



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN PRODUCTO FORMULADO  
A BASE DE BACTERIÓFAGOS, SOBRE DIARREAS NEONATALES  
Y PESO AL DESTETE EN TERNERAS HOLSTEIN DE LA ZONA  
CENTRAL DE CHILE**

**Natalia Isabel Alvial Cabrera**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: MARIO DUCHENS ARANCIBIA  
Universidad de Chile

Financiamiento: VETNOVO, EIP-2014

SANTIAGO, CHILE  
AÑO 2015



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN PRODUCTO FORMULADO  
A BASE DE BACTERIÓFAGOS, SOBRE DIARREAS NEONATALES  
Y PESO AL DESTETE EN TERNERAS HOLSTEIN DE LA ZONA  
CENTRAL DE CHILE**

**Natalia Isabel Alvial Cabrera**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

NOTA FINAL: .....

FIRMA

PROFESOR GUÍA:	MARIO DUCHENS ARANCIBIA	.....
PROFESORA CONSEJERA:	M <sup>a</sup> SOL MORALES SILVA	.....
PROFESOR CONSEJERO:	CARLOS NÚÑEZ POBLETE	.....

SANTIAGO, CHILE  
AÑO 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en el desarrollo de la presente memoria.

Al Dr. Mario Duchens, por facilitarme la realización de esta investigación, por su confianza, entusiasmo, alegría, consejos y amistad.

A la Dra. María Sol Morales y al Dr. Carlos Núñez, quienes tuvieron siempre la disposición para ayudarme y fueron excelentes consejeros.

A todas las personas que componen el Departamento de Fomento a la Producción Animal, quienes a diario me entregaron una sonrisa y colaboraron de una u otra forma al cierre de este ciclo.

A todos los trabajadores de ambas lecherías en las cuales trabajé durante esta memoria, por su carisma y maravillosa acogida desde el primer día, principalmente a Coni y a Chino, quienes fueron mis partners todos estos meses.

A mi gran compañero Felipe, por su encanto y paciencia, por llenar de colores mis días y por alentarme constantemente.

A mi hermano, familia y amigos que sin duda es un privilegio tenerlos en esta, y quien sabe ¡en la otra vida! Gracias por la alegría y por tantos momentos vividos.

Y los mayores agradecimientos son para mis grandes guías y amigos, mis amados padres. Gracias por su incondicionalidad, por su apoyo en cada decisión, por cuidar cada paso, por cada consejo, abrazo y cariño. Por su constante preocupación, paciencia, tolerancia, y empatía. Gracias por darme la oportunidad de estudiar y por sobre todo la oportunidad de elegir, son lo máximo!

## INDICE

RESUMEN EJECUTIVO.....	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Diarreas neonatales (DN) en terneras .....	4
1.2. Agentes infecciosos de relevancia para el estudio .....	4
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> como agente causal de DN.....	5
1.2.2. <i>Salmonella spp.</i> como agente causal de DN .....	5
1.2.3. Impactos productivos de DN en terneras de lechería .....	6
1.3. Tratamiento de DN en terneras de lechería.....	6
1.4. Bacteriófagos.....	7
HIPÓTESIS .....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15
CONCLUSIONES .....	23
BIBLIOGRAFÍA .....	24
ANEXOS .....	28

## RESUMEN EJECUTIVO

La diarrea neonatal (DN) es la patología más frecuente y la primera causa de muerte en terneros, generando altas pérdidas en la industria. Los tratamientos más utilizados incluyen el uso de antibióticos de amplio espectro. El uso de antibacterianos específicos podría contribuir al control de esta patología.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un producto comercial formulado a base de bacteriófagos específicos para el control de *E.coli* y *Salmonella* spp., sobre la presentación de DN y peso al destete en terneras Holstein de la zona central de Chile. Para ello, se trabajó en dos lecherías comerciales ubicadas en las regiones de Valparaíso y Metropolitana, donde se asignaron aleatoriamente 80 terneras recién nacidas a dos grupos en cada predio, un grupo control y un grupo experimental. El grupo experimental recibió 0,5 gramos de un controlador microbiológico (Milkeeper S®, Phage Technologies, Santiago, Chile) a base de bacteriófagos específicos contra *E. coli*, *Salmonella panama*, *S. dublin*, *S. mbandaka* y *S. typhimurium*, disueltos en la leche o sustituto, dos veces al día hasta el destete. El grupo control recibió, 0,5 gramos de un placebo a base de almidón disuelto en la leche o sustituto, dos veces al día hasta el destete. Se evaluó en cada ternera el peso al nacimiento, proteínas séricas totales (PST) entre el 3<sup>er</sup> a 5<sup>to</sup> día de vida, peso a los 30, 60 y 75 días aproximadamente, como también se registraron los casos de enfermedad y muertes.

Las incidencias de diarrea no fueron diferentes ( $p=0,79$ ) entre el grupo control (50%) y el grupo experimental (42,5%). Tampoco se observaron diferencias en la mortalidad registrada en el periodo, siendo de 7,5% en el grupo control y de 5% en el grupo experimental. Por otro lado, la duración de los cuadros fue significativamente menor ( $p=0,03$ ) en las terneras tratadas con el bacteriófago ( $5,9 \pm 1,81$  días) que en el grupo control ( $8,5 \pm 4,24$  días) y se observó una tendencia a una menor severidad de las diarreas en las terneras tratadas. Las terneras del grupo experimental tuvieron una tendencia a una mayor ganancia diaria de peso que las del grupo control (628gr/día y 578gr/día, respectivamente;  $p=0,07$ ), y un mayor peso al destete que las del grupo control (82,0 kg y 78,0 kg, respectivamente;  $p=0,03$ ). Se concluye que el producto testado no disminuye en forma significativa la incidencia de DN en terneras, pero sí la duración y la severidad de estas, mejorando significativamente el peso al destete.

Palabras clave: bovino, ternera, diarrea neonatal, bacteriófagos.

## ABSTRACT

The neonatal diarrhea (ND) is the most common disease and the main cause of death in calves, generating high losses in the industry. The most widely used treatments include the use of broad-spectrum antibiotics. The use of specific antibacterials could help to control this disease.

The aim of this study was to evaluate the effect of a commercial product formulated with specific bacteriophages for control of *E. coli* and *Salmonella* spp., on the presentation of ND and weaning weight in Holstein calves of central Chile. The study was conducted in two commercial dairies located in Valparaiso and Metropolitan regions, where 80 newborn calves were randomly assigned to two groups on each farm, a control group and an experimental group. The experimental group received 0.5 grams of a microbiological controller (Milkeeper S®, Phage Technologies, Santiago, Chile) based on specific bacteriophages against *E. coli*, *Salmonella panama*, *S. dublin*, *S. Mbandaka* and *S. typhimurium*, dissolved in milk or substitute, twice a day until weaning. The control group received 0.5 grams of a placebo based on starch dissolved in the milk replacer, twice a day until weaning. Birth weight, total serum protein (TSP) from the 3rd to 5th day of life, weight at about 30, 60 and 75 days, and illness and deaths frequencies were also registered.

The incidences of diarrhea were not different ( $p = 0.79$ ) between the control group (50%) and the experimental group (42.5%). No differences were observed in mortality rates during the period, with 7.5% in the control group and 5% in the experimental group. On the other side, the duration of the episodes of diarrhea was significantly lower ( $p = 0.03$ ) in calves treated with bacteriophage ( $5.9 \pm 1.81$  days) than in the control group ( $8.5 \pm 4.24$  days) and a trend toward a lower severity of diarrhea in treated calves was observed. The calves of the experimental group had a trend to greater daily weight gain than the control group (628gr / day and 578gr / day, respectively;  $p = 0.07$ ), and increased weaning weight than the control group (82.0 kg and 78.0 kg, respectively;  $p = 0.03$ ). It is concluded that the tested product does not significantly decrease the incidence of DN in calves, but affects the duration and severity of that, significantly improving weaning weight.

Key words: bovine, calf, neonatal diarrhea, bacteriophages.

## INTRODUCCIÓN

Las explotaciones ganaderas deben alcanzar una adecuada condición sanitaria y un buen rendimiento productivo para obtener resultados económicos positivos (Millemann, 2009), por lo que los manejos y cuidados preventivos son una parte fundamental para asegurar éxito productivo y reproductivo a largo plazo (USDA, 2010).

En la etapa de crianza, las terneras presentan gran susceptibilidad a diversas patologías que afectan el crecimiento, desarrollo y bienestar animal (Iraira y Canto, 2014), siendo las diarreas neonatales (DN) las más reportadas y la principal causa de mortalidad descrita en neonatos (Bendali *et al.*, 1999; USDA, 2010).

Las DN generan grandes pérdidas económicas en la industria ganadera (Millemann, 2009), posicionándose a nivel mundial como uno de los mayores desafíos para la industria bovina (Lorenz *et al.*, 2011).

Además de los perjuicios económicos causados por altas tasas de morbilidad y mortalidad en los recién nacidos, la enfermedad genera impactos económicos por retrasos en el crecimiento y peso, tratamientos en casos clínicos (Montagner *et al.*, 2014), trabajo adicional de los operarios y pérdida de potencial genético (Millemann, 2009) que repercute en gran parte, en la capacidad futura de las terneras como productoras de leche (Soberon *et al.*, 2012).

La severidad del cuadro depende entre otros factores del agente etiológico que predomina en la infección (Bendali *et al.*, 1999), donde destacan *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. como los de más relevancia. Otros agentes virales como el Rotavirus y Coronavirus, y parasitarios como *Cryptosporidium*, pueden ser causales o concomitantes de la enfermedad (Bendali *et al.*, 1999; Millemann, 2009).

Para combatir las DN, el uso de antibióticos ha sido la primera línea de acción en muchos plantales, transformándose en un factor de riesgo para la generación de resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos (Von Buenau *et al.*, 2005; OMS, 2013). Datos de vigilancia del USDA en el año 2010, indican que en Estados Unidos aproximadamente un 75% del total de terneras que cursó con cuadros de diarrea recibió algún tipo de terapia antibiótica.

Lo anterior ha estimulado la búsqueda de agentes antibacterianos alternativos a los antibióticos, que disminuyan el riesgo para la salud humana y animal (Von Buenau *et al.*, 2005; Maura y Debarbieux, 2011), escenario en el cual los bacteriófagos, luego de años en los que no se consideraron de elección, han resurgido como una alternativa promisoriosa para alcanzar dicho fin (Hungaro *et al.*, 2013).

En relación a la evidencia previa en el caso de *E. coli*, durante la década del 80 se realizaron los primeros trabajos que mostraron la efectividad de los bacteriófagos, luego de tratar con ellos a ratas inoculadas experimentalmente con la bacteria (Smith y Huggins, 1982; Sulakvelidze *et al.*, 2001). Posteriormente se realizaron estudios similares en ovejas, cerdos y terneros (Smith y Huggins, 1983; Sulakvelidze *et al.*, 2001). Para el caso de Salmonella, existen algunos estudios recientes en aves, donde luego del suministro de bacteriófagos, se evidenció una disminución del número de bacterias en el tracto digestivo, concluyendo que es posible considerarlos como una alternativa válida y efectiva (Borie *et al.*, 2008; Hungaro *et al.*, 2013).

En función de la importancia económica y productiva de las DN, como de la creciente necesidad de desarrollar y promover terapias alternativas a los antibióticos, el presente estudio evaluó los efectos de un producto comercial formulado a base de bacteriófagos en la presentación de diarreas bacterianas, así como su efecto en el crecimiento y peso al destete de terneras de lechería.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Generalidades**

La crianza de terneras es una etapa de suma relevancia en todo plantel lechero, dado que existe una importante relación entre el rendimiento predestete y la productividad esperada de la ternera (Iraira y Canto, 2014). De esta manera, el adecuado manejo durante este período, resulta en una inversión para el porvenir productivo del plantel (USDA, 2010).

Resguardar la salud y bienestar presenta varias dificultades, ya que las terneras se enfrentan a numerosos retos desde el primer día de vida (USDA, 2010). Entre algunos de estos desafíos, se encuentra que al nacer carecen de factores inmuno-específicos, deben ser separadas de su madre luego del parto para ser alojadas en jaulas o corrales individuales lo que suscita estados de angustia y estrés (De Paula *et al.*, 2010), deben consumir una cantidad adecuada de calostro de buena calidad lo más temprano posible (Godden, 2008; De Paula *et al.*, 2010) y además enfrentar la presencia de diversos agentes patógenos presentes en el ambiente (De Paula *et al.*, 2010). Esto puede explicar por qué según algunas estimaciones, las terneras previo al destete presentan las tasas más altas de morbilidad y mortalidad en comparación con cualquier otra etapa de la vida productiva de estos animales (USDA, 2010).

El intestino delgado de la ternera recién nacida posee la capacidad de absorber moléculas grandes intactas, como inmunoglobulinas y otras proteínas. Se estima que este proceso se extiende únicamente las primeras 24 horas de vida, y transcurrido este tiempo, ocurre el cierre intestinal. A razón de lo anterior, se sugiere dar a las terneras 2 litros de calostro durante las primeras 2 horas de nacida, para luego suministrar 2 litros adicionales antes de las 6 horas siguientes (Godden, 2008). Una mala o insuficiente entrega de calostro predispone a las terneras a padecer diversas enfermedades, contribuyendo a altas tasas de mortalidad predestete y otras pérdidas a corto y largo plazo asociadas con la salud animal, el bienestar y la productividad (Godden, 2008).

De las enfermedades propias de las terneras predestete, se identifican cuadros como los digestivos y respiratorios, donde cobran especial relevancia los gastroentéricos, como las diarreas neonatales (USDA, 2010).

### **1.1. Diarreas neonatales (DN) en terneras**

La diarrea neonatal es una de las principales causas de muerte de terneras en el mundo y una de las enfermedades que más pérdidas económicas produce en la industria lechera (Bendali *et al.*, 1999; Von Buenau *et al.*, 2005).

Dependiendo del origen de la DN, ésta suele presentarse a partir de las primeras horas de vida, hasta las 6 semanas de edad (Tewari, 2012). Hay una serie de causas infecciosas que originan diarreas neonatales, entre las que se encuentran virus (Rotavirus, Coronavirus), bacterias (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* tipo C) y parásitos (*Criptosporidium* spp., coccidias), que pueden estar presentes ya sea solos o en combinación (Tewari, 2012; Millemann, 2009). Para el caso de las bacterias, destacan *E. coli* y *Salmonella* spp., como las de más relevancia (Millemann, 2009).

Además, existe una serie de causas no infecciosas que pueden condicionar la presentación de DN, entre las que se encuentran una inadecuada nutrición de las hembras preñadas (en particular durante el último tercio de la gestación), la insuficiente atención al ternero recién nacido, una inadecuada cantidad y/o calidad del calostro y/o sustituto lácteo, la exposición a un ambiente severo, el hacinamiento y la falta de saneamiento en el área de parto o una combinación de algunos de estos factores (Tewari, 2012; Von Buenau *et al.*, 2005).

En relación a la prevalencia de esta patología, un estudio realizado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos evidenció que aproximadamente, una de cada 4 terneras previo al destete (23,9%) cursó con algún tipo de cuadro de diarrea. Dentro de las causas de mortalidad de terneras descritas en dicho estudio, un 56,5% de los animales murió debido a esta patología (USDA, 2010).

### **1.2. Agentes infecciosos de relevancia para el estudio**

Para fines de la presente memoria, se consideraron como focos de investigación, *E. coli* y *Salmonella* spp., por ser los dos principales agentes infecciosos bacterianos causantes de la enfermedad (Milleman, 2009).

### **1.2.1. *Escherichia coli* como agente causal de DN**

Esta bacteria ataca durante los primeros siete días de vida de las terneras (Zurita, 1995; Younis *et al.*, 2009). Se identifican diferentes patotipos, donde *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es la causa más común de diarreas en animales de granja (Younis *et al.*, 2009).

La infección se produce a partir de la ingestión de ETEC ambiental, la cual transita a través del estómago y se adhiere mediante adhesinas (K99 y F41) al epitelio del intestino delgado, permitiendo la colonización. Adicionalmente la bacteria produce enterotoxinas que estimulan la secreción de agua y electrolitos en el lumen intestinal, provocando diarrea, pérdida de peso y en algunas ocasiones la muerte (Younis *et al.*, 2009). Estas enterotoxinas no producen lesiones patológicas o cambios morfológicos en la mucosa intestinal, sólo causan alteraciones en el metabolismo de fluido intestinal (Gyles y Fairbrother, 2010).

Los signos clínicos son diarrea muy líquida, de color amarillo, con un cuadro rápido e importante de deshidratación (ojos hundidos, elasticidad de la piel disminuida), debilidad y extremidades frías (Millemann, 2009).

### **1.2.2. *Salmonella spp.* como agente causal de DN**

Las terneras pueden infectarse con una gran variedad de serotipos de *Salmonella* en sus primeras horas de vida. Las manifestaciones posteriores de la enfermedad son variables, lo que refleja el equilibrio entre la inmunidad del huésped, dosis de patógenos, y la virulencia (Mohler *et al.*, 2009). Normalmente la diarrea a causa de *Salmonella* se evidencia desde las 2 semanas hasta incluso las 12 semanas de edad (Foster y Smith, 2009).

Se observan diferencias entre infecciones de distintos serotipos y potencialmente entre diferentes cepas (Mohler *et al.*, 2009), siendo los serotipos de *S. typhimurium* y *S. dublin* los que se describen como de mayor importancia (Foster y Smith, 2009). Igualmente, un estudio en Chile reportó presencia de serotipos tales como *S. dublin*, *S. panama*, *S. mbandaka* y *S. typhimurium* en muestras aisladas de bovinos de las regiones de Valparaíso, Metropolitana y Los Lagos (Peñaloza, 2008).

Los signos clínicos incluyen fiebre, pérdida de apetito y diarrea, que a menudo incrementa el contenido de mucus y puede contener sangre. La deshidratación junto con el desequilibrio ácido-base y electrolítico, contribuyen a la debilidad y depresión en terneros con infección aguda (Mohler *et al.*, 2009), que progresan a la postración y shock, siendo esta la manifestación particular de la salmonelosis en terneros. Aunque la diarrea está presente, la muerte es por lo general a consecuencia de septicemia y no a causa de un shock hipovolémico (Fossler *et al.*, 2005).

### **1.2.3. Impactos productivos de DN en terneras de lechería**

La cría de terneras en todo plantel lechero, representa una oportunidad para incrementar el tamaño del predio, para mejorarlo genéticamente y para aumentar el ingreso económico. La presentación de DN en este período impide lograr estos objetivos de manera exitosa (Elizondo, 2013).

Entre las pérdidas económicas directas se incluyen las pérdidas por mortalidad de los animales; a esto se suman las pérdidas indirectas como las producidas por animales que lograron recuperarse de la enfermedad, evidenciándose en un detrimento en el crecimiento, predisposición a otras enfermedades, menor tasa de conversión alimenticia, gastos por tratamientos (Zurita *et al.*, 1987, Millemann, 2009), pérdida de potencial genético, además del tiempo adicional que el personal dedica a atender a los animales enfermos (Millemann, 2009).

En consecuencia, es imprescindible un adecuado manejo y control de la presentación de DN (Godden, 2008) para proveer un oportuno número de vaquillas sanas y genéticamente superiores (Elizondo, 2013).

### **1.3. Tratamiento de DN en terneras de lechería**

El tratamiento de DN en terneras, se basa en revertir la deshidratación, acidosis y pérdida de electrolitos. Puede ser mediante rehidratación oral en casos leves, o intravenosa en cuadros graves. El tratamiento con antibióticos puede administrarse simultáneamente con el tratamiento de apoyo para la deshidratación, pero se debe identificar el agente causal de la

diarrea previamente, para realizar una terapia antimicrobiana adecuada (Radostits, 1974; Tewari, 2012).

Sin embargo, y pese a que aislar la bacteria de heces de terneras afectadas es lo óptimo para una correcta administración de antimicrobianos, en la práctica el uso de antibióticos de amplio espectro es la primera línea de acción en muchos planteles, ya sea con o sin terapia paralela de electrolitos (Von Buenau *et al.*, 2005). Datos de la USDA (2010) de Estados Unidos indicaron que al año 2007, del total de terneras que cursaron con cuadros de diarrea previo al destete, aproximadamente un 75% de ellas recibió terapia antibiótica.

El uso de medicamentos antimicrobianos de forma profiláctica y terapéutica para enfermedades, se asociaría al alarmante crecimiento de bacterias resistentes y multiresistentes (Von Buenau *et al.*, 2005; Berge *et al.*, 2009; Connerton *et al.*, 2011), lo que repercute en una amenaza creciente tanto para la salud animal y humana (Berge *et al.*, 2009; Connerton *et al.*, 2011).

#### **1.4. Bacteriófagos**

Los bacteriófagos o fagos representan uno de los más abundantes organismos biológicos en la naturaleza y han sido reconocidos por su uso como agentes terapéuticos (Mahony *et al.*, 2010). La aplicación de bacteriófagos en el contexto de la producción de alimentos es muy atractiva, debido a que se pueden utilizar a lo largo de toda la cadena alimentaria (Connerton *et al.*, 2011). Entre sus usos, se encuentra la fagoterapia, que corresponde a su aplicación para reducir la colonización de bacterias o combatir enfermedades en animales, el biocontrol, para descontaminar frutas y hortalizas frescas, o descontaminar canales de animales, la biosanitización, para desinfectar los equipos y superficies de contacto, y por último, la biopreservación al utilizarlos como conservantes naturales (García *et al.*, 2009).

Los bacteriófagos como organismos pueden expresarse de dos formas, ya sea mediante un ciclo lítico, como mediante un ciclo lisogénico (Monk *et al.*, 2010), siendo los fagos que desarrollan ciclos líticos los candidatos para la fagoterapia, debido a su mayor velocidad de propagación, replicación y ataque (Carlton, 1999).

Estos bacteriófagos se definen como virus que infectan y matan bacterias específicas (Monk *et al.*, 2010; Connerton *et al.*, 2011), a las cuales alteran lisando sus células huésped y produciendo con ello la muerte bacteriana (Endersen *et al.*, 2014).

El mecanismo de acción de estos fagos comienza con la fase de fijación o adsorción a la superficie de la célula bacteriana, seguido por la introducción del material genético del virus en el citoplasma, donde ocurre una fase de replicación y síntesis de componentes virales. Los bacteriófagos inmediatamente se replican, transcriben y traducen para la producción de nuevos viriones, convirtiendo así a la célula huésped, en una fábrica de virus que destruyen bacterias (Maura y Debarbieux, 2011).

La terapia en base a fagos ha ido en aumento tanto en humanos como en animales, debido a que ofrecen muchas ventajas sobre las terapias convencionales (Maura y Debarbieux, 2011). En primer lugar, están presentes en los mismos ambientes donde habitan las bacterias y son fácilmente aislados. Además son específicos, por lo que no dañan la flora intestinal normal, son auto-replicantes y autolimitados, multiplicándose sólo mientras se encuentren bacterias sensibles a ellos (Connerton *et al.*, 2011).

Los primeros trabajos en animales se realizaron en la década del 80 en Gran Bretaña, con ratas inoculadas experimentalmente con *E. coli*, quienes evidenciaron la efectividad de los bacteriófagos (Smith y Huggins, 1982, Sulakvelidze *et al.*, 2001). Más tarde, se realizaron estudios en ovejas, cerdos y terneros con diarrea por *E. coli*, logrando disminuir el número de patógenos en el tracto digestivo (Smith y Huggins, 1983; Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Estudios recientes en *Salmonella* en aves, muestran resultados auspiciosos para la industria avícola, donde luego de la aplicación de bacteriófagos se evidenció una disminución del número de bacterias en el tracto digestivo, concluyendo que es posible considerarlos como una alternativa válida y efectiva (Borie *et al.*, 2008; Hungaro *et al.*, 2013).

Actualmente, los bacteriófagos son utilizados en agricultura, seguridad alimentaria y diagnóstico médico, demostrando la utilidad y viabilidad de estos enfoques. A raíz de la urgente necesidad de proporcionar alternativas a los antibióticos, el año 2010 el uso en humanos inició un camino a través de ensayos estrictamente regulados (Monk *et al.*, 2010).

El desafío principal para la expansión del uso de los fagos en salud humana y animal, será la realización de ensayos clínicos a gran escala, de acuerdo con la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por su sigla en inglés) y las regulaciones de la Agencia de Medicina Europea (EMA, por su sigla en inglés) (Pimienta, 2013).

En los sistemas de producción de leche en Chile, la DN es uno de los principales problemas de salud (Escobar, 2003; Lanuza, 2006). Su incidencia y riesgo aumentan en la medida que los sistemas se van haciendo más intensivos. La terapia de elección es a través del uso de antibióticos. Recientemente se encuentra disponible un producto a base de bacteriófagos, lo que podría contribuir a una disminución en la incidencia o severidad de los cuadros. No se encuentran estudios científicos disponibles acerca de su uso en lecherías de la zona central.

## **HIPÓTESIS**

Un producto comercial a base de bacteriófagos específicos para *E. coli* y *Salmonella* spp., disminuye la presentación de diarreas neonatales y aumenta el peso al destete en terneras Holstein de la zona central de Chile.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de un producto comercial a base de bacteriófagos específicos para *E.coli* y *Salmonella* spp., sobre la presentación de diarreas neonatales y peso al destete en terneras.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto de un producto comercial a base de bacteriófagos específicos para *E. coli* y *Salmonella* spp. sobre la presentación y severidad de diarreas en terneras de lechería.
2. Evaluar el efecto de un producto comercial a base de bacteriófagos específicos para *E. coli* y *Salmonella* spp. sobre la ganancia de peso diaria y el peso al destete en terneras de lechería.
3. Evaluar el efecto de un producto comercial a base de bacteriófagos específicos para *E. coli* y *Salmonella* spp. sobre la mortalidad entre nacimiento y destete en terneras de lechería.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en 2 lecherías Holstein ubicadas en las regiones de Valparaíso y Metropolitana; ambas corresponden a sistemas productivos de confinamiento permanente, con crianza artificial de terneras, y características agroclimáticas similares.

Las actividades experimentales fueron realizadas entre noviembre de 2014 y abril de 2015. Previo al inicio, los operarios de ambos planteles fueron capacitados respecto a los objetivos del estudio, apoyo en la recolección de datos, así como protocolos de selección o exclusión de los animales.

### **Manejo de las terneras**

Luego del parto, en ambos planteles las terneras eran separadas de sus madres tan pronto como era posible. Cada ternera recibía aproximadamente 2 litros de calostro en mamadera o sonda orogástrica, procurando realizar este manejo antes de las 2 horas de vida. En conjunto con el manejo anterior, los operarios cortaban y desinfectaban el cordón umbilical.

Posteriormente, las terneras se trasladaban a la unidad de crianza para ser alojadas en cunas individuales de alambre/ferro, de 1,5 mts<sup>2</sup> aproximadamente, con piso de arena en el caso del predio 1 y piso de concreto con cama de paja en el caso del predio 2. Las cunas se encontraban emplazadas en galpones techados de construcción sólida y buena ventilación, aislados de las vacas adultas y con personal exclusivo. Aquí las terneras fueron pesadas e identificadas con el DIIO (dispositivo de identificación individual oficial).

Ya ubicadas en sus cunas, cada ternera recibía nuevamente calostro en mamadera y se evaluaba su estado general. Entre el 3<sup>er</sup> a 5<sup>to</sup> día de vida de las terneras, se tomaba una muestra de sangre de la vena yugular, para determinar a través de un refractómetro de mano el nivel de proteínas séricas totales (PST), como un estimador de la transferencia de inmunidad pasiva de la madre a la ternera.

En relación a los manejos diarios, las terneras eran alimentadas con 5 litros de sustituto de leche para el caso del predio 1 y con 5 litros de leche pasteurizada en caso del predio 2, ambas dosis divididas en dos raciones diarias. Adicionalmente, desde el 5<sup>to</sup> día de vida se les entregaba concentrado de iniciación (23% de proteína) para consumo a discreción.

En ambos planteles, el destete se realizaba a partir de los 70 días de edad, cuando en general la ternera consumía 2 kg de concentrado y/o habría doblado su peso de nacimiento.

### **Diseño Experimental**

El diseño experimental correspondió a un estudio al azar con doble ciego, con un grupo experimental y un grupo control, los cuales recibieron un producto funcional y un producto placebo, respectivamente. Se dispusieron 2 secciones de jaulas en cada plantel, una para cada grupo. A cada grupo se le asignó un color determinado, el cual quedó evidenciado en las jaulas de las terneras (Anexo 1), lo que permitió facilitar la identificación de los animales por parte de los operarios y de la memorista, quienes durante todo el proceso no tuvieron acceso a la información respecto a qué tratamiento recibía cada grupo.

Posterior al parto, se asignaron las terneras en forma aleatoria a cada grupo. Se seleccionaron 80 animales (28 del predio 1 y 52 del predio 2). Las terneras del grupo experimental recibieron 0,5 gramos de un controlador microbiológico (Milkeeper S®, Phage Technologies, Santiago, Chile) a base de bacteriófagos específicos contra *E. coli*, *Salmonella panama*, *S. dublin*, *S. mbandaka* y *S. typhimurium*, disueltos en la leche o sustituto, dos veces al día hasta el destete. A las terneras del grupo control se les entregó 0,5 gramos de un placebo a base de almidón disueltos en la leche o sustituto, dos veces al día hasta el destete.

Para asegurar la correcta realización de los tratamientos, los envases del producto y del placebo se identificaron según los colores asignados previamente a los grupos en estudio, como también los baldes de preparación de la leche y sustituto.

Los animales durante el estudio, permanecieron bajo las mismas condiciones ambientales, sanitarias, alimentarias y de hidratación.

### **Recolección de datos**

Las terneras se pesaron mediante romana digital al nacimiento, a los 30 días, a los 60 días y al destete. Los encargados evaluaron diariamente a las terneras en cuanto a actitud y comportamiento, deshidratación y presentación de alguna patología, registrando las anomalías detectadas en un formulario de registro de eventos (Anexo 2).

Cuando se presentaron diarreas, se registró el evento y la severidad del cuadro (Tabla 1). Las terneras con signos clínicos de diarrea se revisaron y fueron sometidas a un tratamiento de acuerdo a un protocolo previamente establecido por cada predio.

**Tabla 1:** Clasificación de la severidad de la diarrea

SEVERIDAD	SIGNOLOGÍA DETECTADA
<b>1. Leve</b>	Ternera con diarrea, atenta al medio. Heces pastosas, semiformadas
<b>2. Moderada</b>	Ternera con diarrea, decaída. Heces semilíquidas que permanecen en la superficie de la cama.
<b>3. Grave</b>	Ternera con diarrea, permanece en decúbito. Heces líquidas que atraviesan el material de cama.

Fuente: Creación propia basado en antecedentes bibliográficos

### **Análisis de la información**

La información se analizó utilizando el programa estadístico SAS/STAT®. El análisis de los datos y presentación de los resultados se realizó mediante estadística descriptiva. Todos los análisis realizados consideraron un nivel del 95% de confianza.

Las PST, el peso al nacimiento y la duración de las diarreas de ambos grupos, se compararon a través de pruebas de T de Student para muestras independientes. La incidencia de diarrea y mortalidad en los grupos experimental y control se compararon por pruebas de Chi Cuadrado.

Para comparar la severidad de los cuadros de diarreas en ambos grupos, se utilizó la prueba de U Mann-Whitney.

El peso corregido al destete (75 días) y la ganancia diaria de peso se analizaron a través de análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM (General Linear Model) del programa.

Se incluyeron los efectos de tratamiento y predio, incluyéndose como covarianzas el peso al nacimiento y el nivel de PST, de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + (T*P)_{ij} + \beta(PN_k) + \beta(PST_l) + e_{ijkl}$$

Donde;

$Y_{ijkl}$  = Peso corregido al destete o ganancia diaria de peso

$T_i$  = Efecto del i-ésimo tratamiento (i=0: control; 1: tratamiento)

$P_j$  = Efecto del j-ésimo predio (1, 2)

$(T*P)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre tratamiento y predio

$\beta(PN_k)$  = Regresión del k-ésimo peso al nacimiento

$\beta(PST_l)$  = Regresión del l-ésimo nivel de PST

$e_{ijkl}$  = Error

Los promedios fueron comparados mediante el test LSD Fisher.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Peso al Nacimiento**

El promedio ( $\pm$  desviación estándar) del peso al nacimiento en el grupo control fue de  $36,3 \pm 4,8$  kg y para el grupo experimental de  $36,4 \pm 4,1$  kg. Estos promedios no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,91$ ), lo que indica que las terneras ingresan al estudio con pesos similares en ambos grupos.

### **Proteínas Séricas Totales**

El nivel de PST evidenció un promedio de  $4,86 \pm 0,55$  g/dL en el grupo control y de  $4,86 \pm 0,65$  g/dL en el grupo experimental. Los promedios no fueron estadísticamente diferentes ( $p=0,98$ ). Esto indica que los niveles de inmunidad adquirida, y por lo tanto el riesgo de las terneras a sufrir infección fue similar en ambos grupos.

La relevancia de considerar las PST, radica en evitar atribuir al producto testeado resultados que pueden estar condicionados por la calidad del traspaso inmunitario y no por el efecto del mismo, o viceversa. Se debe considerar que uno de los factores de riesgo más importantes en la presentación de DN en terneras, es la falla en la transferencia pasiva de inmunidad (FTP) a través del oportuno consumo de calostro (Escobar, 2003; Faber *et al.*, 2005).

Se considera exitosa una transferencia de inmunidad pasiva cuando los valores de PST son  $> 5,2$  g/dL (Faber *et al.*, 2005; Conneely *et al.*, 2014). Las concentraciones de PST alcanzadas por las terneras en estudio son bajas, lo que revela una FTP en ambos predios. Esto podría deberse a una deficiente calidad o cantidad del calostro suministrado y/o por un retraso en la entrega del mismo. En un estudio realizado en la zona central de Chile (Escobar, 2003) se mostró que terneras Holstein con bajas concentraciones de PST tenían un riesgo de presentación de DN y muerte a causa de cuadros digestivos de 1,5 y 1,8 veces más, respectivamente, en comparación con terneras que presentaban concentraciones adecuadas de PST.

## Diarreas Neonatales

### Incidencia

De las 80 terneras evaluadas, 37 presentaron diarrea, lo que corresponde a un 46,3% de incidencia. En el grupo control, la incidencia de diarreas fue de un 50%, en comparación con un 42,5% en el grupo experimental. Estas incidencias no son significativamente diferentes ( $p=0,79$ ), lo que indicaría que no hay un efecto del producto en la disminución de la presentación de cuadros de diarrea en las terneras evaluadas.

### Severidad

Los casos de diarrea se clasificaron como leve, moderada y grave de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 1. La información de severidad en ambos grupos se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Incidencia de diarrea según grado de severidad y grupo en estudio.

Grado severidad	Control (%)	Experimental (%)
Leve	17,5	17,5
Moderada	0,6	10,0
Grave	27,5	15,0
Total	45,6	42,5

La distribución de la severidad de las diarreas observadas en ambos grupos no fue estadísticamente diferente ( $p=0,38$ ). Esto indicaría que el producto testeado no afecta la severidad de la diarrea. Sin embargo, se observa una tendencia a que las terneras tratadas con MilkeeperS<sup>®</sup> presentan un menor porcentaje de diarreas graves y un mayor porcentaje de diarreas moderadas comparadas a las terneras del grupo control. Además, la mayor proporción de diarreas en el grupo control corresponde a diarreas graves, mientras que en el grupo experimental predominan las diarreas leves.

### **Duración de la diarrea**

La duración promedio de los cuadros de diarrea para el grupo control fue de  $8,5 \pm 4,24$  días, lo que es significativamente diferente ( $p=0,03$ ) a la duración de los cuadros en el grupo experimental donde duraron en promedio  $5,9 \pm 1,81$  días.

Lo anterior es consistente con la tendencia observada hacia una menor severidad en los cuadros cursados por las terneras del grupo experimental. Es posible que MilkeeperS® no prevenga la infección ni el comienzo del cuadro, pero se podría inferir que disminuye la carga bacteriana o la agresividad de la infección. Ello se debería a los bacteriófagos activados que transitan en el sistema digestivo en las terneras del grupo experimental. Esto se demostró en el estudio de Bicalho *et al.* (2012), donde se señala que la alta efectividad de los bacteriófagos está basada principalmente en una disminución en los recuentos bacterianos, lo que produciría una recuperación más prematura de los animales tratados. Esto además concuerda con resultados de otros investigadores como Smith y Huggins (1983) y Barrow *et al.* (1998).

### **Mortalidad**

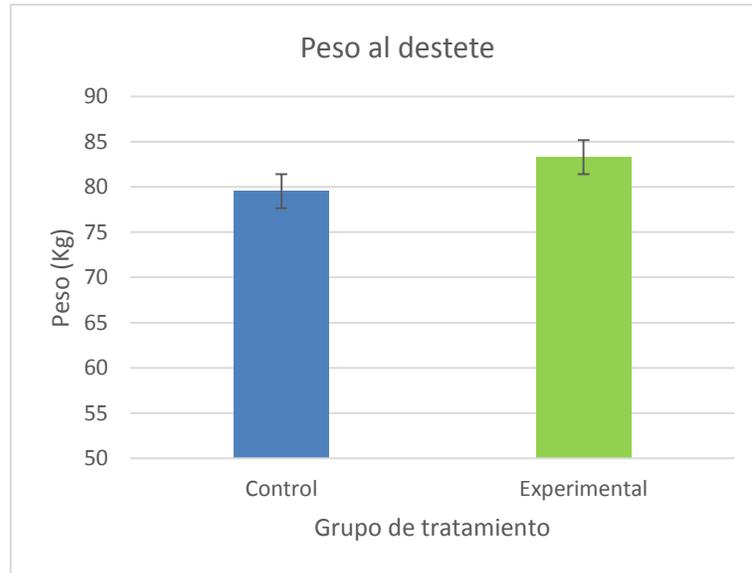
Durante el desarrollo del ensayo, 5 terneras (6,25%) murieron por causas asociadas a cuadros gastroentéricos, 3 fueron del grupo control (7,5%) y 2 del grupo experimental (5%), las diferencias observadas no fueron significativas ( $p=0,64$ ).

En los sistemas de crianza de terneras, uno de los objetivos principales es reducir la mortalidad neonatal a alrededor de un 3% (Lanuza, 2006). Los datos de mortalidad neonatal de las terneras durante el estudio sugieren altos niveles de mortalidad predial, no obstante el tamaño muestral de la población estudiada es pequeño, lo que dificulta las comparaciones en este sentido y no necesariamente refleja la realidad de ambos predios en el largo plazo.

En suma, se considera que el producto probado aparentemente no genera mayores diferencias en cuanto a la presentación de diarreas ni a las muertes asociadas a estos cuadros. Sin embargo, genera una tendencia a disminuir las diarreas graves en los animales alimentados con el producto, como también a reducir la duración de éstas.

## Peso al destete

Los promedios de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) de las terneras del grupo control fueron de  $77,96 \pm 1,3$  kg. y para el grupo experimental de  $82,04 \pm 1,3$  kg. (Figura 1).



**Figura 1:** *Peso al destete (Kg), para terneras en grupo control y experimental.*

A partir del modelo matemático usado, se evidenció que el peso al destete de las terneras fue influenciado significativamente por los efectos del tratamiento ( $p=0,03$ ) y del predio ( $p<0,001$ ). Además la concentración de PST no tuvo efecto en el peso al destete ( $p=0,66$ ), mientras que sí es muy determinante el peso al nacimiento ( $p<0,001$ ). Se compararon los pesos al destete entre tratados y controles dentro de cada predio, pudiendo constatar que en el predio 1 las terneras tratadas con el producto tuvieron un peso al destete de 4,7 kg mayor ( $p=0,05$ ) que las controles, mientras que en el predio 2 la diferencia fue de 3,5 kg más en terneras tratadas, pero sin ser significativamente diferentes ( $p=0,21$ ). La información de ambos grupos se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Promedios de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) de peso al destete en terneras del grupo control y experimental según predio.

Predio	Grupo Control (kg)	Grupo Experimental (kg)	p
Predio 1	72,52 $\pm$ 2,2	77,23 $\pm$ 2,1	0,05
Predio 2	83,39 $\pm$ 1,5	86,86 $\pm$ 1,5	0,21
Total	77,96 $\pm$ 1,3	82,04 $\pm$ 1,3	0,03

A partir del análisis de varianza, se evidencia que los factores tratamiento y predio influyen de manera significativa en el peso al destete de las terneras en estudio. Este mejor peso al destete podría relacionarse con que las terneras del grupo experimental, alimentadas con MilkeeperS®, tuvieron cuadros de diarrea más leves y de menor duración que las terneras del grupo control. Esto a su vez sería causado por una menor colonización bacteriana en el tracto intestinal por acción de los fagos, disminuyendo el efecto de las bacterias sobre la mucosa afectando así la pérdida de agua y electrolitos, que provocarían la diarrea. Esto, mejoraría la absorción intestinal de los alimentos consumidos, lo que repercutiría en el peso final del período de crianza de los animales.

Blum (2006) indica que existe una estrecha y directa relación entre las cantidades de calostro ingerido y el crecimiento y desarrollo de las vellosidades intestinales; un mejor desarrollo de estas, genera una mejor absorción a nivel intestinal. Ahora bien, las terneras utilizadas en el presente estudio presentaron FTP, por lo que eventualmente se podría indicar que el producto testeado funciona como un refuerzo para animales que no fueron suministrados oportunamente o con calidades o cantidades adecuadas de calostro, previniendo infecciones causadas por bacterias, logrando con ello una mejor absorción del alimento consumido y un mejor peso al destete.

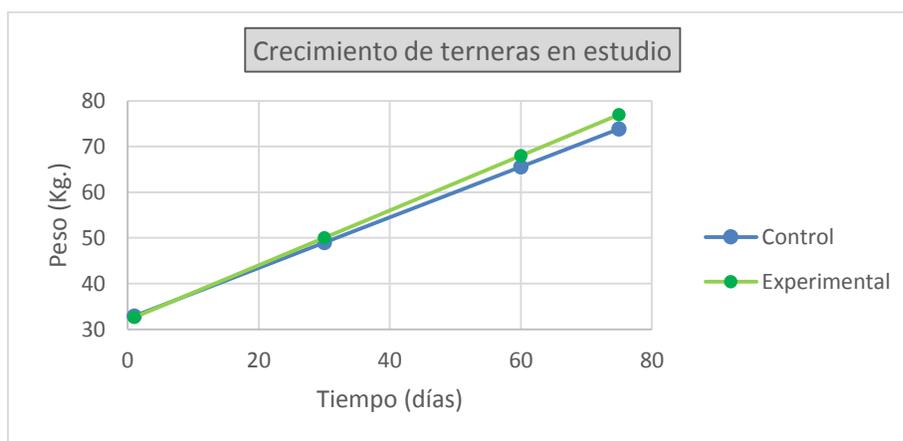
El peso al destete y el efecto del tratamiento son dependientes del predio. En ambos predios las terneras tratadas obtienen un mayor peso al destete que las controles. En el predio 1 la

diferencia es significativa mientras que hay una tendencia estadística en el predio 2. Por otro lado, el peso al destete es significativamente mayor en este predio. En el predio 2 se realizan muy buenos manejos productivos y sanitarios, posee personal muy bien cualificado y cuenta con infraestructura de muy buena calidad. Por esto los pesos al destete en ambos grupos son mayores que los observados en el predio 1, donde hay menos personal y la calidad del manejo es levemente inferior. En este predio la incidencia general de diarrea es mayor y es en este predio donde se observa un efecto más beneficioso del producto testado. Se podría concluir que el producto tendría un efecto más evidente en predios que presentan falencias en cuanto a manejo sanitario, personal e infraestructura, con mayores niveles de diarrea y mortalidad. Por el contrario, en predios con buen manejo, mejor infraestructura, con mejores niveles sanitarios, y consecuentemente con menores problemas de diarrea, los efectos del producto son menos evidentes.

### **Ganancia de peso**

Se observó una fuerte tendencia a una mayor GDP en el grupo experimental, con 628 gr/día, por sobre los 578 gr/día que presentó el grupo control ( $p=0,07$ ).

En la Figura 2, se observan los diferenciales de peso entre grupos en estudio, proyectados mediante los promedios al nacimiento, 30, 60 y 75 días. Se aprecia una mayor ganancia de peso, y consecuentemente un mayor peso al destete, en las terneras tratadas.



**Figura 2:** Curva de crecimiento desde el nacimiento hasta el destete para terneras del grupo control y experimental.

Sin perjuicio de lo anterior, al analizar los pesos a los 30, 60 y 75 días, los pesos de las terneras del estudio están por debajo de los pesos promedios de referencia indicados por Heinrichs y Lammers (1998), correspondientes a 57,1 kg., 80,2 kg y 86,6 kg, respectivamente (USDA, 2010). Sin embargo, el grupo experimental, especialmente en el predio 2, se aproxima más a la línea de tendencia del modelo de referencia. En general estos pesos son bajos, y podría deberse en primer lugar a que los pesos al nacimiento de las terneras en estudio son menores al considerado en las curvas propuestas por Heinrichs y Lammers (1998), factor que influye fuertemente en los pesos posteriores. Adicionalmente, es posible que los manejos y parámetros de los predios investigados estén por debajo de los estándares estadounidenses. Sin embargo, pese a esta situación de menores pesos observada en el presente estudio, hacia el final de la curva de crecimiento los animales bajo tratamiento acortan en forma importante su distancia respecto a los valores considerados como óptimos.

### **Discusión general**

La salud y el manejo de los animales de reemplazo son componentes importantes de la rentabilidad de todo el predio. Es por esto que es fundamental comprender que cualquier alteración a este nivel, impacta negativamente la rentabilidad del plantel lechero, por lo que resguardar la salud y bienestar de las terneras es fundamental (Elizondo, 2013).

Es posible deducir que el uso de bacteriófagos específicos para *E.coli* y *Salmonella* spp. permite a las terneras mejorar la expresión de su potencial genético, gracias a un crecimiento y desarrollo sostenido en la etapa de crianza, situación clave según las investigaciones de Drackley (2005) y de Soberon *et al.*, (2012) que han evidenciado que un aumento en el consumo de nutrientes previo al destete, genera mejoras en la producción de entre 450 a 1.300 kg de leche en la primera lactancia en comparación a terneras restringidas nutricionalmente en ese periodo. Esto, es consistente con lo señalado por el USDA (2010), quien indica que un adecuado desarrollo y crecimiento previo al destete es fundamental para un oportuno encaste, parto y futura lactancia.

Si bien MilkeeperS ® mejora la salud, bienestar y pesos al destete, el producto no puede, ni debe utilizarse para disimular problemáticas propias de un deficiente y débil protocolo de manejo de animales, sanitario y alimentario. El uso de este y otros productos similares no

reemplaza un manejo eficiente. Es prioridad, antes de recurrir a un producto que contribuya a mejorar los indicadores productivos de un plantel, reforzar la capacitación y transferencia de conocimientos hacia los operarios y monitorear frecuentemente los parámetros sanitarios y productivos durante la crianza con el fin de introducir cambios oportunamente.

Deben realizarse nuevas investigaciones con el fin de establecer proyecciones para los bacteriófagos tanto en la prevención de la presentación de DN, como en su posible efecto como tratamiento en el caso de animales infectados. Lo anterior también se sustenta en la necesidad de realizar estudios en ambientes controlados y considerando un mayor número de variables, ya que pese a que *Salmonella* spp. y *E. coli* son los agentes bacterianos más relevantes en la presentación de DN, no son los únicos causales de esta patología.

## CONCLUSIONES

- El producto formulado a base de bacteriófagos específicos no disminuyó de forma significativa la incidencia de DN en terneras.
- La duración de las diarreas fue significativamente menor en las terneras tratadas con el producto formulado a base de bacteriófagos específicos. Además se observó una tendencia a una menor severidad de la diarrea en las terneras tratadas.
- La mortalidad de las terneras por DN no fue afectada por el uso del producto formulado a base de bacteriófagos específicos.
- Las terneras tratadas con el producto formulado a base de bacteriófagos específicos del grupo experimental tuvieron una mayor ganancia diaria de peso, y un mayor peso al destete que las terneras del grupo control.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**BARROW, P; LOVELL, M; BERCHIERI, A.** 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia Coli*, septicemia and meningitis in chickens and calves. Clin. Diagn. Lab Immunol. 5: 294–298.

**BENDALI, F; BICHET, H; SCHELCHER, F; SANAA, M.** 1999. Pattern of diarrhea in newborn beef calves in south-west France. Vet. Res. 30:61-74.

**BERGE, A; MOORE, D; BESSER, T; SISCHO, W.** 2009. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: Effects on health, growth, and treatment costs. J. Dairy Sci. 92:4707–4714.

**BICALHO, M; MACHADO, V; NYDAM, D; SANTOS, T; BICALHO, R.** 2012. Evaluation of oral administration of bacteriophages to neonatal calves: Phage survival and impact on fecal *Escherichia coli*. Liv. Sci. 144:294–299.

**BLUM, J.M.** 2006. Nutritional physiology of neonatal calves. J Animal Physiol Anim Nutr. 90:1-11.

**BORIE, C; ZURITA, P; SÁNCHEZ, ML; ROJAS, V; SANTANDER, J; ROBESON, J.** 2008. Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Enteritidis* (*Salmonella Enteritidis*) en pollos mediante un bacteriófago. Arch. Med. Vet. 40:197-201.

**CARLTON, R.** 1999. Phage Therapy: past history and future prospects. Arch. Im.Therapiae Experim. 47:267–274

**CONNERTON, P.L; TIMMS, A; CONNERTON, I.F.** 2011. *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy. J. Applied Microbiol. 111:255–265.

**CONNELLY, M; BERRY, D; MURPHY, J; LORENZ, I; DOHERTY, M; KENNEDY, E.** 2014. Effect of feeding colostrum at different volumes and subsequent number of transition milk feeds on the serum immunoglobulin G concentration and health status of dairy calves. J. Dairy Sci. 97:6991–7000.

**DRACKLEY, J.** 2005. Does early growth affect health and performance of heifers?. Adv. in Dairy Tech. 17: 189-205.

**DE PAULA, A; VON KEYSERLINGK, M; WEARY, M.** 2010. Effects of pair versus single housing on performance and behavior of dairy calves before and after weaning from milk. J. Dairy Sci. 93:3079–3085.

**ELIZONDO, J.** 2013. Requerimientos de energía para terneras de lechería. Agr. Mes. 24:209-214.

**ENDERSEN, L; O'MAHONY, J; HILL, C; ROSS, P; MCAULIFFE, O; COFFEY, A.** 2014. Phage Therapy in the Food Industry. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5:327–349.

**ESCOBAR, F.** 2003. Determinación de los niveles séricos de proteínas y su asociación con parámetros sanitario-productivos y características del parto en terneras de lechería. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 27 p.

**FABER, S; FABER, N; MCCAULEY, T; AX, R.** 2005. Case study: Effects of colostrum ingestion on lactational performance. *Prof. Anim. Sci.* 21:420–425.

**FOSSLER, C; WELLS, S; KANEENE, J; RUEGG, L; WARNICK, L; BENDER, J; EBERLY, L; GODDEN, S; HALBERT, W.** 2005, Herd-level factors associated with isolation of Salmonella in a multi-state study of conventional and organic dairy farms II. Salmonella shedding in calves. *Prev. Vet. Med.* 70:279–291.

**FOSTER, D; SMITH, G.** 2009. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 25:13-36.

**GARCÍA, P; MARTÍNEZ, B; OBESO, J.M; RODRÍGUEZ, A.** 2009. Bacteriophages and their application in food safety. *Applied Microbiol.* 47: 479–485

**GODDEN, S.** 2008. Colostrum management for dairy calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 24:19–39.

**GYLES, C; FAIRBROTHER, J.** 2010. Escherichia coli. **In:** Gyles, C; Prescott, J; Songer, G; Thoen, C. (Eds). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals.* 4th ed. Blackwell. Iowa, USA. pp 267-308.

**HEINRICHS, L; LAMMERS, B.** 1998. Monitoring dairy heifer growth. Pennsylvania State Univ. Ext.. 16p.

**HUNGARO, H; SANTOS, R; MEIRELES, D; DANTAS, MC; DE OLIVEIRA, C.** 2013. Use of bacteriophages to reduce Salmonella in chicken skin in comparison with a chemical agent. *Food Res. International* 52:75-81.

**IRAIRA, S; CANTO, F.** 2014. Proyecto “Programa de bienestar animal para el sector lechero de Chile”. Osorno, Chile. Consorcio Tecnológico de la Leche S.A. Fundación para la Innovación Agraria, FIA. PYT-2014-0029. 25 p.

**LANUZA, F.** 2006. Crianza de terneros y reemplazos de lechería. **In:** Navarro, H; Sielbad, E; Celis, S. *Manual de producción de leche.* INIA Remehue. Osorno, Chile. pp 104 – 111.

**LORENZ, I; FAGAN, J.; MORE, S. J.** 2011. Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Ir Vet J.* 64:1-9.

- MAHONY, J; M<sup>C</sup>AULIFFE, O; ROSS, P; VAN SINDEREN, D.** 2010. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Cu. Op. Biot.* 22: 1–7.
- MAURA, D; DEBARBIEUX, L.** 2011. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:851–859.
- MILLEMANN, Y.** 2009. Diagnosis of neonatal calf diarrhea. *Revue Méd. Vét.* 160:404-409.
- MOHLER, V; SC, IZZO, M; HOUSE, J.** 2009. Salmonella in calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 25: 37-54.
- MONK, A; REES, C; BARROW, P; HAGENS, S; HARPER, D.** 2010. Bacteriophage applications: where are we now?. *J. Applied Microbiol.* 51:363–369.
- MONTAGNER, P; WESCHENFELDER, M; PEREIRA, R; MAFFI, A; DE MORAES, F; BRAUNER, C; CORREA, M.** 2014. Effectiveness of the use of enrofloxacin of fast action in the treatment of neonatal diarrhea in Holstein calves. *Acta Scientiae Veterinariae*, 42.
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2013. Resistencia a los antimicrobianos. [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>> [consulta: 04- 04-2015].
- PIMIENTA, E.** 2013. Tratamiento con bacteriófagos como una alternativa antimicrobiana potencial. *Cenic* 44: 1-7.
- PEÑALOZA, C.** 2008. Resistencia antimicrobiana de cepas de Salmonella spp. aisladas de bovinos de las regiones V, Metropolitana y X. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 50 p.
- RADOSTITS, O.** 1974. Treatment and control of neonatal diarrhea in calves. *J. Dairy Sci.* 58:464-470.
- SMITH, H; HUGGINS, M.** 1982. Successful treatment of experimental Escherichia coli infections in mice using phages: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 128:307–318.
- SMITH, H; HUGGINS, M.** 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *E. coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol.* 129:2659–2675.
- SOBERON, F; RAFFRENATO, E; EVERETT, R; VAN AMBURGH, M.** 2012. Preweaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 95:783-793

**SULAKVELIDZE, A; Z, ALAVIDZE; MORRIS, J.** 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother* 45:649-659.

**TEWARI, A.** 2012. Neonatal calf diarrhoea. *Indian dairyman*, 54 p.

**USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.** 2010. Dairy 2007, heifer calf health and management practices on U.S. dairy operations, 2007. USDA:APHIS:VS, CEAH. Fort Collins, CO.

**VON BUENAU, R; JAEKEL, L; SCHUBOTZ, E; SCHWARZ, S; STROFF, T; KRUEGER, M.** 2005. Escherichia coli Strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea. *J. Dairy Sci.* 88:317–323.

**YOUNIS, E; AHMED, A; EL-KHODERY; S; OSMAN, S; EL-NAKER, Y.** 2009. Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic Escherichia coli and Salmonella spp. in diarrheic neonatal calves in Egypt. *Research in Vet. Sci.* 89:373–379.

**ZURITA, L; SMITH, P; ZURICH, L.** 1987. Diarrea del ternero recién nacido. *Monografías de Medicina Veterinaria.* 9:1-17.

**ZURITA, L.** 1995. Diarrea infecciosa del ternero causada por Escherichia coli enterotoxigénica. *Tecnovet.* 1:12-17.

## ANEXOS

### Anexo 1

#### Diferenciación de Jaulas

##### Predio n°1

Diferenciación de jaulas y productos a administrar



##### Predio n°2

Diferenciación de jaulas y productos a administrar



