



Determinación de patógenos gastrointestinales en becerros neonatos Holstein tratados con fermentos de *Saccharomyces cerevisiae*

Sonia Vazquez Flores¹, Consuelo Alexandra Tejas Yáñez¹, Stephany Barrera Almanza Barrera Almanza¹, Rodrigo Alberto Jiménez Moreno Jiménez Moreno¹, Lucía Karina Cornejo Peña¹ y Ma. del Refugio Amado Flores².

¹ESIABA-Tecnológico de Monterrey-Campus Querétaro, Querétaro, Qro. ² Universidad Autónoma de Querétaro svazquef@itesm.mxsvazquef@itesm.mx

RESUMEN

Tres de los patógenos más frecuentes de la etapa neonatal de becerros Holstein son 1) *E. coli* de mayor prevalencia asociado a diarrea en neonatos; 2) *Salmonella* spp. de los microorganismos más persistentes en el ambiente dentro de los hatos lecheros, causante de diarreas y neumonías; y 3) *Cryptosporidium* spp., zoonosis de relevancia mundial causante de enteritis en humanos y animales. *Campylobacter* spp., patógeno no identificado en ganado lechero en México, se agregó a este estudio para identificar su presencia y comportamiento, dado que es una importante zoonosis. Este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de fermentos de levadura sobre los patógenos más comunes aislados de becerras en lactancia. El experimento consistió en estudiar tres grupos de 20 hembras Holstein desde el nacimiento hasta 28 días. Recibieron tratamiento 1: fermentos de levadura (T1); tratamiento 2: manano-oligosacáridos (T2) y placebo (P) en calostro, leche y concentrado. Se realizaron pruebas microbiológicas ciegas para aislamiento, tinción y cuantificación en dos laboratorios. Los resultados arrojados por este estudio determinan la presencia de los cuatro patógenos desde el día 0 hasta el día 28. Las becerras del T1 presentaron en el día 10 de nacidos un diferencia significativa (valor $P > 0.05$) sobre T2 y P en cuanto a la presencia de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. al analizarse por medio pruebas de Wilcoxon y comparaciones múltiples (Hsu). Las becerras sin diarrea representaron el 10%, 15% y 20% respectivamente para los T1, T2 y P, sin diferencias estadísticas. Una muestra de 9 animales por tratamiento identificó que entre los días 10 y 14 el T2 presentaron más oocistos de *Cryptosporidium* spp. que en el placebo y T1 (valor- $P > 0.05$) por ANOVA. Los días promedio de presencia de diarreas fueron 12.5 ± 6.95 . Los fermentos de levadura permiten un mejor control de las interacciones bacterianas y *Cryptosporidium* spp., entre los días 10 y 14 de vida periodo durante la mayor presencia de diarreas en las becerras, que representan los días de mayor riesgo en su vida productiva.

1. INTRODUCCIÓN

Las diarreas infecciosas son un problema común de morbilidad y mortalidad en neonatos, usualmente son producidas por cuadros complejos de patógenos relacionados a problemas gastrointestinales. Estos patógenos pueden estar predispuestos por factores como el manejo animal, una contaminación ambiental de patógenos y un deficiente desarrollo inmunológico a causa de un calostro con niveles bajos de inmunoglobulinas (Radostis, 2007).

Los patógenos relacionados a las diarreas infecciosas de relevancia en cuanto a costo de tratamiento profilácticos y terapéuticos e impacto en el establo lechero son cuatro: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Cryptosporidium* spp. y *Campylobacter* spp.



Colibacilosis es una de las causas de mortalidad en recién nacidos (Rebhun, 1985), es producida principalmente por *Escherichia coli*, patógeno que destruye las microvellosidades del intestino delgado lo que resulta en la liberación de citotoxinas. Los principales signos que presentan son: deshidratación, debilidad, fiebre, semblante depresivo, aumento de la peristalsis, distensión abdominal, mucosa nasal y oral parece estar seca y un débil reflejo de succión (Foster, 2009). El diagnóstico clínico involucra la apariencia de la diarrea la cuál suele ser voluminosa, acuosa, heces de color verde, amarillo o blanco, algunas veces las heces presentan espuma (Rebhun, 1985). Los principales factores de riesgo que predisponen el patógeno es el estiércol de su madre al momento del parto y el ambiente de la maternidad (Foster, 2009).

La salmonelosis puede ser provocada por un estrés nutricional, transporte en malas condiciones, por contagio directo de la madre a los neonatos o por hacinamiento, es generada por *Salmonella* spp. (Kahn, 2007). Afecta principalmente el intestino delgado, el ciego y el colon. Suele aparecer a partir de los 7 y permanecer por el resto de su vida productiva. Los signos intestinales son: fiebre, diarrea y deshidratación. Las diarreas provocadas por este patógeno muestran manchas, coágulos de sangre o mucosa intestinal en las evacuaciones (Kahn, 2007). *Salmonella enteritica serovar typhimurium* es el patógeno más común relacionado a brotes de diarreas entéricas en becerros con menos de 60 días de vida ((Foster, 2009).

Campilobacteriosis es una importante causa de enteritis en los seres humanos, se ha relacionado con problemas reproductivos en ganado y considerada una importante zoonosis, principalmente transmitida por aves y perros (Smith & Smith, 2009). La principal vía de transmisión es oral para *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* a través de heces, descargas vaginales, fetos abortados y membranas fetales, semen, o factores de manejo animal como herramienta contaminada, ropa, entre otros. También existen vectores como roedores y moscas que lo transmiten. Las vacas y toros pueden ser portadores sanos. Las diarreas producidas por estos patógenos muestran diarreas voluminosas, con manchas ocasionales de sangre, mucosa, los becerros podrían presentar fiebres (Smith & Smith, 2009).

El estudio de *Cryptosporidium* es de gran relevancia ya que se trata de zoonosis mundial causante de enteritis en humanos y animales. Este parásito tiene la capacidad de infectar células epiteliales del tracto digestivo en todas las clases de vertebrados (Fayer y Xiao, 2007). Después de la esporulación de los ooquistes, las distintas etapas del parásito se unen a los bordes de las microvellosidades del hospedero. Usualmente, este parásito ha sido encontrado en asociación con diferentes microorganismos entéricos, pero en ocasiones, las excreciones de los ooquistes a través de las heces fecales no revelan la presencia de otro tipo de microorganismos con los cuales podría asociarse *Cryptosporidium* (Angus et al., 1988). Debido al mecanismo propio de supervivencia del parásito, los ooquistes pueden estar dispersos en el ambiente por largos periodos de tiempo, siendo resistentes a diferentes tipos de estrés así como desinfectantes químicos.

La infección en animales comienza con la ingestión o inhalación de los ooquistes, siendo el intestino delgado el sitio primario de la infección, la cual es causante de mala absorción y diarrea en los becerros neonatos (Fayer y Xiao, 2007).

Las diarreas son uno de los factores que impide un buen desarrollo de los becerros neonatos y los hace susceptible a enfermedades durante su crecimiento que se ven reflejados en su producción en la etapa adulta. Es por esto, que este el siguiente proyecto tiene como objetivo ofrecer una alternativa para el control de los patógenos gastrointestinales que están presentes en becerros neonatos Holstein tratados con fermentos de *Saccharomyces cerevisiae*.



2. METODOLOGÍA

Se realizaron dos estudios simultáneos en dos establos lecheros en diferente sitio, con características similares en cuanto a número de animales estudiados y la dieta. Los grupos de estudio fueron conformados por 20 becerros, que se asignaron aleatoriamente al grupo de estudio conforme el orden de nacimiento: en el Sitio 1 se compararon tres grupos: Tratamiento 1, Tratamiento 2 y Placebo; en el Sitio 2 se analizaron dos grupos Tratamiento 1 y Placebo. El criterio de inclusión fue becerros de raza Holstein, recién nacidas con pesos entre 35 y 45 kg. sin malformaciones, ni provenientes de distocias. A cada becerro se le tomaron muestras de heces que fueron analizadas en un laboratorio de Microbiología privado en un estudio ciego, y otro grupo en el laboratorio de Diagnóstico Molecular del Tecnológico de Monterrey campus Querétaro. Al primero, se enviaron tres muestras de cada animal colectadas en medio de Stuart (días 1, 10, 28). Se realizó aislamiento y cuantificación de *E. coli*, *Salmonella* spp., y *Campylobacter* spp.. Al segundo cinco muestras (días 1, 7, 10, 14 y 28) durante su primer mes de edad. En el segundo laboratorio se realizaron pruebas parasitológicas de tinción y cuantificación, esta última por medio del sistema modificado de Arrowood & Sterling utilizando solución Sheather's y conteo en microscopio con cámara de Neubauer objetivo 40x. El estudio fue doblemente ciego, para las personas que ofrecieron los productos a los becerros así como para el personal del laboratorio.

3. RESULTADOS

Para analizar la información se hicieron tablas de Excel que permitieran ver la información de manera clara y puntual. La Tabla 1 muestra la cantidad de casos de diarreas relacionadas con patógenos como *E.coli*, *Salmonella* y *Campylobacter* y el número de diarreas detectadas como infecciosas tanto en el sitio 1 y 2. En la Tabla 2 se muestran los resultados del estudio estadístico de las relaciones de patógenos encontradas en ambos sitios, el índice de correlación positivo indica que existe un efecto directo de un patógeno sobre el otro y viceversa.

Tabla 1. Comparación de los dos sitios en cuanto al número de casos detectados de diarreas infecciosas y el número de casos registrados de actividad patogénica.

Tratamiento	# de casos por patógenos por tratamiento		# de diarreas por tratamiento	
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 1	Sitio 2
Sitios de estudio	<i>Sitio 1</i>	<i>Sitio 2</i>	<i>Sitio 1</i>	<i>Sitio 2</i>
Tratamiento 1	52	51	8	10
Placebo	54	53	10	6
Tratamiento 2		60		10

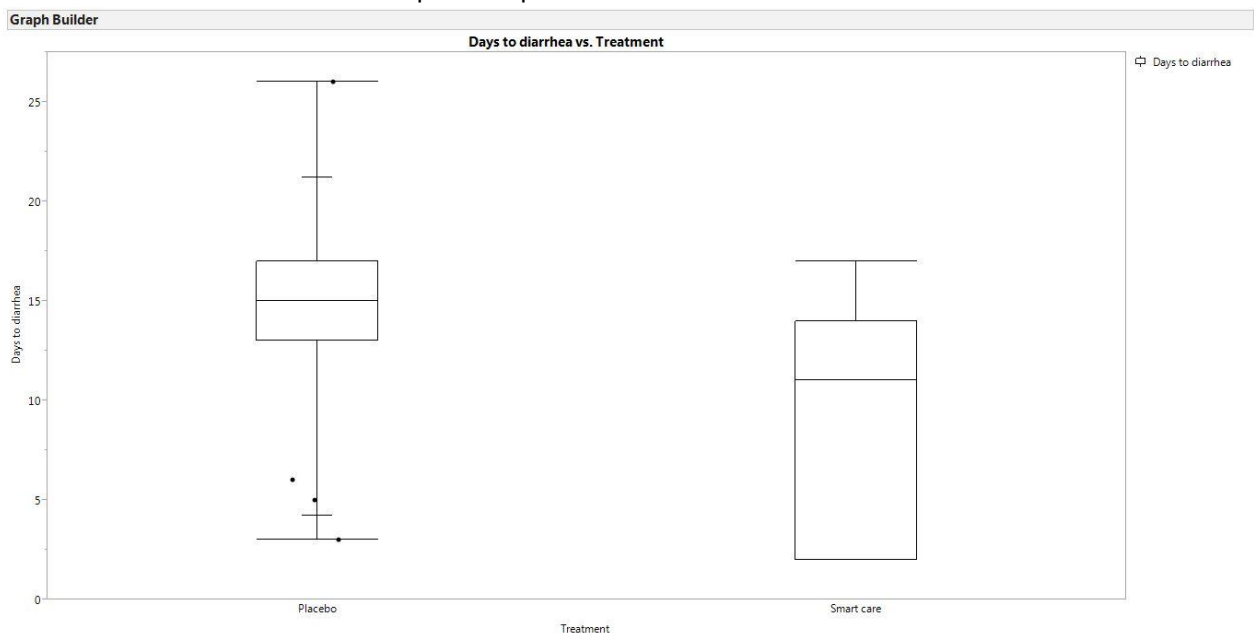


Tabla 2. Principales relaciones de patógenos con un índice de correlación positivo

Relación de patógenos	Sitio de estudio	Índice de Correlación
<i>E.coli- Klebsiella</i>	Sitio 1	+0.10200
<i>Klebsiella- E. coli</i>	Sitio 2	+0.18890
<i>Klebsiella- Salmonella</i>	Sitio 1	+0.39679
<i>Salmonella - E. Coli</i>	Sitio 1	+0.40600
<i>Campylobacter- Salmonella</i>	Sitio2	+0.69330

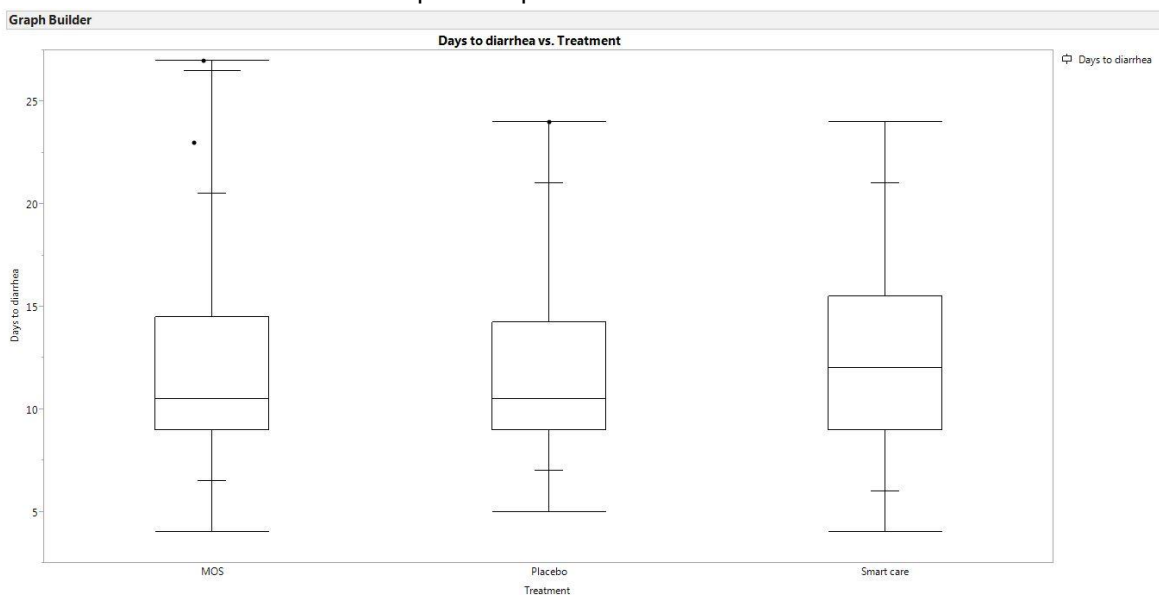
Se realizaron gráficos de caja con la finalidad de visualizar el conjunto de datos obtenidos por tratamiento y sitio respecto al número de días que duraban las diarreas con la finalidad de conocer la dinámica de los patógenos en cada uno de los sitios y los tratamientos. La Gráfica 1. Muestra los días de diarrea en el Sitio 1, como se puede observar el tratamiento P muestra al menos 3 valores atípicos lo que indica que los 3 de los animales con diarreas presentaron una variación significativa en los días de diarrea respecto al número de animales total que presentaron días promedio. Por su parte T1, presenta un gráfico donde los datos son dispersos ya que sus cuartiles son diferentes comparados con su media lo que indica que el tratamiento presento variabilidad en los días de diarrea.

Gráfica 1. Días para la aparición de las diarreas en el Sitio 1





Gráfica 2. Días para la aparición de las diarreas en el Sitio 2



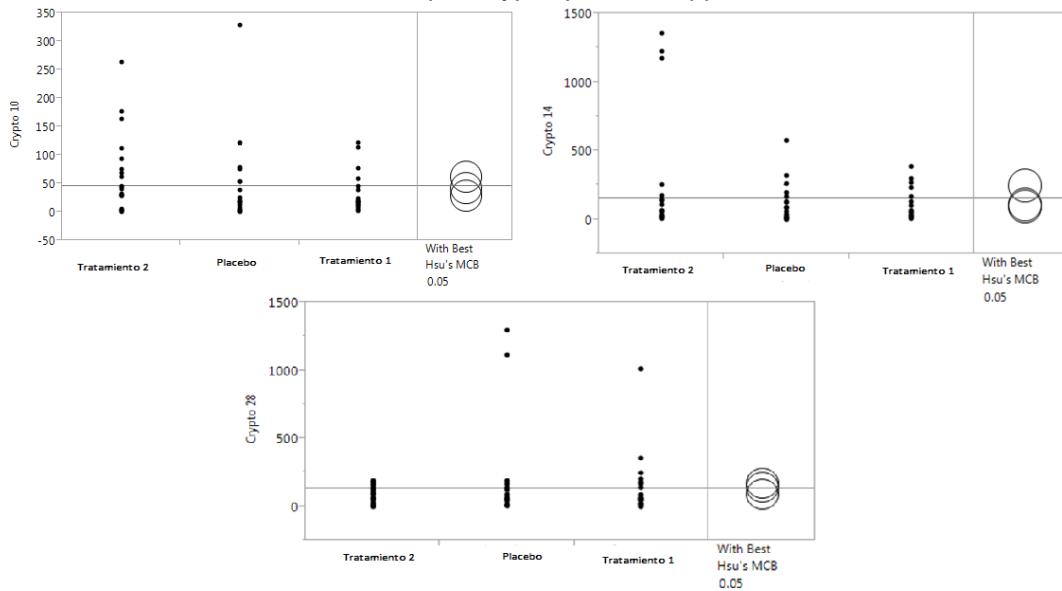
Respecto al sitio 2, se puede observar en la Gráfica 2 que en los tres tratamientos evaluados que el número de días en diarreas en los becerros Holstein es variable, pues los tres gráficos presentan cuartiles asimétricos sin embargo, el T2 presenta puntos atípicos e índices máximos y mínimos más altos comparados con P y T1 lo que indica que la duración de días en diarrea para este tratamiento podría ser mayor a su promedio y al de los otros tratamientos. Respecto a P vs T1, se puede observar que T1 tiene cuartiles asimétricos y que sus mínimos y máximos superan al P, lo que indica que T1 presentan un mayor tiempo de duración de las diarreas en becerros Holstein respecto al P y un menor respecto a T2.

Los días en diarrea para el Sitio 1 fueron 12.5 ± 6.95 , mientras que para el Sitio 2 fueron 12.72 ± 5.97 , esto indica una similitud en los días en que la diarrea es más frecuente y los tiempos en donde los patógenos deben controlarse más para no causar un mayor detrimento en la salud y productividad de los becerros, puesto que está relacionado con la edad donde estos animales empiezan a producir su propia inmunidad puesto que la inmunidad pasiva recibida por el calostro está en su punto más bajo en el torrente sanguíneo.

Para el estudio de *Cryptosporidium* spp. Se identificó una presencia del 100% en ambos sitios de estudio. En la gráfica 3 para el Sitio 1 se muestra como hay un número menor de oocistos para el Tratamiento 1 en los días 10 y 14 de vida del becerros, lo que indica que no está contribuyendo a las diarreas, en un comportamiento similar a *Salmonella* y *Campylobacter* spp. Para el Sitio 2 no se identificó ninguna diferencia por grupo en este mismo periodo. Para el día 28 hay un repunte de producción de oocistos, en el momento que ya no es detrimental para la salud del becerro.



Gráfica 3. Comportamiento del número de oocistos excretados por *Cryptosporidium* spp en el Sitio 1.



4. CONCLUSIONES

Con la realización de este experimento se pudo determinar que los dos sitios de experimentación “Rancho Fuentezuelas” y “Rancho la bien aparecida” el uso de Fermentos de *Saccharomyces cerevisiae* tiene un impacto positivo en el número de casos detectados por diarrea causadas por algún patógeno.

En la tabla 1 se puede concluir que el uso del tratamiento 1 para los dos sitios de experimentación controla el número de casos por patógenos, mientras que el tratamiento 2 el cual solo se aplicó en el sitio 2 causó que una mayor cantidad de animales tuvieran una reincidencia ya que existe una mayor contaminación ambiental lo que causa esta alza en el número de casos. Por otro lado el uso del tratamiento 1 bajo el número de diarreas en el sitio 1 mientras que en el sitio 2 no se vio ninguna ventaja el número de diarreas es mayor a la cantidad presentados por P.

La tabla 2 dos presenta la correlación de patógenos más importantes durante la fase de neonatos en becerros Holstein. Con el análisis estadístico se puede concluir que las condiciones ambientales son favorables para la supervivencia en conjunto de estos patógenos. El índice de correlación nos indica lo antes señalado, cuando este se acerca más al 1 existe una mayor correlación entre los patógenos. El caso con una mayor correlación es *Campylobacter* & *Salmonella* el cual fue encontrado en el sitio 2 el índice de correlación de estos patógenos es de .6933, lo que nos quiere decir que posiblemente *Campylobacter* aparecerá donde esté presente *Salmonella* de igual forma que las condiciones para su desarrollo son muy similares y la relación de estos patógenos produzca diarrea en los neonatos en ambos sitios.

Los fermentos de levadura permiten un mejor control de las interacciones bacterianas y *Cryptosporidium* spp., entre los días 10 y 14 de vida periodo durante la mayor presencia de diarreas en las becerras, que representan los días de mayor riesgo en su vida productiva.



La gráfica 1 presenta días en diarrea que se presentaron en el sitio 1 dependiendo del tratamiento que se aplicó a los becerros se puede ver que en el caso de P presenta cuartiles mejor distribuidos y cercanos a la media aunque se tengan algunas excepciones, lo que indica que los días en diarrea de los animales que recibieron este tratamiento estaban cercanos a la media del tratamiento lo que nos da indicios que el comportamiento de los patógenos en este tratamiento es continuo y no sufre cambios brusco de control. Por su parte el T1 los datos están más dispersos que en el primer caso lo cual quiere decir que los cuartiles están más dispersos a la media lo que causa una variación en los días en diarrea.

La gráfica 2, presenta claramente la diferencia de la duración de las diarreas en los neonatos durante los 28 días, como se puede observar, T2 comparado con P, presentan mayores días de duración de las diarreas y puntos atípicos lo que indican que existen animales con un menor número de días en diarrea comparado con su media y también animales con mayores días de duración comparado con su media que se acerca a los 15 días. Respecto a T1 y P, se muestra que T1 presentó animales con diarreas que superaron su media que se acerca a 16 días, sin embargo sus valores máximos son menores comparados con T2 que llegó a presentar un caso de diarrea superior a los 25 días. En conclusión T1 y T2 presentan casos de diarrea infecciosa con mayor duración comparados con P, sin embargo de ambos tratamientos, T1 presentan menores días de duración respecto a T2.

En la producción lechera uno de los factores que más influye tanto en costo de producción como en la proyección de la producción es la capacidad del establo y su personal de generar becerros de reemplazo inmunológicamente fuertes (Radostis, Clive, Kenneth & Constable, 2007). Es por esto que el manejo animal y la calidad de calostro y el ambiente podrían estar relacionados con los problemas de patógenos en ambos lados lo que debe seguir siendo estudiado pues podrían presentarse casos de zoonosis o epidemias de patógenos que podrían acabar con el sector. Estos factores si fueron estudiados, sin embargo, dicha información no fue incluida en este documento. Los fermentos de levadura permiten un mejor control de las interacciones entre *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Cryptosporidium* spp., entre los días 10 y 14 de vida periodo durante la mayor presencia de diarreas en las becerros, que representan los días de mayor riesgo en su vida productiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Trotz-Williams, L. A., A. S. Peregrine, and K. E. Leslie. "Cryptosporidiosis in dairy calves: risk factors, diagnosis, and zoonotic potential." *Large Animal Veterinary Rounds* 7.4 (2007): 1-6.
- Foster, D.M. and Smith G. (2009) Pathophysiology of Diarrhea in Calves. In *Bovine Neonatology. Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, Volume 25, Issue 1, 13 - 36
- Fayer, R., & Xiao, L. (Eds.). (2007). *General Biology Chapter 1. at Cryptosporidium and cryptosporidiosis.* page 1-2 CRC press.
- Arrowood, M. J., & Sterling, C. R. (1987). Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *The Journal of parasitology*, 314-319.
- Rebhun, W. (1985). *Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero*. España: Acribia.
- Kahn, C. (2007). *Manual Merck de veterinaria Volumen 1*. México:Océano.



Geof W. Smith, D. M. (2009). Veterinary clinics of North America, food Animal Practice Bovine Neonatology .pp 37-38 Philadelphia: Guest Editor.

The Center for Food Security and Public Health and the Institute for International Cooperation in Annual Biologics (2013). Zoonotic Campylobacteriosis. Recuperado de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/campylobacteriosis.pdf>

Radostis, O., Gay, C., Hinchcliff, K. and P. Constable. (2007). Veterinary Medicine. 10a Ed. Pp 146-160, 896-897, 847-854, 1085, 754-756, 775-777, 1081-1082, 1265-1266, 260-265. China: Saunders Elsevier.

Gil, F.(2010). Fase preliminar de un proyecto de investigación. Scielo España. Recuperado de <http://scielo.isciii.es/pdf/albacete/v3n1/especial2.pdf>