>

317 Moreno Switt, A.I., den Bakker, H.C., Vongkamjan, K., Hoelzer, K., Warnick, L.D.,
318 Cummings, K.J., Wiedmann, M., 2013. Salmonella bacteriophage diversity reflects
319 host diversity on dairy farms. *Food Microbiol.* 36, 275–285.
320 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.014>

321 Nasr, E.M., Meghawery, M.A., 2007. Studies on Diarrhea in Calves with Emphasis on the
322 Role of *Clostridium Perfringens* and *Escherichia Coli*. *Res. J. Anim. Vet. Sci.* 2, 28–
323 33.

324 Nobrega, F., Vlot, M., P, de J., Dreesens, L., Beaumont, H., Lavigne, B., Dutilh, B., Brouns,
325 S., 2018. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature* 16, 760–773.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

326 Ozkaya, S., Bozkurt, Y., 2009. The accuracy of prediction of body weight from body
327 measurements in beef cattle. *Arch. Anim. Breed.* 52, 371–377.
328 <https://doi.org/10.5194/aab-52-371-2009>

329 Pardon, B., Alliet, J., Boone, R., Roelandt, S., Valgaeren, B., Deprez, P., 2015. Prediction of
330 respiratory disease and diarrhea in veal calves based on immunoglobulin levels and
331 the serostatus for respiratory pathogens measured at arrival. *Prev. Vet. Med.* 120,
332 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.04.009>

333 Rekha, H.K.M., Puttalakshamma, G.C., D'Souza, P.E., 2016. Comparison of different
334 diagnostic techniques for the detection of cryptosporidiosis in bovines. *Vet. World* 9,
335 211. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2016.211-215>

336 Santin, M., 2020. Cryptosporidium and Giardia in ruminants. *Vet. Clin. North Am. - Food*
337 *Anim. Pract.* 36, 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.005>

338 Santin, M., 2013. Clinical and subclinical infections with Cryptosporidium in animals. *N. Z.*
339 *Vet. J.* 61, 1–10. <https://doi.org/10.1080/00480169.2012.731681>

340 Schmoeller, E., Matos, A.D.C. de, Rahal, N.M., Feijo, J.O., Brauner, C.C., Pino, F.A.B. Del,
341 Correa, M.N., Rabassa, V.R., 2021. Diarrhea duration and performance outcomes of
342 pre-weaned dairy calves supplemented with bacteriophage. *Can. J. Anim. Sci.* 1–10.
343 <https://doi.org/10.1139/CJAS-2021-0074>

344 Shaw, H.J., Innes, E.A., Morrison, L.J., Katzer, F., Wells, B., 2020. Long-term production
345 effects of clinical cryptosporidiosis in neonatal calves. *Int. J. Parasitol.* 50, 371–376.
346 <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.002>

347 Squires, R.A., 2018. Bacteriophage therapy for management of bacterial infections in
348 veterinary practice: what was once old is new again. *N. Z. Vet. J.* 66, 229–235.
349 <https://doi.org/10.1080/00480169.2018.1491348>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

350 Thomson, S., Hamilton, C.A., Hope, J.C., Katzer, F., Mabbott, N.A., Morrison, L.J., Innes,
351 E.A., 2017. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control
352 strategies. *Vet. Res.* 48, 42. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0447-0>

353 Tora, E., Abayneh, E., Seyoum, W., Shurbe, M., 2021. Longitudinal study of calf morbidity
354 and mortality on smallholder farms in southern Ethiopia. *PLoS One* 16, 1–18.
355 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257139>

356 Uetake, K., 2013. Newborn calf welfare: A review focusing on mortality rates. *Anim. Sci. J.*
357 84, 101–105. <https://doi.org/10.1111/asj.12019>

358 Van Belleghem, J.D., Clement, F., Merabishvili, M., Lavigne, R., Vaneechoutte, M., 2017.
359 Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced
360 by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* phages. *Sci. Rep.* 7, 1–13.
361 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08336-9>

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure Captions

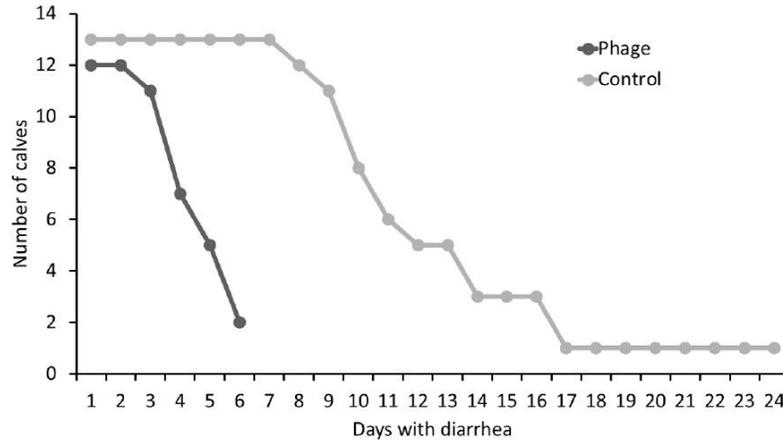
374
375 Figure 1. Total duration of diarrhea in calves infected with *Cryptosporidium* spp.
376 supplemented with bacteriophages. The average of the treated group was 4.69 ± 2.29 days
377 and, for the control group, it was 13 ± 4.88 days ($p= 0.04$).
378 Figure 2. Latency days of diarrheas in calves infected with *Cryptosporidium* spp. and
379 supplemented with bacteriophages. A Mann-Whitney U test was carried out ($p= 0.03$); it
380 took 18 days for the phage group to show diarrhea, while the time for the control group was
381 13 days.
382 Figure 3. Effect of supplementation with bacteriophages on calves infected with
383 *Cryptosporidium* spp. on the body weight and height at the withers from birth to weaning.
384 Continuous lines = body weight; discontinuous lines = height at withers. Bold circles (•) =
385 phage group; circles (o) = control group. Asterisk (*) = $p \leq 0.05$; two asterisks (**) = $p =$
386 ≤ 0.01 .
387
388
389
390
391
392
393
394
395

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

396

Figures

397 Figure 1.



398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

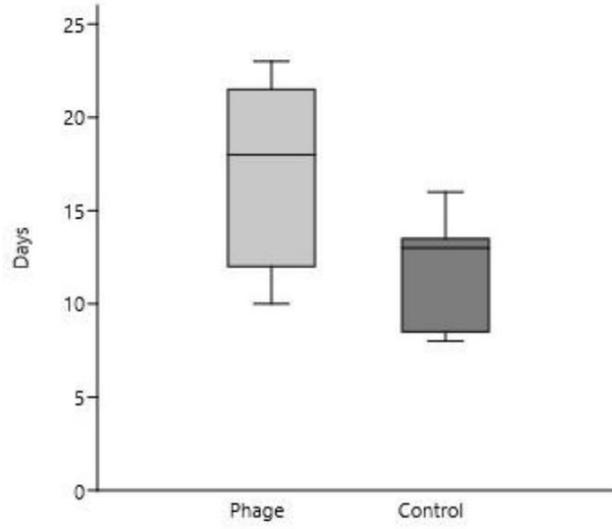
408

409

410

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

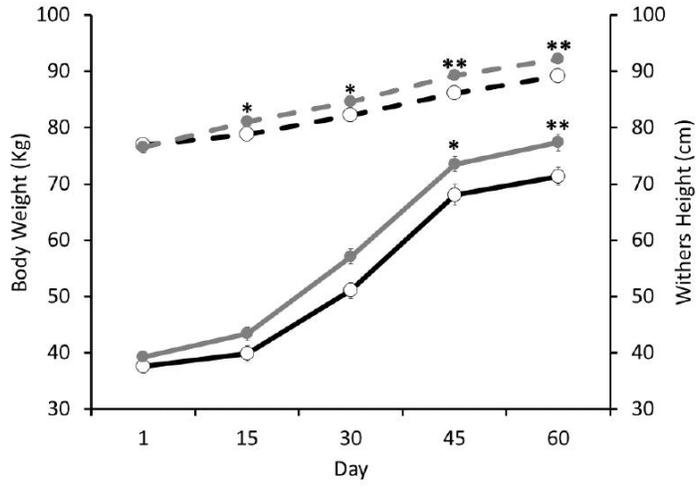
411 Figure 2.



412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

425 Figure 3.



426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Tables

439
440 Table 1. Probability of receiving antibiotics therapy or presenting pneumonia in calves
441 infected with *Cryptosporidium* spp. supplemented with bacteriophages.

442

Variable	OR (PHA vs CTL)	95% CI OR	p-value
Antibiotic therapy	0.05	0.005 - 0.533	0.005
Pneumonia	0.4	0.06 - 2.769	0.32

443 Shows results of the Odds Ratio (OR), the confidence interval (CI), and the value p
444 (calculated through the Fisher exact) between the phage (PHA) and control (CTL) groups.

445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

459 Table 2. Effect of the supplementation with bacteriophages to calves infected with
460 *Cryptosporidium* spp. on the DWG from birth to weaning.

Day Item	ADG				
	1-15	15-30	30-45	45-60	1-60
Control	0.148± 0.11	0.748± 0.06	1.1± 0.05	0.244± 0.06	0.562± 0.02
Phage	0.273± 0.05	0.91± 0.05	1.07± 0.03	0.277± 0.06	0.634± 0.01
<i>p</i> -value	0.32	0.06	0.6	0.72	0.03

461 ADG: average daily gain. Data are shown as mean ± Mean Standard Error. A value of $p \leq$
462 0.05 was considered statistically different.

463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

477 Table 3. Effect of supplementation with bacteriophages to calves infected with
478 *Cryptosporidium* spp. on the number of blood leukocytes during the first 15 days of life.

Item	Day				p-value
	1	5	10	15	
Control	11.03 ±1.35	9.83 ±1.03	11.01 ±1.21	10.55 ±0.74	0.85
Phage	8.99 ±1.26 ^{ab}	7.50 ±0.86 ^b	11.45 ±0.79 ^a	10.30 ±1 ^{ab}	0.04
p-value	0.28	0.09	0.76	0.84	

479 Data are shown as mean ± Mean Standard Error. For Tukey test, a value of $p \leq 0.05$ was
480 considered statistically different. The differences between groups were analyzed with t-
481 student. Intra-group differences were analyzed with ANOVA test. Different superscripts in
482 the same group means significant difference.

483
484

Conflict of Interest

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Lee Jung-Jin has patent #US 6,984,406 B2 issued to CTC BIO Inc.

**EL ESTRÉS CALÓRICO INFLUYE EN LAS REACCIONES ADVERSAS POSINMUNIZACIÓN EN
BECERRAS HOLSTEIN-FRIESIAN
HEAT STRESS INFLUENCES ADVERSE REACTIONS FOLLOWING IMMUNIZATION IN HOLSTEIN-
FRIESIAN CALVES**

Levi Norberto Espinosa García¹, Francisco Gerardo Véliz Deras¹, Ramón Alfredo Delgado González¹,
Javier Moran Martínez², Leticia Romana Gaytán Alemán¹, Dalia Ivette Carrillo Moreno^{1*}

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, ²Departamento de Biología Celular y
Ultraestructura, Universidad Autónoma de Coahuila Unidad Torreón.

***Autor de correspondencia:** Correo electrónico: dalia.ivettecm@gmail.com. Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro Unidad Laguna, Raúl López Sánchez s/n, valle verde 27054, Torreón Coahuila, México

RESUMEN

El objetivo es informar sobre la influencia del estrés calórico en los efectos adversos de una bacterina aplicada a 547 terneras Holstein-Friesian. Se inmunizaron terneras sanas en siete establos lecheros en Torreón, Coahuila, México. Se registró el desarrollo de las reacciones adversas y se calculó el ITH. La mayoría de las reacciones (48.5 %) ocurrieron entre 60 y 90 min pos-inmunización; el mayor número de muertes se observó entre los 90 y 120 min. Uno de los lotes comerciales produjo la mitad de las reacciones; nueve terneras murieron. Se observó que el estrés por calor moderado-severo afecta a los terneros mayores con un tiempo de aparición más prolongado; y un nivel más bajo de estrés afecta a los terneros más jóvenes con signos de aparición más rápida. La administración de bacterinas conlleva un riesgo de reacciones adversas y el estrés por calor influye en su desarrollo.

Palabras clave: Bacterina, bovino, efecto adverso, ITH, vacuna.

23 **ABSTRACT**

24 The objective is to inform about the influence of heat stress on the adverse effects of a bacterin applied to
25 547 Holstein-Friesian calves. Healthy calves were immunized in seven dairy farms in Torreón, Coahuila,
26 Mexico. The development of adverse reactions was recorded and the ITH was calculated. Most of the
27 reactions (48.5 %) occurred between 60 and 90 min post-immunization; the highest number of deaths was
28 observed between 90 and 120 min. One of the commercial batches produced half the reactions; nine calves
29 died. It was observed that moderate-severe heat stress affects older calves with a longer onset time; and a
30 lower level of stress affects younger calves with more rapid onset signs. The administration of bacterins
31 carries a risk of adverse reactions and heat stress influences their development.

32 **Key words:** Bacterin, bovine, side effect, THI, vaccine.

33 **INTRODUCCIÓN**

34 El complejo respiratorio bovino es causado por virus y bacterias que afectan la salud de los terneros
35 (Buczinski y Pardon 2020). En la unidad de crianza, la mejor forma de prevenir una infección por *Mannheimia*
36 *haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*, es mediante la aplicación de bacterinas. Sin
37 embargo, la bacterinización de terneros lactantes Holstein-Friesian, a diferencia de otras razas, generan una
38 alta incidencia de reacciones adversas que varían en intensidad, tiempo de presentación y, ocasionalmente,
39 producen la muerte de los animales (Ramsay *et al.* 2005, Ahmad *et al.* 2014).

40 Existen reportes de reacciones adversas para casi todos los tipos de vacunas, pero los informes son mayores
41 cuando se usan bacterinas (Confer y Ayalew 2018). Y el riesgo a este tipo de reacción podría incrementarse
42 en terneros bajo estrés calórico, debido al efecto adverso sobre la respuesta inmune mediada por células
43 (Inbaraj *et al.* 2016). El desarrollo de estas reacciones adversas ya está descrito en la literatura (Zachary
44 2017); sin embargo, aún no se demuestra científicamente una relación plausible entre los efectos adversos

45 por bacterinización y todos los factores que la desencadenan, incluido el estrés calórico. Además, estos
46 eventos en terneros lactantes aún no han sido bien documentados (Nakayama 2019).

47 Por lo tanto, es importante investigar qué factores están involucrados en este tipo de reacciones. Esto
48 generará información que ayude a realizar un óptimo manejo de la vacunación en cada unidad de crianza
49 para evitar la muerte de los animales. Así pues, el objetivo de este trabajo fue, describir el desarrollo de las
50 reacciones adversas posteriores a la bacterinización en terneros lactantes Holstein-Friesian bajo estrés
51 calórico.

52 **MATERIALES Y MÉTODOS**

53 De abril a junio de 2021, veterinarios capacitados inmunizaron 547 terneras sanas divididos en siete establos
54 lecheros (78.14 ± 67.38 DE) en Torreón, Coahuila, México. Todos los establos se distribuyeron en un radio
55 de nueve km. El calendario de vacunación fue similar en cada unidad de crianza.

56 **Manejo de los animales.** Las terneras se ubicaron en una sección especial del establo, lejos de las vacas
57 en producción. La edad de las terneras inmunizadas osciló entre 35 y 50 d. Estas se mantuvieron en una
58 jaula individual hasta el destete en el día 60. Cada jaula estaba rodeada por cinco hileras de madera de 13
59 cm de ancho con 10 cm de espacio entre ellas. Las jaulas tenían 2 m de largo y 1 m de ancho con una
60 sombra de 1 m² a una altura de 1.60 m proporcionada por una lámina de aluminio. Las terneras eran
61 alimentadas con leche y alimento balanceado sólido (6 L y 1.5 kg /día respectivamente), el alimento
62 balanceado contenía: proteína (21.5 %), fibra (10 %), grasa (2 %), cenizas (14 %) y ELN (40.5 %). En todo
63 momento disponían de agua *ad libitum*.

64 **Inmunización.** El procedimiento se realizó por las mañanas entre las 7:00 y las 8:00. Según las instrucciones
65 del fabricante, se aplicaron 5 mL de la bacterina por vía subcutánea en la región lateral del cuello, con una
66 jeringa multidosis de 50 mL (Allflex®). El calendario de vacunación incluyó dos fechas: la primera exposición

67 al antígeno fue a los 30 d de edad y la segunda a los 45 d. La bacteria utilizada contenía cultivos complebs
68 de *M. haemolytica* serotipos A1, A2 y sus toxoides, *P. multocida* serotipo A1, *H. somni* y *Salmonella dublin*,
69 químicamente inactivados y adsorbidos en hidróxido de aluminio. El total de las dosis utilizadas se distribuyó
70 en siete lotes distintos asignados por el fabricante. Para este reporte, los lotes se identificaron con las letras
71 A, B, C, D, E, F y G.

72 **Criterios para la identificación de reacciones adversas y tratamientos.** Al momento de la inmunización,
73 se registró el tiempo para cada temera; se vigilaron constantemente. La vigilancia consistió en recorrer todas
74 las jaulas haciendo observación visual. El recorrido de las 78.14 (\pm 67.38 DE) temeras en cada unidad de
75 crianza, era realizado por cuatro médicos capacitados y no tardaba más de siete minutos en completarse.
76 Los temeros sospechosos de reacción adversa fueron los que presentaron alguno de los siguientes signos:
77 disnea, hiperpnea, tos, incoordinación, postración, diaforesis, secreción espumosa de la boca, fosas nasales
78 o secreción anal (Rashid *et al.* 2009). Una vez que se identificaba una ternera positiva, se administraba el
79 siguiente tratamiento: epinefrina (15 μ g / kg⁻¹), difenhidramina (0.7 mg / kg⁻¹), sulfato de atropina (0.2 mg /
80 kg⁻¹), flumetasona (0.1 mg / kg⁻¹) y cafeína (5 mg / kg⁻¹) (Tavares y Sakata 2012, Ring *et al.* 2014, Lieberman
81 *et al.* 2015).

82 **Cálculo del ITH.** Dadas las características geográficas y ambientales del lugar, todos los animales
83 compartían el mismo índice de temperatura y humedad (ITH), el cual se calculó con la fórmula descrita por
84 Mader *et al.* (2006). Los datos climatológicos se obtuvieron del observatorio meteorológico de Torreón
85 (CONAGUA 2021).

86 **Análisis estadístico.** Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS ver. 25.0 IBM Corp. (2017)
87 y el software estadístico MedCalc Statistical Software (2020). Se obtuvo estadística descriptiva. Se utilizó
88 Chi cuadrada para el efecto de los tratamientos sobre el número de muertes y para el efecto del lote sobre
89 las reacciones. También, se realizó una correlación de Pearson entre el tiempo transcurrido y el número de

90 muertes. Por último, se llevó a cabo una prueba de Kruskal-Wallis y Conover para determinar el efecto del
91 estrés calórico sobre el tiempo y la edad.

92 **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

93 Los efectos adversos en bovinos y otras especies asociados con la vacunación han sido reportados desde
94 el comienzo del desarrollo de las vacunas. En este trabajo, del total de terneros inmunizados 35 (6.4 %)
95 presentaron reacción adversa. Del total de estas reacciones, nueve (25.7 %) murieron, estos fueron
96 inmunizados con los lotes A (3), D (2), E (2) y F (2). La distribución de las reacciones adversas observadas
97 y la muerte de los terneros a lo largo del tiempo se muestra en la Figura 1. El porcentaje de reacciones
98 presentadas y el número de muertes son elevados en comparación con otros estudios (Ellis y Yong 1997,
99 Nakayama 2019). Las reacciones adversas que se presentaron, son compatibles con un choque endotóxico,
100 que conlleva a un síndrome inflamatorio de respuesta sistémica. Esta compatibilidad se da por tres razones:
101 primero, debido a los signos clínicos y la alteración de sistemas como el respiratorio, cardiovascular,
102 gastrointestinal y tegumentario; que se alteran tras la exposición a endotoxinas bacterianas, liberando
103 sustancias vasoactivas (histamina, cininas y leucotrienos) (Zachary 2017). Segundo, por el tiempo breve en
104 que se manifestaron los signos clínicos en todas las beceras; característico de este tipo de reacción. Y
105 tercero, la mayoría de los animales que presentaron una reacción adversa fue su primera exposición al
106 antígeno (Fry 2012). El desencadenamiento de estas reacciones es debido a que, las bacterinas, pueden
107 contener endotoxinas como peptidoglicanos, lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS) y otros componentes
108 celulares (Carroll *et al.* 2009). Estas endotoxinas, en general, se consideran de moderada toxicidad, pero los
109 bovinos son particularmente sensibles a éstas (Ellis y Yong 1997, Rashid *et al.* 2009).

110 El porcentaje de muertes presentadas es preocupante, ya que en otros informes las muertes fueron menores
111 (Ellis y Yong 1997, Ramsay *et al.* 2005, Nakayama 2019), lo que puede estar relacionado con una respuesta
112 inadecuada del sistema inmunológico inmaduro de la ternera y a un retraso en la manifestación de los signos

113 clínicos tras la exposición a LPS (Carroll *et al.* 2009, Gelsing y Heinrichs 2017). Esto podría explicar los
114 resultados obtenidos en este reporte a diferencia de otros, donde las edades oscilaron entre tres y siete
115 meses. Solo el reporte de Ellis & Yong (1997) tiene una edad similar. Sin embargo, la raza era diferente y
116 solo informaron una muerte. Futuros estudios deberían encaminarse a buscar una predilección genética a
117 estas reacciones en la raza Holstein-Friesian.

118 Aunque las reacciones adversas se registraron a lo largo del tiempo (hasta los 150 min), la mayoría (17)
119 ocurrieron entre los 60 y 90 min. El mayor número de muertes ocurrió entre los 90 y 120 min. Se observó
120 una correlación entre el aumento del número de muertes a través del tiempo; aunque esta no fue significativa
121 ($R = 0.75$, $p = 0.09$). Se ha observado que después de una hora las concentraciones de TNF- α , IL1 β , cortisol
122 y otras citocinas alcanzan sus concentraciones máximas en presencia de LPS (Carroll *et al.* 2009, Kvidera
123 *et al.* 2017).

124 Otro de los factores que alteran la respuesta inflamatoria es el estrés calórico. Los datos climatológicos
125 mostraron que el día anterior a la bacterización todas las unidades de crianza alcanzaron un ITH alto (\geq
126 81). El día de la inmunización, aunque se realizó antes de las 8:00 (por gestión interna del establo), el 85.7
127 % de los terneros presentaron algún grado de estrés por calor (ITH \geq 69) según la clasificación de Collier *et*
128 *al.* (2012). La edad de los terneros que presentaron reacción adversa fue diferente según el grado de estrés
129 ($p = 0.05$). Los terneros bajo estrés moderado-severo eran mayores (60 d) que los de leve-moderado (40 d)
130 y umbral (32 d) (terneras jóvenes) (Figura 2). Asimismo, el tiempo transcurrido hasta la presentación de la
131 reacción varió según el grado de estrés ($p = 0.01$). Los terneros bajo estrés moderado-severo tardaron más
132 (90 min) en presentar la reacción que aquellos en estrés leve-moderado (73.5 min) y umbral (32.5 min)
133 (Figura 3). Estos resultados muestran que el estrés calórico moderado-severo, afectó a los terneros mayores
134 con un tiempo de aparición del choque más prolongado; y un nivel de estrés más bajo, afectó a los terneros
135 más jóvenes con signos de aparición más rápida. Esto podría estar directamente relacionado con la

136 maduración del sistema inmunológico. Dado que, al nacer, muchos de los componentes inmunitarios
137 esenciales no son funcionales y alcanzan la madurez aproximadamente seis meses después del nacimiento
138 (Tao *et al.* 2012). Por consiguiente, es probable que los terneros más jóvenes sean más susceptibles debido
139 a su sistema inmunológico inmaduro y porque, además, la zona térmica neutra es más estrecha (Bakonyi y
140 Jurkovich 2020).

141 Asimismo, la exposición prolongada a un estrés calórico alto (ITH ≥ 81), como ocurrió el día anterior, pudo
142 haber influido en la aparición del choque; debido a que un estrés alto desencadena la expresión de genes
143 de la respuesta inmune, las vías de señalización como el receptor tipo Toll y receptores de las células T y B.
144 Por lo que, las vías de presentación y procesamiento de antígenos pueden estar sobre regulados (Dahl *et al.*
145 *et al.* 2020); exacerbando el efecto negativo de las endotoxinas y alterando la respuesta a la vacunación (Zhang
146 *et al.* 2014, Bagath *et al.* 2019).

147 De los terneros que presentaron reacción adversa, el 71.4 % fue en la primera exposición al antígeno y el
148 resto en la segunda (28.5 %). Se determinó el efecto del lote del producto sobre la frecuencia de las
149 reacciones: el lote A (51.7 %), B (13.8 %) y C (13.8 %) produjeron el mayor número de reacciones ($X^2 =$
150 124.84 , $GL = 6$, $p = 0.0001$) a diferencia del resto (D 6.9%; E 6.9%; F 3.4 % y G 3.4 %). Es difícil encontrar
151 la causa exacta de las altas reacciones que produjeron los lotes A, B y C respecto a los demás. Aunque
152 puede ser consecuencia de una mala manipulación del producto durante su fabricación, almacenamiento o
153 transporte. Según Richeson *et al.* (2019) estos errores alteran la seguridad de un lote en particular. El mal
154 manejo como exposición a altas o bajas temperaturas, la agitación excesiva o la exposición a la luz
155 ultravioleta, pueden romper las células bacterianas, provocando la liberación de endotoxinas; aumentando
156 así, la probabilidad de efectos adversos (Rashid *et al.* 2009, Confer y Ayalew 2018, Griffin *et al.* 2018,
157 Richeson *et al.* 2019). Para evitar la influencia de ese factor, en este trabajo se aplicaron buenas prácticas
158 al manipular el producto.

159 Por otro lado, el adyuvante también puede desencadenar la reacción adversa. Esta bacterina contenía
160 hidróxido de aluminio como adyuvante. Aunque esta sustancia puede generar una reacción negativa, la
161 respuesta que produce es de hipersensibilidad tipo IV y rara vez produce una reacción adversa sistémica
162 (Ahmad *et al.* 2014, Nilsson *et al.* 2017).

163 El estrés calórico influye en la aparición de las reacciones adversas por bacterinas. En terneras jóvenes, los
164 signos de choque aparecen más rápido con un estrés calórico bajo; a diferencia de las mayores, donde los
165 signos tardan más en aparecer bajo estrés calórico moderado. Sin embargo, en estas últimas, mientras más
166 se tarde en aparecer los signos, parece incrementarse el riesgo de muerte. Es necesaria la vigilancia
167 permanente de los animales inmunizados durante los primeros 150 min y cualquier sospecha de reacción
168 adversa debe tratarse inmediatamente.

169 **LITERATURA CITADA**

170 Ahamad T, Rammah S, Sheweita S, Haroun M, El-Sayed L (2014) Development of Immunization Trials
171 against *Pasteurella multocida*. *Vaccine* 32: 909–917. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.11.068.

172 Bagath M, Krishnan G, Devaraj C, Rashamol VP, Pragna P, Lees AM, *et al.* (2019) The Impact of Heat Stress
173 on the Immune System in Dairy Cattle: A Review. *Research in Veterinary Science* 126: 94–102. DOI:
174 10.1016/j.rvsc.2019.08.011.

175 Bakony M, Jurkovich V (2020) Heat Stress in Dairy Calves from Birth to Weaning. *Journal of Dairy Research*
176 87: 53–59. DOI: 10.1017/S0022029920000618.

177 Buczinski S, Pardon B (2020) Bovine Respiratory Disease Diagnosis: What Progress Has Been Made in
178 Clinical Diagnosis? *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 36: 399–423. DOI:
179 10.1016/j.cvfa.2020.03.004.

180 Carroll JA, Reuter RR, Chadwick CC, Coleman SW, Riley DG, Spiers DE, *et al.* (2009) Profile of the bovine
181 acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. *Innate*
182 *Immunity* 15: 81–89. DOI: 10.1177/1753425908099170.

183 CollierRJ, Hall LW, Rungruang, Zimbleman RB (2012) Quantifying Heat Stress and Its Impact on Metabolism
184 and Performance. University of Arizona. Gainesville. pp 74-83.

185 CONAGUA (2021) Registro de Observaciones Meteorológicas. Dirección General de Cuencas Centrales Del
186 Norte. Torreón, México. <https://www.gob.mx/conagua>. Fecha de consulta 23 de junio de 2021.

187 Confer AW, Ayalew S (2018) *Mannheimia haemolytica* in bovine respiratory disease: immunogens, potential
188 immunogens, and vaccines. *Animal Health Research Reviews* 19: 79–99. DOI:
189 10.1017/S1466252318000142.

190 Dahl GE, Tao S, Laporta J (2020) Heat Stress Impacts Immune Status in Cows Across the Life Cycle.
191 *Frontiers in Veterinary Science* 7: 1–15. DOI: 10.3389/fvets.2020.00116.

192 Ellis JA, Yong C (1997) Systemic adverse reactions in young simmental calves following administration of a
193 combination vaccine. *The Canadian Veterinary Journal* 38: 45–47.

194 Fry DE (2012) Sepsis, Systemic Inflammatory Response and Multiple Organ Dysfunction: The Mystery
195 Continues. *The American Surgeon* 78: 1–8. DOI: 10.1177/000313481207800102.

196 Griffin CM, Scott JA, Karisch BB, Amelia RW, Blanton JR, Kaplan RM, *et al.* (2018) A randomized controlled
197 trial to test the effect of on-arrival vaccination and deworming on stocker cattle health and growth
198 performance. *Bovine Practitioner* 52: 26–33. DOI: 10.1002/ciuz.201700760.

199 Gelsinger SL, Heinrichs AJ (2017) A short review: The immune system of the dairy calf and the importance
200 of colostrum IgG. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research* 5: 104–107. DOI:
201 10.15406/jdvar.2017.05.00144.

202 IBM Corp. Released (2017) IBM SPSS Statistics for Windows. Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.

203 Inbaraj S, Sejian V, Bagath M, Bhatta R (2016) Impact of Heat Stress on Immune Responses of Livestock: A
 204 Review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 39: 459–482.

205 Kvidera SK, Horst EA, Abuajamieh M, Mayorga EJ, Sanz-Fernandez MV, Baumgard LH (2017) Glucose
 206 Requirements of an Activated Immune System in Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*
 207 100: 2360–2374. DOI: 10.3168/jds.2016-12001.

208 Lieberman P, Nicklas RA, Randolph C, Oppenheimer J, Bernstein D, Bernstein J, *et al.* (2015) Anaphylaxis -
 209 a practice parameter update 2015. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 115: 341–384. DOI:
 210 10.1016/j.anai.2015.07.019.

211 Mader T L, Davis MS, Brown-Brandl T (2006) Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle.
 212 *Journal of Animal Science* 84: 712–719. DOI: 10.2527/2006.843712x.

213 MEDCALC Statistical Software (2020) MedCalc Software Ltd. Version 19.2.6. Ostend, Belgium.

214 Nakayama T (2019) Causal relationship between immunological responses and adverse reactions following
 215 vaccination. *Vaccine* 37: 366–371. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.11.045.

216 Nilsson L, Brockow K, Alm J, Cardona V, Caubet CJ, Gomes E, *et al.* (2017) Vaccination and allergy: EAACI
 217 position paper, practical aspects. *Pediatric Allergy and Immunology* 28: 628–640. DOI:
 218 10.1111/pai.12762.

219 Ramsay JD, Williams CL, Simko E (2005) Fatal Adverse Pulmonary Reaction in Calves after Inadvertent
 220 Intravenous Vaccination. *Veterinary Pathology* 42: 492–495. DOI: 10.1354/vp.42-4-492.

221 Rashid A, Rasheed K, Asim M, Hussain A (2009) Risks of vaccination: A review. *Journal of Venomous*
 222 *Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 15: 19–27. DOI: 10.1590/S1678-
 223 91992009000100003.

224 Richeson JT, Hughes HD, Broadway PR, Carroll JA (2019) Vaccination Management of Beef Cattle: Delayed
 225 Vaccination and Endotoxin Stacking. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 35:
 226 575–592. DOI: 10.1016/j.cvfa.2019.07.003.

227 Ring J, Beyer K, Biedermann T, Bircher A, Duda D, Fischer J, *et al.* (2014) Guideline for acute therapy and
228 management of anaphylaxis. *Allergo Journal International* 23: 96-112. DOI: 10.1007/s40629-014-
229 0009-1.

230 Tao S, Monteiro APA, Thompson IM, Hayen MJ, Dahl GE (2012) Effect of late-gestation maternal heat stress
231 on growth and immune function of dairy calves. *Journal of Dairy Science* 95: 7128–7136. DOI:
232 10.3168/jds.2012-5697.

233 Tavares C, Sakata RK (2012) Cafeína para el tratamiento del dolor. *Revista Brasileira de Anestesiología* 62
234 394–401. DOI: 10.1590/S0034-70942012000300011.

235 Zachary JF (2017) Shock. En: Zachary JF, *Pathologic Basis of Veterinary Disease* 6 ed. Elsevier. St. Louis,
236 Missouri pp. 70-72.

237 Zhang FJ, Weng XG, Wang FJ, Zhou D, Zhang W, Zhai CC, *et al.* (2014) Effects of temperature-humidity
238 index and chromium supplementation on antioxidant capacity, heat shock protein 72, and cytokine
239 responses of lactating cows. *Journal of Animal Science* 92: 3026–3034. DOI: 10.2527/jas.2013-6932.

240

241

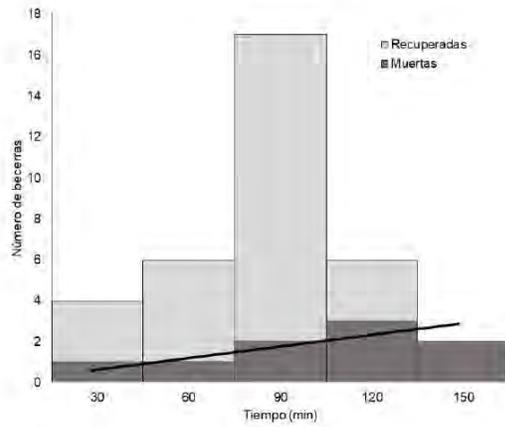
242

243

244

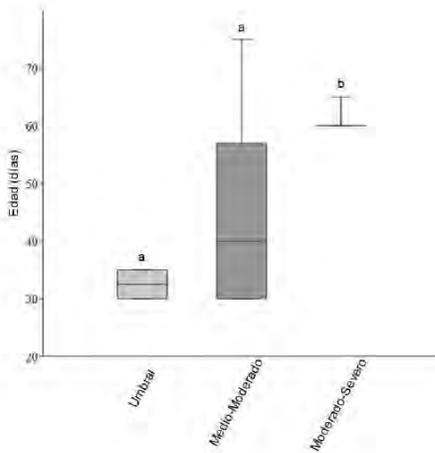
245

246



247

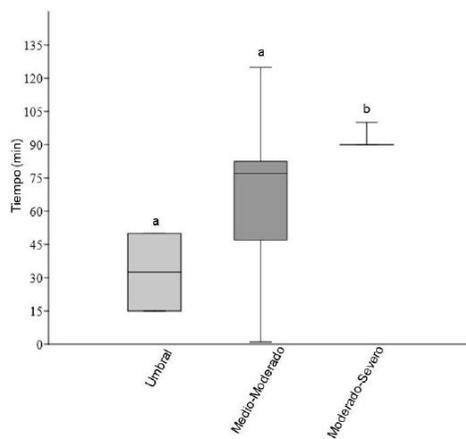
248 **Figura 1. Número de terneras con reacción adversa a través del tiempo. Se presenta la línea de**
 249 **tendencia de la correlación entre el tiempo y la frecuencia de las muertes (R = 0.75).**



250

251 **Figura 2. Edad de las terneras que presentaron reacción adversa bajo estrés calórico. Estrés umbral**

252 (ITH 68-71.9) estrés leve-moderado (ITH 72-79) y estrés moderado-severo (ITH 80-89). Diferentes literales
253 significan diferencia significativa ($p = 0.05$).



254

255 **Figura 3. Tiempo transcurrido hasta que ocurrió una reacción adversa en terneras bajo estrés**
256 **calórico. Estrés umbral (ITH 68-71.9) estrés leve-moderado (ITH 72-79) y estrés moderado-severo (ITH 80-**
257 **89). Diferentes literales significan diferencia significativa ($p = 0.01$).**

258

IV. CONCLUSIONES GENERALES

Las becerras lactantes están expuestas a patógenos y factores ambientales que las hacen susceptibles a enfermedades infecciosas causantes de diarreas y neumonías; la mejor manera de mitigar los efectos deletéreos es a través de la prevención.

Las diarreas causadas por infección de *Cryptosporidium* spp. junto a bacterias oportunistas pueden ser menos graves si se suministran bacteriófagos, porque, se retrasa la aparición de la enfermedad, se mejora la tasa de supervivencia y se disminuyen los días con diarrea. Adicionalmente, se reduce el uso de antibióticos, contribuyendo a la estrategia de mitigar la resistencia bacteriana a estos compuestos. Además, al mejorar la salud de las terneras, también se mejora el estado nutricional.

Hay que considerar el efecto del estrés calórico en la inmunización de las becerras debido a su influencia en la aparición de las reacciones adversas. En terneras jóvenes, los signos de choque aparecen más rápido con un estrés calórico bajo; a diferencia de las mayores, donde los signos tardan más en aparecer bajo estrés calórico moderado. Sin embargo, en estas últimas, mientras más se tarde en aparecer los signos, parece incrementarse el riesgo de muerte. Es necesaria la vigilancia permanente de los animales inmunizados durante los primeros 150 minutos y cualquier sospecha de reacción adversa debe tratarse inmediatamente.

La monensina sódica es una herramienta muy útil para eficientar la ganancia de peso en bovinos. Sin embargo, es fácil cometer errores que conllevan a casos de intoxicaciones por estos ionóforos que resultan en la muerte de muchos animales. Se recomienda tener un minucioso cuidado al manejar este tipo de sustancias.

V. LITERATURA CITADA

- Abedon, S., Kuhl, S., Blasdel, B., & Martin, E. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66–85.
- Ackermann, H. (2011). Under the microscope: Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, May, 90–94.
- Ahmad, T., Rammah, S., Sheweita, S., Haroun, M., & L, E.-S. (2014). Development of immunization trials against *Pasteurella multocida*. *Vaccine*, 32(8), 909–917. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2013.11.068>
- Aleman, M., Magdesian, K. G., Peterson, T. S., & Galey, F. D. (2007). Salinomycin toxicosis in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(12), 1822–1826. <https://doi.org/10.2460/javma.230.12.1822>
- Alomari, M. M. M., Dec, M., Nowaczek, A., Puchalski, A., Wernicki, A., Kowalski, C., & Urban-Chmiel, R. (2021). Therapeutic and Prophylactic Effect of the Experimental Bacteriophage Treatment to Control Diarrhea Caused by *E. coli* in Newborn Calves. *ACS Infectious Diseases*, 7(8), 2093–2101. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00010>
- Andersen, P. H. (2003). Bovine endotoxemia - Some aspects of relevance to production diseases. A review. *Acta Veterinaria Scandinavica, Supplement*, 98, 141–155. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-44-s1-s141>
- Andrade, E. S., Gottschalk, T., Sousa, C. H., & Brianezi, V. M. (2020). Outbreak of monensin poisoning in cattle due to supplementation error. *Ciência Rural*, 50(11), 1–5.
- Ashrafihelan, J., Eisapour, H., Erfani, A. M., Kalantary, A. A., Amoli, J. S., & Mozafari, M. (2014). High mortality due to accidental salinomycin intoxication in sheep. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(3), 173–176. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0024>
- Bagath, M., Krishnan, G., Devaraj, C., Rashamol, V. P., Pragna, P., Lees, A. M., & Sejian, V. (2019). The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. *Research in Veterinary Science*, 126(March), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.011>

- Barr, J. J. (2017). A bacteriophages journey through the human body. *Immunological Reviews*, 279(1), 106–122. <https://doi.org/10.1111/imr.12565>
- Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T. F., Stanton, C. R., Rose, J., Tucci, J., Nittami, T., Vinh, A., Drummond, G. R., Sobey, C. G., Chan, H. T., Seviour, R. J., Petrovski, S., & Franks, A. E. (2019). Bacteriophages in natural and artificial environments. *Pathogens*, 8(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>
- Borie, C., Robeson, J., & Galarce, N. (2014). Lytic bacteriophages in veterinary medicine: A therapeutic option against bacterial pathogens? *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(2), 167–179. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000200002>
- Bouزيد, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M., & Tyler, K. M. (2013). Cryptosporidium pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 115–134. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-12>
- Buczinski, S., & Pardon, B. (2020). Bovine Respiratory Disease Diagnosis: What Progress Has Been Made in Clinical Diagnosis? *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(2), 399–423. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2020.03.004>
- Chamorro, M. F., Cernicchiaro, N., & Haines, D. M. (2017). Evaluation of the effects of colostrum replacer supplementation of the milk replacer ration on the occurrence of disease, antibiotic therapy, and performance of pre-weaned dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 1378–1387. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11652>
- Cho, Y. Il, Han, J. I., Wang, C., Cooper, V., Schwartz, K., Engelken, T., & Yoon, K. J. (2013). Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 166(3–4), 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.001>
- Collier, R. J., Hall, L. W., Rungruang, S., & Zimbleman, R. B. (2012). Quantifying heat stress and its impact on metabolism and performance. *MidSouth Ruminant Nutrition Conference*, 74–84. <https://doi.org/10.1017/S175173111000090X>

- Confer, A. W., & Ayalew, S. (2018). Mannheimia haemolytica in bovine respiratory disease: immunogens, potential immunogens, and vaccines. *Animal Health Research Reviews*, 19(2), 79–99. <https://doi.org/10.1017/S1466252318000142>
- Confer, A. W., Ayalew, S., Montelongo, M., Step, D. L., Wray, J. H., Hansen, R. D., & Panciera, R. J. (2009). Immunity of cattle following vaccination with a Mannheimia haemolytica chimeric PlpE-LKT (SAC89) protein. *Vaccine*, 27(11), 1771–1776. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.028>
- Crouch, C. F., LaFleur, R., Ramage, C., Reddick, D., Murray, J., Donachie, W., & Francis, M. J. (2012). Cross protection of a Mannheimia haemolytica A1 Lkt-/Pasteurella multocida Δ hyaE bovine respiratory disease vaccine against experimental challenge with Mannheimia haemolytica A6 in calves. *Vaccine*, 30(13), 2320–2328. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.063>
- D’Herelle, F. (1931). Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections. *Bulletin of The New York Academy of Medicine*, 7(5), 330–348. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095997/pdf/bullnyacadmed00950-0005.pdf>
- de Carvalho, A. Q., Wisser, C. S., Laskoski, F., Maturana, M. C., Cristani, J., & Traverso, S. D. (2021). Salinomycin intoxication in pigs associated with the use of tiamulin in the State of Santa Catarina, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(3), 1101–1110. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n3p1101>
- Deljou, M., Aslani, M. R., Mohri, M., Movassaghi, A. R., & Heidarpour, M. (2014). Clinical, laboratory and pathological findings in sub-acute monensin intoxication in goats. *Veterinary Research Forum*, 5(3), 161–167.
- Diao, Q. yu, Zhang, R., & Tu, Y. (2017). Current research progresses on calf rearing and nutrition in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(12), 2805–2814. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61767-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61767-2)
- Díaz, P., Navarro, E., Remesar, S., García-Dios, D., Martínez-Calabuig, N., Prieto, A., López-Lorenzo, G., López, C. M., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., & Morrondo, P. (2021). The age-related cryptosporidium

- species distribution in asymptomatic cattle from north-western Spain. *Animals*, 11(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani11020256>
- Dueñas, F., Rivera, D., Toledo, V., Tardone, R., Hervé-Claude, L. P., Hamilton-West, C., & Switt, A. I. M. (2017). Short communication: Characterization of Salmonella phages from dairy calves on farms with history of diarrhea. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 2196–2200. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11569>
- Ensley, S. (2020). Ionophore Use and Toxicosis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 36(3), 641–652. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.07.001>
- Espinosa, L. N., Carrillo, D. I., Gaytán, L., Véliz, F. G., Morán, J., & Delgado, R. A. (2022). Intoxicación accidental por monensina sódica en un ható lechero al norte de México. *Revista Biociencias*, 9(e1363). <https://doi.org/https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1363>
- Ferreira, J. E., Mello, M. R. B., Silva, O. R., Silenciato, L. N., Couto, S. R. B., & Mello, R. R. C. (2020). Weaning weight and optimization of reproductive efficiency in Nelore females subjected to timed artificial insemination. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 49, 1–6.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British Journal of Experimental Pathology*, 10, 226–236.
- Forterre, P. (2017). Viruses in the 21st Century: From the Curiosity-Driven Discovery of Giant Viruses to New Concepts and Definition of Life. *Clinical Infectious Diseases*, 65(suppl 1), s74–s79.
- Gallego del Sol, F., Penadés, J. R., & Marina, A. (2019). Deciphering the Molecular Mechanism Underpinning Phage Arbitrium Communication Systems. *Molecular Cell*, 74(1), 59-72.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.025>
- Gutiérrez-Fernández, D., Fernández-Llamas, L., Rodríguez-González, A., & García-Suárez, P. (2020). Bacteriófagos y endolisinas en la industria alimentaria. *Arbor*, 196(795), 1–11.

- Heinrichs, A. (2017). A Short Review: The Immune System of the Dairy Calf and the Importance of Colostrum IgG. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5(3), 104–107. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00144>
- Hermoso, J., García, J., & García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 10(5), 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.08.002>
- Hobbs, Z., & Abedon, S. T. (2016). Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with “Lytic or lysogenic.” *FEMS Microbiology Letters*, 363(7), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw047>
- Hommerich, K., Ruddat, I., Hartmann, M., Werner, N., Käsbohrer, A., & Kreienbrock, L. (2019). Monitoring Antibiotic Usage in German Dairy and Beef Cattle Farms—A Longitudinal Analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00244>
- Huczynski, A., Stefanska, J., Przybylski, P., Brzezinski, B., & Bartl, F. (2008). Synthesis and antimicrobial properties of Monensin A esters. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(8), 2585 – 2589.
- Jansen, M., Wahida, A., Latz, S., Krüttgen, A., Häfner, H., Buhl, E., Ritter, K., & Horz, H. (2018). Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 8(14140).
- Jean-Michel, C. (2006). Viruses take center stage in cellular evolution. *Genome Biology*, 7(6).
- Jeong, S., Jo, N., Lee, J. J., Lee, J. H., Kam, D. K., Seo, J., Kebreab, E., & Seo, S. (2021). Effects of β -mannanase and bacteriophage supplementation on health and growth performance of holstein calves. *Animals*, 11(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani11020372>
- Jin, Y., Hu, Y., Han, D., Wang, M. (2011). Chronic heat stress weakened the innate immunity and increased the virulence of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 in mice. *Journal Biomedical Biotechnology*, 2011.
- Kadhila, N. (2009). *Characteristics and classification of living organisms* (No. 978-0-521-68054-7).

https://assets.cambridge.org/97805216/80547/excerpt/9780521680547_excerpt.pdf

- Lambert, G. P. (2009). Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *Journal of Animal Science*, 87(14 Suppl), 101–108. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1339>
- López, A., Martínez, L., Martínez, I., Romero, L., Salas, G., Trigo, F., Valero, G., & Vanda, B. (2017). *Patología general veterinaria* (6ta ed.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Low, C. X., Tan, L. T. H., Mutalib, N. S. A., Pusparajah, P., Goh, B. H., Chan, K. G., Letchumanan, V., & Lee, L. H. (2021). Unveiling the impact of antibiotics and alternative methods for animal husbandry: A review. *Antibiotics*, 10(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050578>
- Łowicki, D., & Huczyński, A. (2013). Structure and antimicrobial properties of monensin a and its derivatives: Summary of the achievements. In *BioMed Research International* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/742149>
- Luque, A., Benler, S., Lee, D., Brown, C., & White, S. (2020). The Missing Tailed Phages: Prediction of Small Capsid Candidates. *Microorganisms*, 8(12), 1–18.
- Mbarga, J. A., Adjele, B. J. J., Souadkia, S., Podoprigora, I. V, Anyutoulou, K. L. D., Ntadoum, K. C. I., Azebaze, A. F. S., Smolyakova, L. A., Yashina, N. V, & Bassa, Z. C. (2022). Short review on the potential alternatives to antibiotics in the era of antibiotic resistance. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(1), 029–040. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.120102>
- McGill, J. L., & Sacco, R. E. (2020). The Immunology of Bovine Respiratory Disease: Recent Advancements. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 36(2), 333–348. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.002>
- McGrath, B. A., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., & Kelly, A. L. (2016). Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Science and Technology*, 96(2), 133–158. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0258-x>
- Mee, J. (2008). Newborn Dairy Calf Management. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 24(1), 1–17.

- Nasr, E. M., & Meghawery, M. A. (2007). Studies on Diarrhea in Calves with Emphasis on the Role of Clostridium Perfringens and Escherichia Coli. *Research Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2, 28–33.
- Nilsson, A. S. (2014). Phage therapy-constraints and possibilities. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 192–198. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.902878>
- Nobrega, F., Vlot, M., P, de J., Dreesens, L., Beaumont, H., Lavigne, B., Dutilh, B., & Brouns, S. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature*, 16, 760–773.
- Oliveira, V. H. S., Dall Agnol, A. M., Fritzen, J. T. T., Lorenzetti, E., Alfieri, A. A., & Alfieri, A. F. (2020). Microbial diversity involved in the etiology of a bovine respiratory disease outbreak in a dairy calf rearing unit. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 71(February). <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101494>
- Omidi, A., Aslani, M. R., Movassaghi, A. R., Mohri, M., & Dadfar, M. (2008). Case Report Rapport de cas Accidental salinomycin intoxication in calves. *Canadian Veterinary Journal*, 51, 1143–1145.
- Palma, E., Tilocca, B., & Roncada, P. (2020). Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine: An Overview. *International Journal of Molecular Science*, 21(6), 1914.
- Pradeu, T., Kostyrka, G., Dupré, J., Pradeu, T., Kostyrka, G., & Dupré, J. (2016). Understanding Viruses: Philosophical Investigations. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences, Elsevier*, 50, 57–63.
- Principi, N., Silvestri, E., & Esposito, S. (2019). Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in Pharmacology*, 10(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00513>
- Rammelkamp, C., & Maxon, T. (1942). Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin. *Exp Biol Med*, 51, 386.
- Rashid, A., Rasheed, K., Asim, M., & Hussain, A. (2009). Risks of vaccination: A review. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical*

- Diseases*, 15(1), 19–27. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000100003>
- Richeson, J. T., Hughes, H. D., Broadway, P. R., & Carroll, J. A. (2019). Vaccination Management of Beef Cattle: Delayed Vaccination and Endotoxin Stacking. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 35(3), 575–592. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.07.003>
- Rocha, V. J., Gonzalez, R., & Avila, R. (2019). Economic impact of mortality and morbidity from diseases in dairy calves. *Abanico Veterinario*, 9(December), 1–7.
- Roder, J. D. (2011). Ionophore Toxicity and Tolerance. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27(2), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.02.012>
- Roux. (2007). On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. *Research in Microbiology*, 158, 553–554. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.005>
- Rozza, D. B., Vervuert, I., Kamphues, J., Da Cruz, C. E. F., & Driemeier, D. (2006). Monensin toxicosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(5), 494–496. <https://doi.org/10.1177/104063870601800515>
- Ryan, U. M., Feng, Y., Fayer, R., & Xiao, L. (2021). Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021). *International Journal for Parasitology*, 51(13–14), 1099–1119. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2021.08.007>
- Ryan, U., Paparini, A., Monis, P., & Hijjawi, N. (2016). It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*, 105, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.013>
- Resolución 1012/2022: Prohíbe el registro, fabricación, importación, distribución, venta, tenencia y uso de los siguientes antimicrobianos y deroga resolución N° 5.340 exenta, de 2020, (2022). <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1173213>
- Saga, T., & Yamaguchi, K. (2009). History of antimicrobial agents and resistant

- bacteria. *Japan Medical Association Journal*, 52(2), 103–108.
- Santin, M. (2020). Cryptosporidium and Giardia in ruminants. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 36(1), 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.005>
- Sanz-Gaitero, M., Seoane-Blanco, M., & van Raaij, M. J. (2019). Structure and Function of Bacteriophages. In D. H. et Al (Ed.), *Bacteriophages*. Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_1
- Sarker, S. A., McCallin, S., Barretto, C., Berger, B., Pittet, A. C., & Sultana. (2012). Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology*, 434(1), 222–232.
- Sateriale, A., Gullicksrud, J. A., Engiles, J. B., McLeod, B. I., Kugler, E. M., Henao-Mejia, J., Zhou, T., Ring, A. M., Brodsky, I. E., Hunter, C. A., & Striepen, B. (2021). The intestinal parasite Cryptosporidium is controlled by an enterocyte intrinsic inflammasome that depends on NLRP6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(2). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2007807118/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Senevirathne, N. D., Anderson, J. L., & Rovai, M. (2018). Growth performance and health of dairy calves given water treated with a reverse osmosis system compared with municipal city water. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 8890–8901. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-14800>
- Sinski, E., & Behnke, J. (2004). Apicomplexan parasites: environmental contamination and transmission. *Polish Journal of Microbiology*, 53(1), 67–73.
- Soberón, F. (2012). *Early life nutrition of dairy calves and its implications on future milk production*. Cornell University.
- Soberón, F., & Van Amburgh, A. (2016). Forjando su futuro – El valor de una becerra saludable. In *Cornell University*.
- Squires, R. A. (2018). Bacteriophage therapy for management of bacterial infections in veterinary practice: what was once old is new again. *New Zealand Veterinary Journal*, 66(5), 229–235. <https://doi.org/10.1080/00480169.2018.1491348>

- Summers, W. (1999). *Félix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology*. Yale University Press.
- Tao, S., Monteiro, A. P. A., Thompson, I. M., Hayen, M. J., & Dahl, G. E. (2012). Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *95*(12), 7128–7136. <https://doi.org/10.3168/JDS.2012-5697>
- Thompson, R., Olson, M., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M., & Hijjawi, N. (2005). Cryptosporidium and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, *59*, 127–158.
- Thomson, S., Hamilton, C. A., Hope, J. C., Katzer, F., Mabbott, N. A., Morrison, L. J., & Innes, E. A. (2017). Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*, *48*(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0447-0>
- Tomley, F., & Soldati, D. (2001). Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends in Parasitology*, *17*(1), 81–88.
- Trigo, F. J., & Germán, E. (2015). *Patología sistémica veterinaria* (S. de D. Institucional (ed.); 6ta ed.). UNAM publisher.
- Ul-Haq, I., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: A review. *Virology Journal*, *9*(9), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>
- USDA. (2021). Morbidity and Mortality in U . S . Preweaned Dairy Heifer Calves. *Animal and Plant Health Inspection Service*, 1–6. https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy17/morb-mort-us-prewean-dairy-heifer-nahms-2014.pdf
- Van Belleghem, J. D., Clement, F., Merabishvili, M., Lavigne, R., & Vaneechoutte, M. (2017). Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* phages. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08336-9>
- Van Belleghem, J. D., Dąbrowska, K., Vaneechoutte, M., Barr, J. J., & Bollyky, P.

- L. (2019). Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system. *Viruses*, 11(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/v11010010>
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A., & Kumar, S. H. (2021). Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antibiotics*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>
- Zachary, J. (2022). *Pathologic basis of veterinary disease* (Seventh). Elsevier.
- Zampara, A., Ahern, S. J., Briers, Y., Brøndsted, L., & Sørensen, M. C. H. (2020). Two distinct modes of lysis regulation in campylobacter fletcher virus and firehammervirus phages. *Viruses*, 12(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/v12111247>