ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Cynthia
López Novo

Tesis doctoral

Análisis integrado de enteropatógenos implicados en la diarrea neonatal del ternero y sus repercusiones en salud pública en el Noroeste de España

Lugo, 2023

Programa de doctorado en Medicina y Sanidad Veterinaria

TESIS DE DOCTORADO

ANÁLISIS INTEGRADO DE ENTEROPATÓGENOS IMPLICADOS EN LA DIARREA NEONATAL DEL TERNERO Y SUS REPERCUSIONES EN SALUD PÚBLICA EN EL NOROESTE DE ESPAÑA

Cynthia López Novo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD VETERINARIA

LUGO

2023

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Cynthia López Novo**

Título de la tesis: **Análisis integrado de enteropatógenos implicados en la diarrea neonatal del ternero y sus repercusiones en salud pública en el Noroeste de España**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Lugo**, **24 de julio de 2023**.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

La doctoranda declara no tener ningún conflicto de interés en relación a la presente Tesis Doctoral.

En Lugo, a 24 de Julio de 2023

Fdo. Cynthia López Novo

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FINANCIACIÓN

Este trabajo se ha realizado gracias a la concesión de las siguientes ayudas y proyectos de investigación:

- Ayudas para la Formación del Profesorado Universitario 2019 (FPU 19/02069). Ministerio de Universidades. Gobierno de España.
- Ayudas de apoyo a la etapa predoctoral en las universidades del Sistema Universitario de Galicia, en los organismos públicos de investigación de Galicia y en otras entidades del Sistema gallego de I+D+i (ED481A-2019/032). Consellería de Educación, Universidade e Formación Profesional. Xunta de Galicia.
- Retos Investigación: Proyectos I+D+i 2016 (AGL2016-73034P). Ministerio de Esconomía y Competitividad. Gobierno de España. Investigador principal: María Patrocinio Morrondo Pelayo
- Ayudas para la consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas y otras acciones de fomento en el SUG, en los organismos públicos de investigación de Galicia y en otras entidades del Sistema gallego de I+D+i para el 2019 (GRC 2019/04). Consellería de Educación, Universidade e Formación Profesional. Xunta de Galicia. Investigador principal: Pablo Díez Baños.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PUBLICACIONES

Artículos de investigación en revistas internacionales

1. Prieto, A[1]., **López-Novo, C.[1]**, Díaz, P.[1], Díaz-Cao, J.M.[1], López-Lorenzo, G., Antón, C[1], Remesar, S[1], García-Dios, D.[1], López, C.[1], Panadero, R.[1], Díez-Baños, P.[1], Morrondo, P.[1], Fernández, G.[1], 2022. Antimicrobial Susceptibility of Enterotoxigenic *Escherichia coli* from Diarrhoeic Neonatal Calves in Spain. Animals, 12, 264. doi: https://doi.org/10.3390/ani12030264

   [1] Grupo INVESAGA, Departamento de Patoloxía Animal, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España

   Editorial: MDPI (eISSN:2076-2615).

   Factor de impacto (2022): 3,0. Q1 en la categoría Veterinary Sciences (13/143).

   Publicación en acceso abierto. Permisos indicados en:

   https://www.mdpi.com/about/termsofuse

   Contribución del doctorando: conceptualización y preparación del manuscrito original.

   Los contenidos de esta publicación se reproducen en el Capítulo 5 de esta tesis doctoral.

Artículos en revistas de divulgación

1. **López-Novo, C.**, Díaz, P., Prieto, A., López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., Remesar, S., García-Dios, D., Panadero, R., López, C.M., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2019. Diarrea neonatal en terneros del Noroeste de España: situación actual e importancia de las infecciones mixtas. Boletín de ANEMBE, 124, 20-27.
2. **López-Novo, C.,** Díaz, P., Prieto, A., López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., Remesar, S., García-Dios, D., Panadero, R., López, C.M., Díez-Baños, P., Fernández, G., Morrondo, P., 2019. Diarrea neonatal en terneros de Galicia: nuevos enteropatógenos y cómo afrontarlos. Vaca Pinta, 13, 110-114.
3. **López-Novo, C.,** Díaz, P., Prieto, A., López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., Remesar, S., García-Dios, D., Panadero, R., López, C.M., Díez-Baños, P., Fernández, G., Morrondo, P., 2020. Procesos diarreicos en terneros neonatos, ¿a qué nos enfrentamos? Mundo Ganadero, 31, 22-26.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. **López-Novo, C.,** Prieto, A., Gómez-Couso, H., Couso-Pérez, S., López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., Remesar, S., García-Dios, D., Martínez-Calabuig, N., Panadero, R., López, C.M., Ares-Mazás, E., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Díaz, P., 2021. Enteropatógenos implicados en la diarrea neonatal del ternero: viejos conocidos, nuevas caras y sus interrelaciones. Albéitar, 251, 4-8.
5. **López-Novo, C.,** Díaz, P., Díaz-Cao, J.M., López-Lorenzo, G., Remesar, S., García-Dios, D., Martínez-Calabuig, N., Saldaña, A., Panadero, R., López, C., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G., Prieto, A., 2022. Diarrea neonatal y uso de antibióticos: es hora de cambiar viejas costumbres. Vaca Pinta, 34, 104-110.

Comunicaciones a congresos

1. Prieto, A., López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., Díaz, P., **López-Novo, C.,** Remesar, S., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2018. Prevalencia de Norovirus bovino en terneros con diarrea del noroeste de España. II Congreso Nacional de Sanidad Animal. Córdoba, España.
2. Prieto, A., López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., Díaz, P., **López-Novo, C.,** Remesar, S., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2018. Prevalencia de Norovirus bovino en terneros con diarrea del noroeste de España. XLI Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lima, Perú.
3. Prieto, A., Díaz, P., **López-Novo, C.,** Díaz-Cao, J.M., López-Lorenzo, G., Remesar, S., García-Dios, D., López, C., Panadero, R., Iglesias, A., Quintela, L.A., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2019. Prevalencia de virus entéricos en casos de diarrea neonatal del noroeste de España. XXIV Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. Sevilla, España.
4. **López-Novo, C.,** Prieto, A., Díaz, P., López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., Remesar, S., García-Dios, D., Panadero, R., López, C.M., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2019. Prevalence of mixed infections in diarrhoeic calves from the North-West of Spain. XXIV International Congress of FeMeSPRum. León, España.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

To study the phenomena of disease without
books is to sail an uncharted sea,
while to study books without patients
is not to go to sea at all.
SIR. WILLIAM OSLER

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Es bien sabido que desarrollar una Tesis Doctoral es un trabajo duro detrás del cual hay innumerables horas de esfuerzo y dedicación. Sin embargo, no es únicamente fruto del trabajo individual y su consecución habría resultado mucho más difícil sin la ayuda de todas las personas que, a lo largo de estos años, me han transmitido sus conocimientos y brindado su apoyo, tanto en lo profesional como en lo personal.

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a mis dos directores de tesis. Al **Dr. Pablo Díaz Fernández** por su dedicación y disponibilidad siempre que he necesitado orientación en el campo de la parasitología, por haberme enseñado a profundizar en cada una de las posibilidades que ofrecen los resultados, y por sus inestimables aportaciones a este trabajo que han mejorado sustancialmente su calidad. Al **Dr. Alberto Prieto Lago** por haberme transmitido su pasión por la microbiología y la biología molecular, por su apoyo y tutorización desde el primer día que entré en el laboratorio y por sus "tómate la vida con calma", que es algo en lo que he avanzado, pero en lo que todavía tengo mucho margen de mejora.

También me gustaría destacar especialmente el papel del **Dr. Gonzalo Fernández Rodríguez.** A pesar de que no ha ejercido como director de esta tesis, siempre le estaré agradecida por la confianza que depositó en mí para emprender este camino y por sus consejos, motivación y aportaciones, que me han servido de mucha ayuda tanto en este como en otros aspectos de mi carrera profesional y me han impulsado a mejorar cada día.

Asimismo, quiero agradecer al resto de miembros del grupo INVESAGA su ayuda y el conocimiento que me han transmitido a lo largo de estos años. Al **Dr. Ceferino López** por su disposición para ayudarme siempre que he tenido alguna cuestión burocrática o estadística que solucionar. Al **Dr. Pablo Díez Baños**, la **Dra. Patrocinio Morrondo** y a la **Dra. Rosario Panadero**, por mostrarme que la curiosidad y las ganas de emprender nuevos proyectos son la clave para articular una carrera investigadora tan exitosa y dilatada. A la **Dra. Susana Remesar**, **David García**, **Néstor Martínez** y **Ana Saldaña** por los momentos de desconexión tan necesarios durante las pausas de café. No obstante, de todos los compañeros, merecen una mención especial dos de ellos: el **Dr. José Manuel Díaz Cao** y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el **Dr. Gonzalo López Lorenzo.** A José Manuel por su inestimable ayuda con el tratamiento de datos y el análisis estadístico, pues sin su orientación es probable que todavía no lo hubiese terminado, así como por las conversaciones arreglando el mundo y la actualidad político-social. A Gonzalo por su disposición absoluta para ayudarme siempre que lo he necesitado, por haberme enseñado todo lo que sé sobre el sector porcino, por su paciencia cuando "me ahogo en un cubito de hielo" y por la amistad que nos une.

Por otro lado, quiero mostrar mi agradecimiento a los miembros del grupo PARAQUASIL: el **Dr. Hipólito Gómez-Couso**, la **Dra. Elvira Ares Mazás** y la **Dra. Seila Couso Pérez**, por su asistencia en la caracterización molecular de *Giardia duodenalis*, y al **Laboratorio Interprofesional Galego de Análise do Leite (LIGAL)** por su colaboración en las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos realizadas. Asimismo, merecen una mención especial todos los veterinarios y ganaderos que han contribuido en la recogida de las muestras necesarias para llevar a cabo esta tesis.

Cambiando a un ámbito más personal, me gustaría agradecer a mis amigos, en especial a **Mery,** el haber seguido ahí todos estos años y las vivencias que hemos compartido que me han hecho crecer como persona.

No puedo dejar de mencionar a mi compañero de vida desde hace casi dos años, **Rolle**, que es una de las personas que más me ha sufrido en esta última etapa. Gracias por ser mi confidente, por estar siempre a mi lado pase lo que pase, por entenderme incluso cuando ni yo me entiendo y por tu infinita paciencia con mis pequeños y grandes dramas. *Quérote moito moito.*

Finalmente, quiero agradecerle todo a mi familia, por haberme apoyado en todas las decisiones que he ido tomando y haberme dado los mejores consejos. A mi tía **Rosa**, por preocuparse y tener siempre una palabra de ánimo para mí, a mi prima **Alexia,** que siempre será como mi hermana pequeña y, muy especialmente a mis padres, **Adolfo y Pury.** Papá, mamá, gracias por haberlo dado todo por mí, por los valores que me habéis transmitido, por vuestro apoyo incondicional, por vuestra paciencia y por tratar de levantarme el ánimo cuando soy un mar de dudas y me inunda la desesperanza y la negatividad. Os quiero muchísimo y sólo espero que estéis la mitad de orgullosos de mí de lo que lo estoy yo de vosotros.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

ÍNDICE

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... 1

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES E IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL SECTOR BOVINO GALLEGO..... 3

1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SANITARIA DE LA DIARREA NEONATAL DEL TERNERO..... 7

1.3. PROCESO DE LA DIARREA Y CUADRO CLÍNICO..... 10

1.3.1. Tipos de diarrea..... 10

1.3.2. Implicaciones de la diarrea a nivel sistémico..... 12

1.4. DIARREA INFECCIOSA..... 14

1.4.1. Agentes causales: enteropatógenos bacterianos..... 14

1.4.1.1. *Escherichia coli*..... 14

1.4.1.1.1. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)..... 16

1.4.1.1.2. *E. coli* enteropatógena (EPEC)..... 19

1.4.1.1.3. *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)..... 20

1.4.1.2. *Salmonella* spp..... 22

1.4.1.3. Abomasitis por *Clostridium* spp..... 24

1.4.2. Agentes causales: enteropatógenos víricos..... 25

1.4.2.1. Rotavirus..... 25

1.4.2.2. Coronavirus..... 26

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.2.3. Torovirus 28

1.4.2.4. Calicivirus 29

1.4.2.4.1. Norovirus 29

1.4.2.4.2. Nebovirus 31

1.4.2.4.3. Patogenia y lesiones 31

1.4.2.5. Virus de la diarrea vírica bovina 31

1.4.2.6. Otros virus. 32

1.4.3. Agentes causales: enteropatógenos parasitarios 32

1.4.3.1. *Cryptosporidium* spp. 32

1.4.3.2. *Giardia duodenalis* 37

1.4.3.3. *Eimeria* spp. 40

1.4.4. Epidemiología 45

1.4.4.1. Factores de riesgo asociados al ternero 45

1.4.4.2. Factores de riesgo asociados al ambiente 50

1.4.4.3. Factores asociados con el agente causal 54

1.4.5. Diagnóstico 58

1.4.5.1. Exploración clínica 58

1.4.5.2. Diagnóstico epidemiológico 62

1.4.5.3. Diagnóstico laboratorial 63

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.6. Prevención y control 70

1.4.6.1. Tratamiento 70

1.4.6.1.1. Tratamiento sintomático 70

1.4.6.1.2. Tratamientos específicos 74

1.4.6.2. Otras medidas de prevención 86

1.4.6.2.1. Minimizar la exposición al patógeno 86

1.4.6.2.2. Mejorar la inmunidad 89

1.5. DIARREA NEONATAL POR CAUSAS NUTRICIONALES 93

2. OBJETIVOS 97

3. ESTUDIO I: PREVALENCIA E INTERACCIONES DE LOS PRINCIPALES ENTEROPATÓGENOS IMPLICADOS EN LA DIARREA NEONATAL DEL TERNERO 101

3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 103

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS 105

3.2.1. Diseño del estudio y obtención de las muestras 105

3.2.2. Análisis laboratorial de las muestras 106

3.2.2.1. Análisis bacteriológico 106

3.2.2.2. Análisis virológico 109

3.2.2.3. Análisis parasitológico 110

3.2.3. Análisis de datos 118

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 120

3.3.1. Análisis individual de los enteropatógenos 120

3.3.2. Análisis integrado de los enteropatógenos 152

4. ESTUDIO II: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y POTENCIAL ZOONÓSICO DE AISLADOS DE *Cryptosporidium* spp. Y *Giardia duodenalis* PROCEDENTES DE TERNEROS CON DIARREA DEL NOROESTE DE ESPAÑA. 179

4.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 181

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS 187

4.2.1. Caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp 187

4.2.2. Caracterización molecular de *Giardia duodenalis* 189

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 193

4.3.1. Caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp 193

4.3.2. Caracterización molecular de *Giardia duodenalis* 202

5. ESTUDIO III: EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÉNICAS AISLADAS DE TERNEROS DIARREICOS DEL NOROESTE DE ESPAÑA 207

5.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 209

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS 213

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 215

6. CONCLUSIONES 227

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. RESUMEN-RESUMO-ABSTRACT 233

8. REFERENCIAS..... 257

9. ANEXOS..... 303

ANEXO I: Concentraciones de cada antibiótico utilizadas en la tarjeta AST-GN96 305

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

A/E	Lesiones *attaching and effacing*
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AST	Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos
BCoV	Coronavirus bovino
bg	β-giardina
BLEE	Beta-lactamasas de espectro extendido
BNeV	Nebovirus bovino
BNoV	Norovirus bovino
BRoV	Rotavirus A bovino
BToV	Torovirus bovino
BVDV	Virus de la diarrea vírica bovina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMI90	Concentración mínima inhibitoria del 90% de las cepas
CNF	Factor citotóxico necrotizante
Ct	Ciclo umbral
dNTP	Desoxirribonucleótido
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EHEC	*E. coli* enterohemorrágica
ELISAd	Enzimoinmunoanálisis de adsorción de captura de antígeno
ELISAi	Enzimoinmunoanálisis de adsorción indirecto
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EPEC	*E. coli* enteropatógena
ETEC	*E. coli* enterotoxigénica
FTP	Fallo en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas
G	Genogrupo
g	Gramo
GAD	Glutamato descarboxilasa
Gb3	Globotriaosilceramida
GCC	Guanilil-ciclasa-C

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

gdh	Glutamato-dehidrogenasa
GIII	Genogrupo III
gp60	Glicoproteína de 60 kDa
IC95%	Intervalo de confianza al 95%
ICF	Inmunocromatografía
IFAT	Inmunofluorescencia directa
IgG	Inmunoglobulina G
kb	Kilobase
kg	Kilogramo
L	Litro
MDR	Multirresistentes
mEq	Miliequivalente
mg	Miligramo
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar por litro
mmol	Milimolar
mOsm	Miliosmol
NCD	Diarrea neonatal del ternero
nm	Nanómetro
ºC	Grados centígrados
opg	Ooquistes por gramo de heces
OR	*Odds Ratio*
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIB	Producto Interior Bruto
PMQR	Resistencia a las quinolonas mediada por plásmidos
qPCR	PCR en tiempo real
QRDR	Región determinante de la resistencia a las quinolonas
RFLP	Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR con transcripción inversa
s	Segundo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SID	Brecha aniónica
SSU rRNA	Subunidad 18s del ARN ribosomal
STEC	*E. coli* productora de toxinas Shiga
tpi	Triosa fosfato isomerasa
UGM	Unidades de Ganado Mayor
UI	Unidades Internacionales
V	Voltio
XLD	Xilosa Lisina Desoxicolato
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrómetro

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de *Cryptosporidium* spp. identificadas en el ganado vacuno. 33

Tabla 2. Genotipos de *Giardia duodenalis* y sus hospedadores más habituales. 38

Tabla 3. Especies de *Eimeria* que afectan al ganado vacuno. 40

Tabla 4. Rango de edad en el que es más habitual la infección con los agentes causales de NCD durante el primer mes de vida del ternero. 46

Tabla 5. Prevalencias de los principales agentes causales de NCD en terneros lactantes detectadas en estudios realizados en España y otros países europeos con n >30. 56

Tabla 6. Valoración del grado de deshidratación en terneros diarreicos en función de sus signos clínicos..... 59

Tabla 7. Características de la diarrea y del cuadro clínico en función del agente etiológico. 60

Tabla 8. Hallazgos observables en la necropsia en función del agente causal de la diarrea. 61

Tabla 9. Técnicas laboratoriales disponibles para cada agente causal de la NCD. 64

Tabla 10. Principales loci empleados para la detección y caracterización de los enteropatógenos más habitualmente implicados en la NCD. 69

Tabla 11. Patrones de resistencia a betalactámicos de *E. coli* en función de la beta-lactamasa producida. 79

Tabla 12. Patrones de resistencia a aminoglucósidos de *E. coli* en función de la enzima producida. 81

Tabla 13. Protocolo para la amplificación parcial, mediante qPCR, de los genes de *E. coli* que codifican para los distintos factores de virulencia estudiados. 108

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 14. Protocolo para la replicación del ARN vírico en la qPCR. 110

Tabla 15. Cebadores usados en la amplificación del gen que codifica para la subunidad ribosómica 18s de *Cryptosporidium* spp. 112

Tabla 16. Protocolo de amplificación del gen que codifica para la subunidad ribosómica 18s de *Cryptosporidium* spp..... 113

Tabla 17. Protocolo empleado para la digestión de los productos obtenidos en la segunda PCR que amplifica un fragmento del gen que codifica para la subunidad ribosómica 18s de *Cryptosporidium* spp. 114

Tabla 18. Patrones de restricción (en pares de bases) para las especies de *Cryptosporidium* más frecuentes en ganado bovino en función de la endonucleasa utilizada. 114

Tabla 19. Características morfométricas de los ooquistes que resultan útiles para identificar la especie de *Eimeria*. 117

Tabla 20. Prevalencia de las especies de *Eimeria* identificadas en muestras fecales de terneros diarreicos de entre 0 y 30 días de edad del Noroeste de España. 134

Tabla 21. Prevalencia de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en función de la edad del ternero. 138

Tabla 22. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en función de la edad del ternero. 139

Tabla 23. Prevalencia de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) en función de la edad del ternero. 141

Tabla 24. Prevalencia del nebovirus bovino (BNeV) en función de la edad del ternero. . 142

Tabla 25. Prevalencia de *G. duodenalis* en función de la edad del ternero. 143

Tabla 26. Prevalencia de *Eimeria* spp. en función de la edad del ternero. 143

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 27. Prevalencia de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en función de la consistencia de las heces. 145

Tabla 28. Prevalencia de norovirus bovino (BNoV) en función de la consistencia de las heces. 146

Tabla 29. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en función de la consistencia de las heces. 147

Tabla 30. Prevalencia de *G. duodenalis* en función de la consistencia de las heces. 149

Tabla 31. Prevalencia de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) en función de la consistencia de las heces. 151

Tabla 32. Interacciones significativas observadas entre los patógenos implicados en la NCD en terneros menores de un mes de vida del Noroeste de España. 161

Tabla 33. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* spp. identificados en humanos en orden de frecuencia con mención a su presencia o ausencia en el ganado vacuno. 183

Tabla 34. Cebadores empleados en la amplificación del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa. 187

Tabla 35. Protocolo de amplificación del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa. 188

Tabla 36. Cebadores empleados en la amplificación parcial de los genes que codifican para la β-giardina, glutamato deshidrogenasa y triosa-fosfato isomerasa. 190

Tabla 37. Protocolo de amplificación del gen que codifica para la β-giardina. 190

Tabla 38. Protocolo de amplificación del gen que codifica para la glutamato deshidrogenasa. 191

Tabla 39. Protocolo de amplificación del gen que codifica para la triosa-fosfato isomerasa. 192

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 40. Subtipos de *C. parvum* identificados mediante la secuenciación del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa. 194

Tabla 41. Antibióticos utilizados en las pruebas de susceptibilidad con los puntos de corte de la concentración mínima inhibitoria y el estándar internacional empleado para cada uno. 214

Tabla 42. Combinaciones de resistencias detectadas en más de un aislado de *E. coli* enterotoxigénica y su frecuencia. 216

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución por ayuntamientos de las explotaciones bovinas de Galicia. 5

Figura 2. Ciclo biológico de *C. parvum*. 36

Figura 3. Ciclo biológico de *G. duodenalis*. 38

Figura 4. Ciclo biológico de *E. bovis*. 42

Figura 5. Prevalencia de los enteropatógenos asociados con la aparición de NCD en terneros neonatos con diarrea de Galicia y Asturias. 120

Figura 6. Distribución de las muestras positivas a *Eimeria* spp. en función de sus recuentos de ooquistes por gramo de heces (opg). 133

Figura 7. Diagramas de caja que representan la distribución por edades de las muestras positivas a cada enteropatógeno. 136

Figura 8. Líneas de tendencia que representan la prevalencia de los diferentes enteropatógenos en función de la edad del animal. 137

Figura 9. Prevalencia de los enteropatógenos incluidos en el estudio en las infecciones simples. 154

Figura 10. Prevalencia de las infecciones mixtas al considerar el número de patógenos identificados. 156

Figura 11. Porcentaje de muestras positivas a cada enteropatógeno que corresponden a infecciones simples y mixtas. 157

Figura 12. Porcentaje de muestras positivas a cada enteropatógeno al considerar únicamente las infecciones mixtas. 157

Figura 13. Treinta combinaciones de patógenos más frecuentes en el conjunto de las infecciones mixtas. 158

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 14. Treinta combinaciones de patógenos más frecuentes en la primera semana de edad. 165

Figura 15. Interacciones significativas positivas y negativas detectadas en la primera semana de edad. 166

Figura 16. Red formada por las interacciones entre los patógenos detectadas en la primera semana de edad. 167

Figura 17. Treinta combinaciones de patógenos más frecuentes en la segunda semana de edad. 168

Figura 18. Interacciones significativas positivas y negativas detectadas en la segunda semana de edad. 170

Figura 19. Treinta combinaciones de patógenos más frecuentes en la tercera semana de edad. 171

Figura 20. Interacciones significativas positivas y negativas detectadas en la tercera semana de edad. 172

Figura 21. Treinta combinaciones de patógenos más frecuentes en la cuarta semana de edad. 174

Figura 22. Interacciones significativas positivas y negativas detectadas en la cuarta semana de edad. 175

Figura 23. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa de diversos aislados representativos del subtipo IIaA15G2R1 de *C. parvum* identificados en terneros. 196

Figura 24. Porcentaje de cepas de *E. coli* enterotóxigénica en función del número de antibióticos frente a los que mostró resistencia. 215

Figura 25. Porcentaje de cepas de *E. coli* enterotoxigénica susceptibles a cada antibiótico testado. 218

Figura 26. Frecuencias de la concentración mínima inhibitoria para los diferentes antibióticos beta-lactámicos testados: ampicilina (A), amoxicilina/ácido clavulánico (B), cefalexina (C), cefalotina (D), ceftiofur (E), cefoperazona (F) y cefquinoma (G). 219

Figura 27. Frecuencias de la concentración mínima inhibitoria para la gentamicina (A), neomicina (B), flumequina (C), enrofloxacino (D), marbofloxacino (E), tetraciclina (F) y trimetoprim/sulfametoxazol (G). 220

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES E IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL SECTOR BOVINO GALLEGO

La importancia económica del sector ganadero a nivel mundial ha ido disminuyendo a lo largo del siglo XX, fruto de la desagrarización de la economía. No obstante, los valores actuales de las principales macromagnitudes agrarias se alcanzaron de forma más tardía en España que en el resto de la Unión Europea, principalmente por la demora en la implantación de la Política Agraria Común.

En la actualidad, el sector primario representa el 2,8% del Producto Interior Bruto (PIB) español y cerca del 4% del empleo (Instituto Nacional de Estadística, 2020; Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020a), pero su impacto sobre el conjunto de la economía es mucho mayor si tenemos en cuenta a la industria agroalimentaria, que es el subsector industrial más importante del país, ya que por sí sola representa alrededor de un 3% del PIB y ocupa a unas 500.000 personas (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020b). La producción final agraria asciende a 50.000 millones de euros y consta en un 60% de producción final vegetal y en un 40% de producción final ganadera, de la cual alrededor del 26% corresponde al sector bovino (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020a).

Sin embargo, en el caso de la Comunidad Autónoma de Galicia, el sector agrario representa un 4,7% del PIB y un 7,1% del empleo, prácticamente duplicando la media nacional (Instituto Galego de Estatística, 2020a). La producción final agraria es de 3.625 millones de euros y está constituida por un 64% de producción final ganadera y un 36% de producción final vegetal, es decir, una situación prácticamente inversa a la observada en el conjunto del territorio nacional (MERCASA, 2020).

Dentro del sector ganadero gallego, el ganado bovino adquiere una importancia especial, suponiendo el 37% de las unidades de ganado mayor (UGM) de la Comunidad (Consellería do Medio Rural, 2021). El vacuno gallego supone el 14% del censo bovino

USC DE COMPOSTELA

nacional, el 39% de la producción láctea y el 14% de la producción de carne (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020c, 2020d, 2021). En este contexto, se debe mencionar la ausencia de una distinción clara entre los sectores cárnico y lácteo en el bovino gallego. Aunque sea posible diferenciar entre censo lechero y cárnico, no es tan sencillo establecer una clasificación de explotaciones en función de sus producciones, ya que, además de la existencia de explotaciones mixtas, también tiene importancia la producción de carne en explotaciones de aptitud láctea que ceban parte de sus terneros (Consellería do Medio Rural, 2020). De todas formas, de las casi 30.800 explotaciones de vacuno registradas en Galicia, unas 6.900 son eminentemente lecheras y 19.900 de aptitud cárnica. A este último grupo hay que sumarle los casi 3.500 cebaderos de terneros de la Comunidad (Instituto Galego de Estatística, 2020b).

La distribución de las explotaciones bovinas en Galicia al considerar los ayuntamientos (Figura 1) se correlaciona con las características socioeconómicas de la Comunidad, caracterizada por una alta dispersión poblacional, aunque con una creciente concentración demográfica en los núcleos urbanos y en las zonas costeras de A Coruña y Pontevedra. Como consecuencia de ello, existe un alto riesgo de despoblamiento de las zonas rurales, especialmente en las provincias de Lugo y Ourense. Además, la población sufre un progresivo envejecimiento, sobre todo en Lugo y Ourense, donde más del 25% de los habitantes tiene más de 65 años (Consellería do Medio Rural, 2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

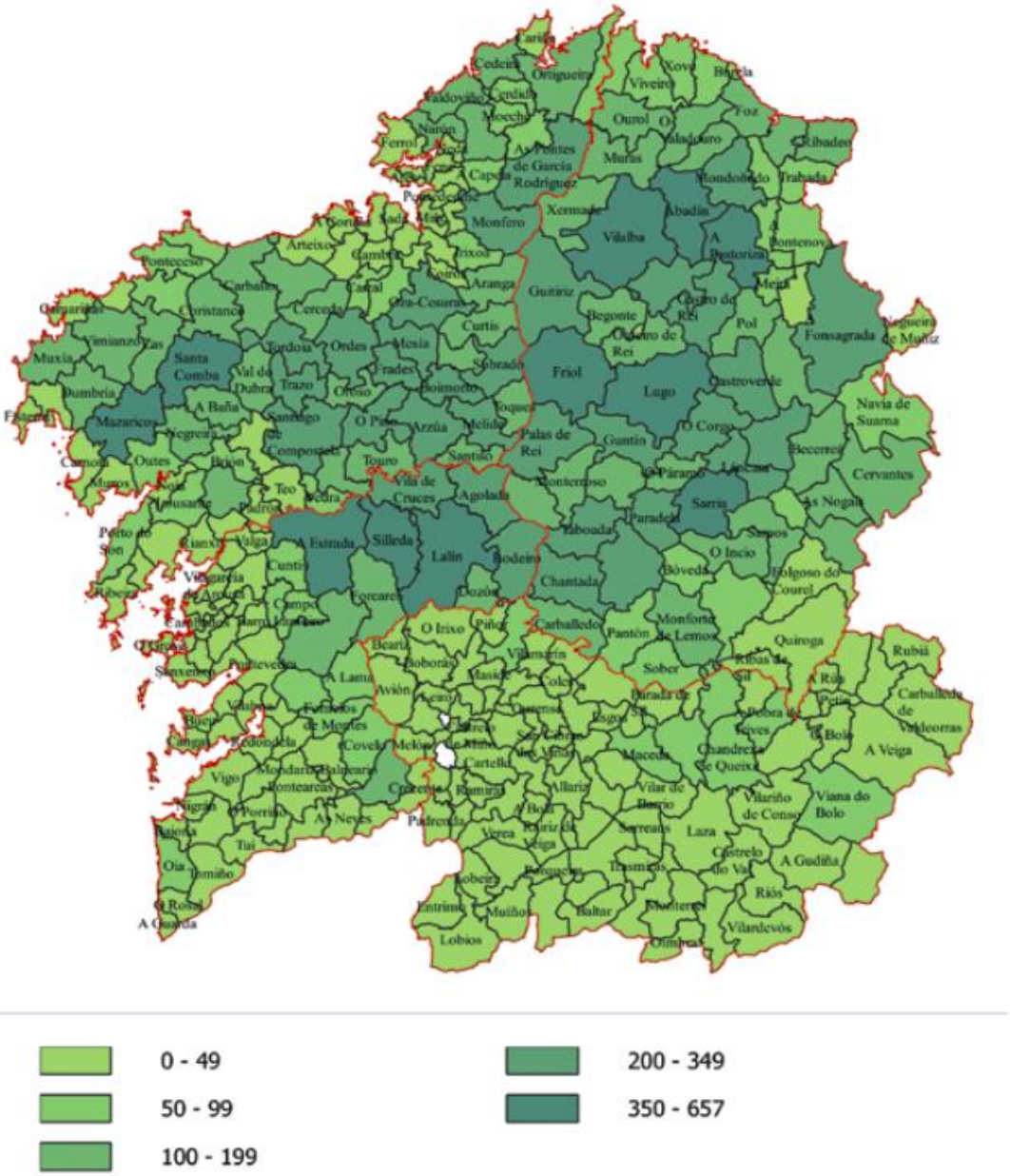


Figura 1. Distribución por ayuntamientos de las explotaciones bovinas de Galicia (Consellería do Medio Rural, 2021)**.**

Como consecuencia de esta estructura demográfica y del minifundismo y alto grado de parcelación que caracteriza a Galicia, en el sector vacuno gallego observamos un modelo dual. Por un lado, destaca la existencia de explotaciones industrializadas y tecnificadas, principalmente en el ámbito del sector lácteo, cuyas rentabilidades están condicionadas en cierta medida por la dependencia externa para la obtención de sus medios de producción. No obstante, en el ámbito gallego la instauración de este tipo de granjas se ve condicionada por la escasa base territorial de las explotaciones, lo que limita el número de animales que

USC DE COMPOSTELA

pueden mantener, sin bien es cierto que existen bolsas de tierra sin emplear que podrían favorecer el ajuste territorial de las granjas existentes y disminuir sus costos de forraje (Blanco, 2014; Consellería do Medio Rural, 2020). Por otra parte, nos encontramos con un gran número de pequeñas explotaciones, de escasa dimensión y baja capitalización, que orientan su producción hacia la comercialización a través de mercados locales. Sin embargo, es de mención inexcusable que en los últimos años se ha producido una disminución en el número de explotaciones y, como consecuencia, de efectivos bovinos. Este fenómeno se debe fundamentalmente a la desaparición de aquellas unidades menos productivas y la jubilación de muchos titulares de granjas de pequeño tamaño (Consellería do Medio Rural, 2020).

Finalmente, es necesario hacer referencia a los sistemas de producción empleados en el sector bovino gallego. Las explotaciones de ganado vacuno lechero se ubican fundamentalmente en zonas llanas, ya que poseen condiciones climatológicas y orográficas más propicias. Este tipo de producción se ha ido intensificando de modo progresivo, sobre todo en las explotaciones de mayor tamaño, con el confinamiento de los animales en las naves, una sustitución considerable de la alimentación mediante pastos por forrajes y la proliferación de los sistemas de alimentación con carro mezclador (Sineiro García *et al.*, 2009).

En contraste, en las regiones montañosas predominan los rebaños de vacas nodrizas, basados en razas autóctonas más adaptadas a la orografía y a las condiciones climatológicas desfavorables, capaces de aprovechar unos recursos que de otra forma resultarían improductivos. Se trata de explotaciones en régimen extensivo o semiextensivo, con baja carga ganadera y poca inversión en mano de obra e infraestructuras (Acero Adámez, 2009). No obstante, dentro de la aptitud cárnica, también nos encontramos los cebaderos de terneros, que habitualmente utilizan sistemas intensivos de producción y, para minimizar costes, se localizan cerca de las zonas donde se encuentran los mataderos y las industrias de alimentación animal.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SANITARIA DE LA DIARREA NEONATAL DEL TERNERO

La diarrea se define como un incremento anormal de la frecuencia, fluidez o volumen de las heces debido al aumento del contenido de agua fecal. La diarrea neonatal del ternero (*neonatal calf diarrhoea*: NCD) es un proceso complejo y multifactorial muy frecuente en las explotaciones de ganado vacuno y que afecta sobre todo a los animales menores de un mes (Gomez y Weese, 2017). Se ha constatado que un amplio porcentaje de estos procesos son de origen infeccioso, habiéndose identificado múltiples agentes entéricos implicados en su aparición, siendo habitual el hallazgo de co-infecciones; sin embargo, se ha comprobado que las características intrínsecas del ternero, como su estado inmunológico y nutricional, el manejo del rebaño y el medio ambiente que lo rodea también juegan un importante papel en la aparición de NCD (Bendali *et al.*, 1999a; Scott *et al.*, 2004; Cho y Yoon, 2014).

Aunque a principios del siglo XX se consideraba que la bacteria *Escherichia coli* era la única causa de NCD (Smith y Orcutt, 1925), en las últimas décadas se han realizado notables avances que han revelado su carácter plurietiológico. La implicación de agentes víricos en la NCD se comprobó en la década de 1970, en Nebraska (EE.UU.), donde se aislaron dos tipos diferentes de virus (rotavirus y coronavirus) en las heces de terneros lactantes con diarrea (Mebus *et al.*, 1971, 1973). Posteriormente, se identificaron astrovirus y calicivirus en las heces de terneros con NCD (Woode y Bridger, 1978); sin embargo, el papel que algunos de estos virus juegan en la aparición del proceso sigue siendo controvertido al haberse hallado también en las heces de individuos sanos (Gomez y Weese, 2017). En cuanto a los enteropatógenos parasitarios, no fue hasta 1971 cuando se identificó por primera vez la presencia de *Cryptosporidium parvum* en casos de NCD, aunque al principio se consideró un agente secundario (Panciera *et al.*, 1971).

En la actualidad, se considera que los principales enteropatógenos involucrados en la aparición de este síndrome son *E. coli*, rotavirus A bovino (BRoV), coronavirus bovino (BCoV) y *C. parvum* (Bendali *et al.*, 1999a). Algunos autores también señalan la

USC UNIVERSIDADE

importancia de *Giardia duodenalis* (Björkman *et al.*, 2003) y *Eimeria* spp. (Cornelissen *et al.*, 1995) o *Salmonella* spp. (Mohler *et al.*, 2009). Recientemente se ha sugerido la implicación de otros virus, que se consideran emergentes, como el torovirus bovino (BToV), el norovirus bovino (BNoV) y el nebovirus bovino (BNeV) (Cho y Yoon, 2014). Todos ellos serán objeto de estudio en este trabajo.

La aparición de casos de NCD en una granja supone importantes pérdidas económicas en la explotación, aunque realizar una estimación exacta no es sencillo. Por ejemplo, un estudio realizado en Estados Unidos en 2019 señaló que el coste de cada caso de esta patología asciende, de media, a 5,39 dólares por ternero, a lo que hay que sumar el precio de las medidas preventivas frente a la misma, que es de unos 9,22 dólares por animal (Hawkins *et al.*, 2019). De la misma forma, otro estudio realizado en los Países Bajos determinó que un incremento en la incidencia de NCD aumenta el coste de la recría por novilla en unos 100 € (Mohd Nor *et al.*, 2012). Estas mermas económicas son el resultado de diversas pérdidas tanto directas como indirectas. Dentro de las primeras, se ha comprobado que la NCD es la causa de mortalidad más importante en los terneros menores de 30 días de vida, con la consecuente pérdida del valor del ternero y de su potencial genético para la mejora del rebaño (Bendali *et al.*, 1999a). En este sentido, el *National Animal Health Monitoring System for US Dairy Cattle* de 2014 constató que el 57% de las muertes de terneros antes del destete fueron resultado de NCD (USDA, 2018), observándose resultados similares en otros países como Noruega (Gulliksen *et al.*, 2009) o Corea del Sur (Hur *et al.*, 2013). Además, para reducir las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad del proceso se deben aplicar una serie de medidas de tratamiento, control y prevención, que precisan del recurso a servicios veterinarios y técnicas diagnósticas y terapéuticas cuyo coste también se debe considerar (Bendali *et al.*, 1999b; Scott *et al.*, 2004). La aparición de un brote de NCD en una granja también conlleva ciertas pérdidas indirectas, cuya estimación es mucho más complicada. Así, en los terneros que sobreviven se observa una disminución de la ganancia diaria de peso. Un estudio realizado durante un período de 14 años sobre 3637 terneros sometidos a condiciones similares de manejo, demostró que los animales que mostraron diarrea pesaron una media de 9 kg menos que los sanos (Anderson *et al.*, 2003). En otros trabajos se obtuvieron resultados similares (Klein *et al.*, 2008; Pardon *et al.*, 2013). Por otra parte, la presencia de NCD puede actuar como un factor de riesgo para la aparición de otras enfermedades, como las respiratorias (Curtis *et al.*, 1988) y tiene un notable impacto en el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

rendimiento productivo y reproductivo posterior de los individuos afectados. Así, se ha comprobado que las novillas que padecen diarrea en su primer mes de vida presentan un mayor intervalo nacimiento-inseminación fecundante y una edad al primer parto más elevada (Aghakeshmiri *et al.*, 2017), así como una menor producción de leche en su primera lactación (Svensson y Hultgren, 2008).

Además del impacto económico, la NCD tiene importancia en el ámbito de la Salud Pública, ya que algunos de los enteropatógenos antes citados son zoonósicos. Este es el caso de algunos patotipos de *E. coli*, *Salmonella* spp., *C. parvum* o *G. duodenalis* (Kolenda *et al.*, 2015; Holschbach y Peek, 2018; Chalmers *et al.*, 2019; Taghipour *et al.*, 2022). Además, su tratamiento es uno de los principales motivos del uso de antibióticos en muchas granjas, lo que puede suponer un peligro potencial para la salud humana al favorecer la presencia de residuos medicamentosos en la carne de los animales tratados así como la aparición y diseminación de cepas bacterianas resistentes (Frank y Kaneene, 1993; Bendali *et al.*, 1999a; Smith, 2012).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3. PROCESO DE LA DIARREA Y CUADRO CLÍNICO

1.3.1. Tipos de diarrea

Con carácter general, se han descrito diversos procesos orgánicos e intestinales que pueden dar lugar a NCD. En esta sección, se reseñan los más importantes. No obstante, la aparición de la diarrea no suele el resultado de un único proceso, sino que un determinado microorganismo puede acabar causando diarrea por varios mecanismos.

a) <u>Diarrea secretora</u>

Este tipo de diarrea suele ser la consecuencia de la acción de enterotoxinas producidas por determinados agentes bacterianos como la *E. coli* enterotoxigénica, que provocan una alteración en el balance iónico y electrolítico. Estas toxinas se unen a los receptores guanilil–ciclasa–C (GCC) (Schulz *et al.*, 1990) del borde en cepillo de las células del epitelio intestinal, principalmente en las vellosidades del íleon (Krause *et al.*, 1994; Al-Majali *et al.*, 2000; Foster y Smith, 2009). Esta unión deriva en la inhibición del intercambiador Na^+/H^+ de la pared apical, disminuyendo la absorción de sodio a través de las microvellosidades, y la secreción de cloro por parte de las células de las criptas, lo que conlleva la salida masiva de agua al lumen intestinal (Giannella y Mann, 2003; Gyles y Fairbrother, 2010). Además, la toxina puede inducir la secreción de bicarbonato que, al actuar como un agente osmótico, atrae aún más agua al lumen intestinal (Sellers *et al.*, 2004), desencadenando una diarrea muy líquida y profusa.

b) <u>Diarrea por malabsorción y maladigestión</u>

La malabsorción suele aparecer a consecuencia de la lesión de las vellosidades y microvellosidades intestinales, que da lugar a una disminución de la superficie de absorción (González y Astiz, 2005). En estos casos, se produce una pérdida de enterocitos maduros en los ápices de las vellosidades intestinales, induciendo su atrofia. Para tratar de reemplazar los enterocitos destruidos, se produce una hiperplasia de las criptas, que tienen una menor

capacidad de absorción, pero también de secreción de ciertas enzimas digestivas, como la lactasa, lo que implica una disminución de la capacidad de digestión (maladigestión) (Argenzio, 1992; Foster y Smith, 2009). De esta forma se reduce la absorción de sodio y agua, y una gran cantidad de glúcidos (como la lactosa), grasas y proteínas permanecen en el lumen intestinal (Ramig, 2004), desencadenando una diarrea osmótica, cuyo mecanismo se explicará a continuación.

Por otra parte, la alteración de las funciones de absorción y digestión de los enterocitos puede deberse también a un proceso inflamatorio a nivel intestinal, que suele asociarse a un incremento del peristaltismo que reduce la absorción de agua y nutrientes (González y Astiz, 2005). Además, estos procesos dan lugar a una respuesta inmunitaria en la que están implicados determinados productos, como las prostaglandinas, que activan los mecanismos de secreción de los enterocitos y de las células de las criptas, produciéndose una secreción masiva de iones de cloro, sodio y agua al lumen intestinal (Argenzio, 1985). Por lo tanto, en estos casos, la diarrea por malabsorción y maladigestión se acompaña también de una diarrea secretora.

c) <u>Diarrea osmótica</u>

La diarrea osmótica está asociada a la malabsorción y maladigestión, que provocan que la lactosa no se hidrolice en el intestino delgado y pase al colon acompañada por su equivalente osmótico de agua (Argenzio, 1985). Si bien el colon no es capaz de absorber la lactosa, las bacterias saprófitas allí presentes pueden transformarla en ácidos grasos de cadena corta que se absorben rápidamente, compensando la disfunción del intestino delgado (Argenzio, 1981, 1985). En los terneros muy jóvenes, el desarrollo de la flora bacteriana puede no ser suficiente para metabolizar la lactosa, por lo que permanece en el lumen intestinal, provocando la secreción de agua y dando lugar a la diarrea o agravándola (Argenzio, 1992; González y Astiz, 2005). Sin embargo, en aquellos animales con una microflora bien desarrollada, puede tener lugar una hiperfermentación del exceso de lactosa, que tiene como consecuencia la producción de ácido láctico y la acidificación de los contenidos del colon. Como la mucosa del colon no es capaz de absorber el ácido láctico, éste actúa como un agente osmótico que desencadena hipersecreción, y que finalmente resulta en la diarrea (Argenzio, 1992).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.2. Implicaciones de la diarrea a nivel sistémico

Tal y como se acaba de exponer, la NCD es el resultado del incremento de la secreción de líquidos y/o de la disminución de capacidad de absorción y digestión intestinal, provocando pérdidas de fluidos y electrolitos. Mientras el ternero pueda compensarlas, permanecerá alerta y continuará mamando. En caso contrario, aparecerán signos de deshidratación, acidosis, desequilibrios electrolíticos (hiponatremia e hipercalemia) y un balance energético negativo con o sin hipoglucemia (Smith y Berchtold, 2014; Izzo *et al.*, 2015).

En primer lugar, las pérdidas de fluido que causan la deshidratación proceden fundamentalmente del compartimento vascular (Philips *et al.*, 1971), lo que provoca el colapso cardiovascular y la hipovolemia, dando lugar a la vasoconstricción periférica y la falta de perfusión capilar. Además, la maladigestión puede resultar en la permanencia de la lactosa en el lumen del intestino grueso, lo que puede resultar en la producción de ácido láctico, la acidificación del medio intestinal y la consecuente acidosis (Omole *et al.*, 2001). Es reseñable que el riesgo de que un ternero con diarrea neonatal desarrolle acidosis se incrementa con la edad, lo que probablemente esté relacionado con que su microflora intestinal tiene una mayor capacidad para fermentar la lactosa (Trefz *et al.*, 2012a). Esta acidosis también puede venir provocada o agravarse por la pérdida de iones de bicarbonato vía fecal (Scott *et al.*, 2004).

El cuadro de deshidratación agrava la acidosis intestinal y provoca una acidosis metabólica. Esto se debe, entre otros elementos, a que la falta de perfusión capilar disminuye la capacidad renal para compensarla y da lugar a la hipoxia de las células, que recurren al metabolismo anaerobio dando lugar a mayores cantidades de ácido láctico. Además, la capacidad del hígado para metabolizar el lactato se ve disminuida por el exceso intracelular de iones H^+ y por la hipovolemia, haciendo que este órgano pueda terminar por producir una mayor cantidad de ácido láctico, agravando todavía más la acidosis (González y Astiz, 2005).

La acidosis contribuye al malestar del ternero, ya que incrementa la resistencia vascular y perjudica a la función cardiovascular, tanto por sus efectos directos sobre la

misma como por la inhibición de las catecolaminas (Izzo *et al.*, 2015). Por otra parte, puede desembocar en una disfunción de la gotera esofágica, dando lugar al *ruminal drinking* y la consecuente acidosis ruminal (Lorenz, 2004a).

Asimismo, la acidosis del animal altera el funcionamiento de la bomba sodio-potasio, evitando que el sodio sea expulsado de las células a costa de disminuir los niveles de potasio en las mismas. De esta forma, a pesar de que se producen pérdidas de sodio y de potasio a través de las heces que dan lugar a una disminución del contenido total de potasio corporal, la redistribución del mismo hacia el espacio extracelular se traduce en un incremento de sus niveles en el plasma sanguíneo, dando lugar a una hipercaliemia (Lewis y Phillips, 1972, 1973; Sweeney, 1999). Como resultado de todo esto, el animal muestra ataxia, depresión, enoftalmos y pérdida de los reflejos palpebral y de succión, que pueden llegar hasta el decúbito prolongado y el coma (Kasari y Naylor, 1985a; Lorenz, 2004b; Izzo *et al.*, 2015). Asimismo, si la malabsorción persiste, el animal puede desarrollar caquexia y fallecer a causa de la malnutrición y la hipoglucemia (Izzo *et al.*, 2015). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la muerte del animal viene dada por el desequilibrio existente entre los niveles de potasio intracelular y extracelular, que puede resultar en fallo cardíaco (Weldon *et al.*, 1992).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4. DIARREA INFECCIOSA

1.4.1. Agentes causales: enteropatógenos bacterianos

Al nacimiento, el tracto digestivo del ternero es estéril, pero diversas bacterias lo colonizan durante sus primeras 24 horas de vida. Estos microorganismos forman una flora intestinal que acompañará al animal durante toda su vida, cuyos componentes mayoritarios son bacterias anaerobias y ciertas cepas de *E. coli*, que actúan como comensales y están presentes en concentraciones de 10^7-10^8 organismos por gramo de heces. Sin embargo, existen otras cepas de *E. coli* y otras bacterias como *Salmonella* spp. o *Clostridium perfringens* que son reconocidos enteropatógenos, dando lugar a síndromes como la NCD (Schaechter, 2009; Gyles y Fairbrother, 2010).

1.4.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae de la clase γ-Proteobacteria (Moxley, 2013a). Miden entre 5-10 μm de longitud y 20 nm de diámetro y se consideran Gram negativas, anaerobias facultativas, no formadoras de esporas, móviles y con forma de bacilo. Generalmente fermentan lactosa, poseen lisina-descarboxilasa, producen indol, no crecen en citrato y no producen ureasa, ácido sulfhídrico, ni acetoína (Voges-Proskauer negativa). Su nicho principal es la capa mucosa del colon (Kaper *et al.*, 2004; Schaechter, 2009; Gyles y Fairbrother, 2010).

Estructura y serotipado

Como en la mayoría de las bacterias Gram negativas, *E. coli* presenta una pared celular que consiste en una membrana externa y una membrana citoplasmática, entre las que se disponen el periplasma y una fina capa de peptidoglucanos. Algunas cepas cuentan con una cápsula polisacarídica que rodea a la membrana externa y muchas de ellas son móviles gracias a la presencia de 5-10 flagelos, que están conformados por proteínas específicas,

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

siendo la principal la flagelina (Schaechter, 2009; Moxley, 2013a). Además, muchas cepas de *E. coli* cuentan con fimbrias, que son apéndices en forma de pelo, situados de forma difusa por la superficie de la bacteria, que les permiten adherirse entre sí y a superficies de su entorno (Nagy y Fekete, 1999; Schaechter, 2009; Moxley, 2013a).

Las cepas de *E. coli* se clasifican principalmente por las diferencias serológicas existentes entre sus antígenos O, K y H, determinados por el lipopolisacárido de la membrana externa, el polisacárido capsular del que disponen algunas cepas y las proteínas flagelares, respectivamente. Hasta el momento, se han descrito 174 tipos de antígenos O y 53 tipos de antígenos H. Mientras que los antígenos O y H se suelen identificar mediante un método conocido como serotipado, los antígenos K no se suelen determinar de forma rutinaria. Adicionalmente, se pueden caracterizar los antígenos fimbriales F, cuya identificación puede ser útil para la caracterización de las cepas (Gyles y Fairbrother, 2010).

La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales. Sin embargo, una pequeña proporción de cepas altamente adaptadas han adquirido atributos de virulencia específicos que les confieren una mayor capacidad para adaptarse a nuevos nichos y causar diferentes acciones patógenas, lo que podría traducirse en la aparición de cuadros clínicos de diversa gravedad. Los factores de virulencia pueden ser de dos clases: factores de colonización, y toxinas y moléculas efectoras. Dentro de los primeros, se han descrito 28 factores de colonización en las *E. coli* patógenas, destacando de entre ellos las adhesinas, que son proteínas incluidas en la membrana externa cuya función es unirse a los receptores de la superficie de la célula hospedadora. Pueden ser fimbriales, propias de las fimbrias, o afimbriales, asociadas a la cápsula (Kaper *et al.*, 2004; Moxley, 2013a). En cuanto las toxinas y moléculas efectoras, se han identificado 33 diferentes, provocando diversas alteraciones en el metabolismo y la estructura de la célula hospedadora (Kaper *et al.*, 2004). La presencia de genes de virulencia determina la expresión de ciertos factores de virulencia, que permiten clasificar a las *E. coli* patógenas en diferentes patotipos, siendo la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), la *E. coli* enteropatogéna (EPEC) y la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) los patotipos más importantes en la NCD (Gyles y Fairbrother, 2010).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.1.1.1. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

ETEC es el patotipo de *E. coli* más frecuentemente relacionado con la aparición de diarrea en los animales de producción, e incluye las cepas que producen tanto enterotoxinas como adhesinas (Nagy y Fekete, 2005). Las primeras actúan de forma local en los enterocitos, estimulando la secreción de agua y electrolitos y/o una menor absorción de fluidos. A su vez, las adhesinas permiten que las bacterias se adhieran a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino delgado sin inducir lesiones morfológicas, de forma que puedan transferir las enterotoxinas de una forma más eficaz a las células diana (Nagy y Fekete, 1999; Gyles y Fairbrother, 2010).

Factores de virulencia de ETEC causante de NCD

Las cepas de ETEC responsables de NCD suelen caracterizarse por producir las adhesinas F5 y/o F41, y la enterotoxina STa. No obstante, se han detectado cepas que producen la fimbria F17 y/o las enterotoxinas STb y LTII, incluso en combinación con las anteriormente citadas (Dubreuil *et al.*, 2016). Suelen pertenecer a los serogrupos O8, O9, O20 y O101, y habitualmente producen un antígeno polisacarídico capsular (K25, K28, K30, K35) que intensifica la colonización inducida por las adhesinas (Nagy *et al.*, 2005).

a) <u>Adhesinas fimbriales</u>

Las ETEC aisladas en cada especie animal muestran familias o grupos de diferentes fimbrias que determinan su patogenicidad en esa especie (Acres, 1985). Las fimbrias presentan adhesinas, que se unen a receptores específicos de la célula hospedadora; sin embargo, el grado de expresión de estos receptores depende, en muchos casos, de la edad del hospedador, que obviamente influye en la resistencia o susceptibilidad del animal a la adhesión de la bacteria (Nagy y Fekete, 2005). Hasta hace unos años, la nomenclatura de las fimbrias no estaba estandarizada y se relacionaba con su cepa de origen, estructura o función. Aunque esa nomenclatura todavía se mantiene, en la actualidad las fimbrias se designan mediante un código constituido por la letra F (indicativa de fimbria) seguida de un número específico para tipo (Gyles y Fairbrother, 2010). A continuación, se describen las principales fimbrias de las ETEC implicadas en la NCD.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fimbria F5 (también conocida como K99)

Es la fimbria más importante en las ETEC que afectan a los terneros, codificada por el locus *fan* que se encuentra en un plásmido (Acres, 1985; Gyles y Fairbrother, 2010). La mayor subunidad de esta fimbria es la adhesina, que le permite unirse a sus receptores específicos, ciertos glicolípidos como el N–ácido glicolilneuramínico–GM3, N–ácido glicolilneuramínico–GM2 y N–ácido glicolilneuramínico–GD1a; por ello, la adhesina media la unión de ETEC a la mucosa del intestino delgado posterior de los terneros (Teneberg *et al.*, 1993; Gyles y Fairbrother, 2010).

Fimbria F41

Este tipo de fimbrias son apéndices fibrilares codificados por genes presentes en el cromosoma. Aparecen junto a las F5 en ETEC de los serogrupos O9 y O101. Se han descrito cepas que solo producen F41, pero aún no se han aislado en ganado vacuno (De Graaf y Roorda, 1982; Acres, 1985; Gyles y Fairbrother, 2010). Al igual que en el caso de F5, la colonización mediada por F41 se observa en el intestino delgado posterior de los terneros, pero muestra diferentes receptores, principalmente glicoproteínas como la glicoforina (Acres, 1985; Klemm, 1985; Brooks *et al.*, 1989; Gyles y Fairbrother, 2010).

Fimbria F17

Aunque las fimbrias F17 se encuentran sobre todo en cepas bovinas de *E. coli* necrotoxigénico, produciendo factor citotóxico necrotizante (CNF) 1 o CNF2, también se han hallado en cepas ETEC bovinas; en estas cepas todavía se desconoce su función o asociación con la diarrea (Mainil *et al.*, 2000; Gyles y Fairbrother, 2010). Son fimbrias flexibles, de 3 nm de ancho, codificadas por un *cluster* de genes presente en un plásmido. Su subunidad principal, conocida como 17A, termina en una fibrilla que contiene la adhesina 17G, que se une a los receptores N–acetil–D–glucosamina situados entre las microvellosidades del epitelio intestinal de los rumiantes neonatos (Lintermans *et al.*, 1991; Buts *et al.*, 2003).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

b) <u>Adhesinas afimbriales</u>

Dentro de ellas se incluye la CS31A, una estructura capsular que rodea a la bacteria. Esta adhesina, codificada por un plásmido y compuesta de la proteína ClpG, también aparece en las cepas de *E. coli* causantes de septicemia en el ganado bovino (Girardeau *et al.*, 1988; Contrepois *et al.*, 1993; Le Bouguénec y Bertin, 1999).

c) <u>Enterotoxinas</u>

Las enterotoxinas son proteínas extracelulares capaces de ejercer su acción en el epitelio intestinal. Las ETEC producen dos tipos de enterotoxinas: las ST, toxinas de bajo peso molecular y termoestables; y las LT, toxinas de elevado peso molecular y termolábiles. Ambas están codificadas por plásmidos y las LT son mucho más antigénicas que las ST. Las ETEC implicadas en la NCD solo producen enterotoxinas ST y, dentro de este grupo, STa. (Gyles y Fairbrother, 2010).

Patogenia y lesiones

Para que las cepas ETEC provoquen NCD deben adherirse al epitelio del intestino delgado mediante sus antígenos fimbriales, principalmente F5 (Acres, 1985; Mouricout y Julien, 1987), permitiendo que la bacteria colonice la mucosa intestinal en lugar de ser expulsada por los movimientos peristálticos (Foster y Smith, 2009). La adhesión bacteriana depende de la temperatura y del pH. Los antígenos fimbriales solo se expresan en medios con un pH menor de 6,5, siendo su pH óptimo entre 4,75 y 5,25. Debido a que el pH del fluido intestinal aumenta a medida que progresa hacia el intestino grueso, es en el íleon donde se alcanza este umbral y, por tanto, la colonización por ETEC (Mouricout y Julien, 1987; Francis *et al.*, 1989; Foster y Smith, 2009). Por otra parte, la capacidad de los antígenos fimbriales de ETEC para unirse al epitelio del intestino delgado depende de la edad, decreciendo gradualmente desde las primeras doce horas de vida a las dos semanas de edad, cuando dejan de expresarse los receptores de sus adhesinas (Runnels *et al.*, 1980).

Una vez establecida, la bacteria coloniza el íleon, prolifera y se extiende en sentido proximal por todo el intestino delgado, a la vez que comienza producir la enterotoxina STa (Acres, 1985; Foster y Smith, 2009; Gyles y Fairbrother, 2010); este proceso es también

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dependiente del pH, siendo muy limitado cuando es menor de siete. Por lo tanto, la producción de la toxina es máxima en la última porción del intestino delgado (Mitchell *et al.*, 1974). Esta toxina es el mediador primario de la NCD causada por ETEC, ya que provoca una alteración en el balance iónico y electrolítico que resulta en una diarrea secretora (Holland, 1990; Foster y Smith, 2009).

Finalmente, es reseñable que el efecto de ETEC sobre la integridad de la mucosa intestinal varía en función del serotipo implicado y de otros factores fisiológicos y nutricionales del intestino delgado (Acres, 1985). Mientras que algunos estudios no señalan cambios significativos (Tzipori *et al.*, 1983), otros han descrito una atrofia de las vellosidades con degeneración y exfoliación de los enterocitos apicales de yeyuno e íleon, acompañada por una reacción inflamatoria caracterizada por una infiltración por neutrófilos, especialmente alrededor de las placas de Peyer (Bellamy y Acres, 1979).

1.4.1.1.2. *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Factores de virulencia, patogenia y lesiones

Las cepas enteropatógenas de *E. coli* no producen enterotoxinas, sino que presentan el gen *eae* que codifica para la intimina, una adhesina que genera lesiones conocidas como *attaching and effacing* (A/E) en los últimos tramos del intestino delgado y en el intestino grueso (Knutton *et al.*, 1991; Nataro y Kaper, 1998; Krause *et al.*, 2005). Estas lesiones consisten en que las microvellosidades son reemplazadas por estructuras filamentosas compactas denominadas pedestales (Moon *et al.*, 1983; Gyles y Fairbrother, 2010; Moxley, 2013b). Las EPEC presentes en la pared intestinal se adhieren a las células epiteliales mediante los pili tipo IV (*bundle-forming pili*) y los filamentos EspA. Esta adhesión da lugar a la expresión de un mecanismo de secreción de tipo III que provoca la traslocación de los receptores Tir a la superficie de los enterocitos donde funcionan como receptores para la intimina (Clarke *et al.*, 2003; Lung *et al.*, 2014; Kolenda *et al.*, 2015). La unión de la intimina a los receptores Tir provoca cambios en el citoesqueleto celular, incluyendo la acumulación de actina polimerizada que causa la destrucción de las microvellosidades de la zona donde está adherida la bacteria. De esta forma, se configuran los pedestales, que protruyen de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

superficie celular y engloban a cada bacteria de forma individual (Moon *et al.*, 1983; Gyles y Fairbrother, 2010).

Aún no se conoce completamente el mecanismo por el cual las cepas de EPEC provocan diarrea (Donnenberg y Finlay, 2013; Kolenda *et al.*, 2015), pero se ha sugerido que la pérdida de microvellosidades debida a las lesiones A/E puede inducir una diarrea por malabsorción (Nataro y Kaper, 1998; Gyles y Fairbrother, 2010). Sin embargo, la rápida aparición de la diarrea parece indicar hacia la implicación de un mecanismo secretor más activo, que probablemente esté relacionado con la actividad sobre los mediadores intracelulares del transporte iónico intestinal (Gyles y Fairbrother, 2010). Además, existen otros elementos que podrían jugar un papel importante en la aparición de la diarrea, como son la respuesta inflamatoria localizada que se produce en el lugar de la lesión, o el incremento de la secreción de cloro que resulta de la transmigración de los leucocitos polimorfonucleares al punto de adhesión de la bacteria (Gyles y Fairbrother, 2010).

1.4.1.1.3. *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Factores de virulencia

Las cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) son aquellas que producen toxinas Stx, caracterizadas por su efecto citopático profundo e irreversible sobre las células Vero (Paton y Paton, 1998). Las principales toxinas Stx en *E. coli* son Stx1, una familia homogénea de toxinas idénticas a las de *Shigella dysenteriae,* y Stx2, una familia más heterogénea que puede dividirse en varios subtipos y que es homóloga a Stx1 en un 56%. Los *E. coli* adquieren los genes que codifican para esta toxina mediante su infección con un bacteriófago (Gyles y Fairbrother, 2010; Moxley, 2013b).

Las cepas enterohemorrágicas (EHEC) de *E. coli* son un subconjunto de STEC que poseen factores de virulencia adicionales, como el factor de generación de lesiones A/E y un plásmido de virulencia (Levine, 1987). Si bien la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) considera que en la actualidad el término EHEC está obsoleto en medicina humana y recomienda englobar este tipo de cepas dentro del término general STEC

USC DE COMPOSTELA

(Koutsoumanis *et al.*, 2020), a efectos de este trabajo se va a seguir empleando para diferenciarlas. Un elevado porcentaje de bovinos son portadores asintomáticos de STEC (Gyles, 2007), pero ciertas cepas de EHEC, particularmente los serogrupos O2, O8, O22, O77, O82, O105, O113 y O171, son virulentos para el ganado vacuno, especialmente para los terneros jóvenes. En esta misma línea, el serotipo O157:H7 puede provocar colibacilosis en terneros, pero se considera no virulento en los bóvidos de mayor edad (Orden *et al.*, 1998; Naylor *et al.*, 2005). No obstante, la importancia de la presencia de este último serotipo en vacuno radica en su potencial zoonótico, actuando este tipo de ganado como uno de los principales reservorios del mismo para el ser humano (Moxley y Smith, 2010).

Patogenia y lesiones

Con carácter general, el mecanismo de acción de las cepas de STEC consiste en que sus toxinas Stx se unen con gran afinidad a los receptores globotriaosilceramida (Gb3) de la superficie de los enterocitos y se internalizan mediante endocitosis. Una vez en el interior de la célula inhiben la síntesis proteica, lo que resulta, en general, en la muerte de la célula (Gyles y Fairbrother, 2010). Por su parte, la patogenia de las cepas EHEC incluye la mortalidad celular por la acción de las toxinas Stx, que acabamos de describir, acompañada por la producción de lesiones A/E en el intestino grueso, especialmente en la parte terminal del recto (Kaper *et al.*, 2004). Este último mecanismo de acción, que es idéntico al descrito para EPEC, daría lugar a una diarrea por malabsorción agravada por el probable incremento de la permeabilidad intestinal y de la actividad secretora de las células epiteliales (Nataro y Kaper, 1998; Gyles y Fairbrother, 2010). Además, las cepas de EHEC pueden contar con un plásmido de virulencia adicional que, en el caso de *E. coli* O157:H7, contiene, entre otros elementos, el operón Ehx, que codifica una toxina que induce la lisis y la apoptosis de los enterocitos, colaborando por tanto en el incremento de la permeabilidad del epitelio intestinal (Bielaszewska *et al.*, 2014).

En el caso de los bóvidos, todavía no está claro el papel de las toxinas Stx en la NCD, ya que un elevado porcentaje de individuos asintomáticos son portadores de cepas de STEC y/o EHEC (Kolenda *et al.*, 2015). Como se ha descrito previamente, para su patogenia resulta imprescindible la presencia de los receptores Gb3, que no están presentes en su endotelio vascular intestinal (Pruimboom-Brees *et al.*, 2000), lo que impediría su transporte al torrente

USC DE COMPOSTELA

sanguíneo y la aparición de signos clínicos sistémicos. Tampoco poseen este tipo de receptores las células del colon que ya han sufrido un proceso de proliferación y migración a superficie luminal (Hoey *et al.*, 2002). Sin embargo, las células poco diferenciadas de este tramo del tracto intestinal sí poseen receptores para Stx1 (Hoey *et al.*, 2003); no obstante, la absorción de la toxina por parte de las mismas no causa la muerte celular, probablemente debido a la inactivación de Stx1 mediante su exclusión del retículo endoplasmático y su transporte a los lisosomas (Hoey *et al.*, 2003). Sin embargo, los linfocitos periféricos e intestinales y aproximadamente un tercio de los macrófagos que residen en la mucosa intestinal sí expresan los receptores Gb3, lo que permite que las toxinas Stx sean capaces de alterar una gran variedad de procesos de inmunomodulación (Menge, 2020); por lo tanto, el papel de Stx en la patogenia de la infección en los bóvidos sería principalmente inmunosupresor. Este hecho explicaría su presencia en animales asintomáticos (Menge, 2020), e implica que la aparición de diarrea sanguinolenta consecutiva a la infección con STEC que se ha descrito en algunas ocasiones (Chanter *et al.*, 1986; Wieler *et al.*, 1992; Dean-Nystrom *et al.*, 1997) probablemente esté relacionada con otros factores de virulencia de las cepas y no con la producción de Stx (Menge, 2020).

1.4.1.2. *Salmonella* spp.

Salmonella es un género de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae que se caracterizan por ser Gram negativas, anaerobias facultativas, oxidasa negativas y con forma de bacilo (Coburn *et al.*, 2007; Nielsen, 2013; Sanderson y Nair, 2013). Aunque no presentan una gran resistencia a los desinfectantes, a la incidencia de la luz solar directa ni a los antibióticos, se han aislado cepas multirresistentes en ganado bovino (Davis *et al.*, 2007; Nielsen, 2013). Además, pueden sobrevivir durante meses en materia orgánica como el estiércol y durante años en materia fecal seca (Taylor y Burrows, 1971; Plym-Forshell y Ekesbo, 1996; Nielsen, 2013).

Estructura y serotipado

Al igual que se mencionó en el caso de *E. coli*, *Salmonella* spp. cuenta con un lipopolisacárido en su membrana externa, en el que se ubica una región altamente variable conocida como antígeno O. Asimismo, cuenta con el antígeno flagelar H y el polisacárido

de virulencia capsular Vi. La estructura de estos antígenos y la determinación de su especificidad serológica son la base del esquema White-Kauffmann-Le Minor, que permite clasificar las cepas de *Salmonella* spp. en 2600 serovares (Grimont y Weill, 2007; Rycroft, 2013). Todos ellos se agrupan en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, subdividiéndose esta última en seis subespecies (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *hautenae* y *Salmonella enterica* subsp. *indica*). El 99% de las infecciones halladas tanto en humanos como en animales se deben a serovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Sanderson y Nair, 2013). En relación con la nomenclatura de estos serovares, en la práctica rutinaria normalmente no se indica el nombre de la subespecie, ya que solamente tienen nombre los serotipos de la subespecie *enterica*; así, se acostumbra a utilizar el género *Salmonella* seguido del nombre del serotipo (ej. *Salmonella* Typhimurium) (Tindall *et al.*, 2005).

Estos serovares también se pueden subdividir en tres categorías en función de su rango de hospedadores, que determinan sus manifestaciones clínicas (Stevens *et al.*, 2009):

1. Serovares con un amplio rango de hospedadores, como *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis, que pueden afectar a personas y a diversos animales causando principalmente una enteritis aguda autolimitante que puede manifestarse con una gran variedad de signos clínicos.
2. Serovares adaptados a un pequeño número de hospedadores donde producen infecciones sistémicas, como *Salmonella* Dublin en bóvidos y *Salmonella* Cholerasuis en suidos.
3. Serovares restringidos a un único hospedador, asociados a infecciones sistémicas graves. Un ejemplo sería *Salmonella* Typhi, que causa fiebre entérica exclusivamente en personas.

Aunque la salmonelosis en el ganado bovino puede estar provocada por un gran número de serovares, los más comunes son *S.* Typhimurium y *S.* Dublin. Las manifestaciones clínicas son muy variables pero, con carácter general, los terneros infectados con *S.* Dublin desarrollan una infección sistémica acompañada de signos respiratorios, mientras que *S.* Typhimurium causa una infección principalmente entérica, que

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de forma ocasional también puede acompañarse de bacteriemia (Wray *et al.*, 1987; Tsolis *et al.*, 1999; La Ragione *et al.*, 2013). Además, ambos serovares también muestran diferencias al considerar la edad del hospedador, pues las infecciones por *S.* Typhimurium predominan en terneros menores de dos meses, mientras que *S.* Dublin tiene una morbilidad similar en bovinos jóvenes y adultos (Rice *et al.*, 1997; Tsolis *et al.*, 1999; La Ragione *et al.*, 2013).

Patogenia y lesiones

Aunque, como se ha mencionado previamente, las infecciones por *Salmonella* spp. en terneros pueden dar lugar a signos clínicos muy variables, este trabajo se centrará en la patogenia de la infección entérica transmitida por vía oral.

El mecanismo de acción de *Salmonella* spp. comienza por la colonización del intestino delgado distal y el colon mediante la adhesión a las células epiteliales (La Ragione *et al.*, 2013). Esta unión es posible porque los receptores de tipo *Toll* de los enterocitos reconocen los patrones moleculares asociados al patógeno, lo que supone la internalización de la bacteria (Foster y Berndt, 2013); estos mecanismos se ven favorecidos en casos de parálisis gastrointestinal, de alteraciones de la flora normal o cuando ésta aún no se ha establecido, como en el caso de los neonatos (Smith, 2015a). A continuación, el sistema de secreción de tipo III de la bacteria transloca unas proteínas efectoras al citosol del enterocito, provocando su muerte y permitiendo así que el patógeno acceda a la lámina propia. Allí estimula la llegada de neutrófilos a la mucosa intestinal y una respuesta inflamatoria en la que se producen mediadores de la inflamación como citoquinas, quimiocinas y prostaglandinas (Foster y Berndt, 2013; Smith, 2015a). Como resultado de todo esto, se produce una diarrea por malabsorción y maladigestión, agravada por componentes secretores y osmóticos (Mohler *et al.*, 2009), mientras que en el intestino de los terneros afectados las vellosidades aparecen edematosas y acortadas, y los enterocitos deformados (La Ragione *et al.*, 2013).

1.4.1.3. Abomasitis por *Clostridium* spp.

Clostridium spp. no se considera habitualmente un agente causal de diarrea neonatal. Sin embargo, *Clostridium perfringens* tipo A puede actuar como agente etiológico de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

enteritis necrótico-hemorrágica y abomasitis en terneros (Roeder *et al.*, 1987; Goossens *et al.*, 2017). Los signos clínicos son de rápida aparición e incluyen, además de diarrea, distensión abdominal aguda, cólico, depresión y, en muchos casos, muerte súbita (Izzo *et al.*, 2015).

1.4.2. Agentes causales: enteropatógenos víricos

Los virus están entre los agentes etiológicos más frecuentemente implicados en la NCD. Estos patógenos se multiplican en los enterocitos y los destruyen, dando lugar a una atrofia de las vellosidades con la consecuente diarrea por malabsorción (Izzo *et al.*, 2015).

1.4.2.1. Rotavirus

Los rotavirus son miembros del género *Rotavirus* de la familia Reoviridae, por lo que no están envueltos y poseen una cápside proteica icosaédrica que contiene todos los enzimas necesarios para la producción de ARN mensajero (ARNm) (Estes y Greenberg, 2013). Su genoma está formado por once segmentos de ARN bicatenario de entre 667 y 3303 pares de bases, cada uno de los cuales codifica al menos para una proteína; el genoma completo consta de 18522 pares de bases (Estes y Cohen, 1989; Estes y Greenberg, 2013). Son virus muy resistentes en el ambiente, soportando pH muy ácidos y permaneciendo relativamente estables a temperaturas elevadas. Además, se ha demostrado que se mantienen infectantes hasta nueve meses en materia fecal a temperatura ambiente o una hora a 6ºC, así como varios días en agua destilada y en aguas residuales (McNulty, 1978; McDaniels *et al.*, 1983).

Los rotavirus se clasifican en serogrupos en función de la respuesta serológica de la proteína de la cápside interna VP6, que es altamente antigénica y representa la parte de mayor tamaño de la partícula vírica (Estes y Cohen, 1989; Estes y Greenberg, 2013). Hasta el momento se han descrito 7 serogrupos (A, B, C, D, E, F y G): los tres primeros se han detectado tanto en humanos como en animales, mientras que el resto solo se han descrito en animales. Cada serogrupo de rotavirus se considera como una especie única, pues no se puede producir recombinación genética entre virus de distintos grupos, pero sí entre los del mismo grupo. De todos los serogrupos mencionados, el rotavirus A es genéticamente y

antigénicamente la especie más diversa del género (Matthijnssens y Desselberger, 2012). A su vez, dentro de cada serogrupo se distinguen varios serotipos. Así, las cepas de rotavirus A se clasifican en serotipos VP4 o P (por sensibilidad a la proteasa) y VP7 o G (según la presencia de una glicoproteína). Se han descrito al menos 37 serotipos P y 27 serotipos G (Matthijnssens *et al.*, 2011; Trojnar *et al.*, 2013).

En el ganado vacuno se han identificado cepas de rotavirus A que pertenecen al menos a 12 tipos G y 11 tipos P. Es frecuente encontrar cepas bovinas de rotavirus A de tipos G6, G8 y G10 en asociación con P1, P5 y P11, siendo el serotipo G6P5 el más común (Snodgrass *et al.*, 1990; Swiatek *et al.*, 2010; Matthijnssens *et al.*, 2011; Otto *et al.*, 2015). No obstante, en los bovinos también se ha detectado infección por rotavirus de serogrupos B y C, pero su frecuencia es muy inferior a la de rotavirus A (Khurana y Pandey, 2001; Otto *et al.*, 2015).

Patogenia y lesiones

El rotavirus A bovino (BRoV) infecta principalmente a los enterocitos maduros de la parte apical de las vellosidades del intestino delgado (Ramig, 2004; Desselberger, 2014). Tras la replicación vírica en su interior, tiene lugar la muerte de los enterocitos y se origina una lesión moderada en las vellosidades intestinales. Como consecuencia, se produce una diarrea por malabsorción y maladigestión, agravada por una diarrea osmótica asociada (Graham *et al.*, 1984; Ramig, 2004; Foster y Smith, 2009). Por otra parte, durante su replicación intracelular, el rotavirus produce la glicoproteína estructural NSP4, que se libera tras la muerte de la célula y actúa de forma paracrina. NSP4 provoca el aumento de la secreción de agua e impide su absorción a través de la inhibición del cotransportador de sodio-glucosa (Halaihel *et al.*, 2000; Ramig, 2004; Foster y Smith, 2009), siendo por tanto responsable de un mecanismo secretor que intensifica la diarrea.

1.4.2.2. Coronavirus

Los coronavirus (CoV) pertenecen a la subfamilia *Coronavirinae* de la familia Coronaviridae. Pueden corresponder a cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (Cui *et al.*, 2019).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El coronavirus bovino (BCoV) corresponde a la especie *Betacoronavirus* 1. Sus partículas víricas son pleomórficas, habitualmente de forma ovalada o redondeada, y su diámetro varía entre 80 y 160 nm (Clark, 1993; Masters y Perlman, 2013). Su genoma es el más grande de todos los virus ARN pues tiene un tamaño entre 26 y 32 kb, y consiste en una única cadena no segmentada, poliadenilada y orientada en sentido positivo (Clark, 1993). Las partículas víricas tienen cuatro proteínas estructurales de importancia: la proteína de la nucleocápside, asociada al ARN del virus, la glicoproteína de la envoltura, la glicoproteína de las espículas y la hemaglutinin-esterasa (Clark, 1993). La nucleocápside está rodeada por una envoltura lipídica de la que sobresalen dos tipos de proyecciones: unas conformadas por la glicoproteína de las espículas, distribuidas regularmente alrededor del virión; y otras más cortas formadas por la hemaglutinin-esterasa (King y Brian, 1982; Mebus, 1990; Clark, 1993). La glicoproteína de las espículas es la que posee los dominios responsables de la unión a los receptores y la inducción de anticuerpos neutralizantes. Es, además, la proteína viral más polimórfica entre las especies de coronavirus e, incluso, entre las cepas de una misma especie. Esta glicoproteína tiene dos subunidades: la S1 y la S2. La S1 es muy variable y por lo tanto es útil para el estudio de la variabilidad y de la evolución de este virus (Hasoksuz *et al.*, 2002; Bok *et al.*, 2015).

Finalmente, en cuanto a su resistencia ambiental, el BCoV, al tener envoltura, se inactiva frente al éter, el cloroformo y el deoxicolato de sodio. Es inestable a temperaturas superiores a 45ºC, pero es estable a un pH de 3 (Sharpee *et al.*, 1976).

Patogenia y lesiones

El BCoV provoca una enterocolitis grave caracterizada por la destrucción de las vellosidades intestinales en el intestino delgado, mientras que en el intestino grueso se ven afectadas tanto las vellosidades como las criptas (Peek *et al.*, 2018). Como consecuencia, se observa una diarrea por malabsorción y maladigestión agravada por un componente secretor debido a la inflamación provocada por la pérdida de células intestinales (Torres-Medina *et al.*, 1985; Foster y Smith, 2009; Peek *et al.*, 2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.2.3. Torovirus

El torovirus bovino (BToV), también conocido como virus de Breda, es un virus que se clasifica taxonómicamente en la subfamilia *Torovirinae* dentro de la familia Coronaviridae (González *et al.*, 2003). El BToV, que mide 120-140 nm de largo x 12-40 nm de ancho, es un virión pleomórfico pues puede adoptar una morfología esférica, oval, alargada o con forma de riñón (Hoet y Saif, 2004). Su genoma consiste en una sola cadena de ARN lineal, poliadenilado, no segmentado y orientado en sentido positivo, de 25-30 kb de longitud. El virión de BToV posee cuatro proteínas estructurales: la glicoproteína de las espículas, la de la envoltura, la de la nucleocápside y la hemaglutinin-esterasa (Snijder y Horzinek, 1993). La nucleocápside tiene una forma tubular alargada, con simetría helicoidal, fuertemente enrollada, formando una especie de tubo hueco con estrías transversales que puede estar dispuesto de forma recta o doblado en forma de C. El polipéptido N que la conforma corresponde al 84% de la masa del virión, está fosforilado y es el principal elemento antigénico del BToV (Horzinek y Weiss, 1984; Horzinek *et al.*, 1987; Koopmans y Horzinek, 1994; Duckmanton *et al.*, 1998b).

Se reconocen al menos dos serotipos de este virus, BToV-1 y BToV-2, definidos mediante ensayos de inhibición de hemaglutinación, pues ambos serotipos poseen antígenos de hemaglutinación diferentes (Woode *et al.*, 1985).

Finalmente, en lo que se refiere a su resistencia ambiental, deja de ser infectivo a las 24-48 horas a 4ºC, y se inactiva inmediatamente a temperaturas entre 31 y 43ºC. Para mantenerlo estable, es necesario congelarlo a menos de -20ºC (Horzinek *et al.*, 1987; Woode, 1990; Hoet y Saif, 2004). Al ser un virus envuelto, se inactiva frente al cloroformo o el éter, pero es muy resistente a la fosfolipasa C, tripsina y quimiotripsina. Tiene un amplio rango de estabilidad frente al pH, y solo se inactiva a pH inferior a 2,5 o superior a 10,3 (Weiss y Horzinek, 1986).

Patogenia y lesiones

El torovirus infecta aquellas células epiteliales localizadas en la mitad inferior de las vellosidades así como a las células de las criptas, especialmente desde la mitad posterior del

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

yeyuno hasta el colon, donde provoca una respuesta inflamatoria aguda con edema e infiltración celular (Pohlenz *et al.*, 1984; Fagerland *et al.*, 1986). El virus se introduce en las células por endocitosis mediada por receptores y se replica en su interior. Sus nuevas copias se ensamblan mediante gemación, cuando las cápsides del citoplasma de la célula se asocian con las proteínas de membrana del aparato de Golgi, y salen de la célula por citolisis o por exocitosis (Fagerland *et al.*, 1986). Este proceso provoca cambios citopáticos en las células, como degeneración vacuolar severa, necrosis y exfoliación, así como la fusión de las vellosidades (Pohlenz *et al.*, 1984; Woode *et al.*, 1984). Como resultado, en los animales afectados se observa la necrosis de los enterocitos de las vellosidades y de las criptas en el íleon, y de los enterocitos de la superficie y de las criptas en el ciego y en el colon (Hall, 1987).

No se ha descrito por completo el mecanismo mediante el cual el virus induce la diarrea, pero podría ser producto de las lesiones que provocarían una atrofia de las vellosidades con la consecuente reducción en la capacidad de absorción de agua, dando lugar como resultado una diarrea por malabsorción y maladigestión (Woode, 1982; Hoet y Saif, 2004).

1.4.2.4. Calicivirus

La familia Caliciviridae incluye cinco géneros: *Norovirus, Sapovirus, Nebovirus, Lagovirus* y *Vesivirus* (Green, 2013). De ellos, *Norovirus* y *Nebovirus* podrían actuar como agentes etiológicos de NCD, por lo que serán descritos a continuación.

1.4.2.4.1. Norovirus

Los norovirus, como todos los calicivirus, son virus pequeños no envueltos que miden entre 27 y 35 nm de diámetro. La cápside contiene 90 dímeros de la proteína VP1 que forman una cubierta de la que protruyen 90 capsómeros en forma de arco (Green, 2013). Su genoma es un ARN monocatenario orientado en sentido positivo de 7,5 kb de tamaño. La proteína VP1 forma dos dominios: S y P, que a su vez se clasifica en los subdominios P1 y P2. El dominio S forma la parte interna de la cápside, envolviendo al ARN y manteniendo la estructura icosaédrica. El dominio P, que se une al S por una bisagra flexible, forma las

USC DE COMPOSTELA

protrusiones en forma de arco de la cápside. El subdominio P1 constituye los laterales de estos arcos y posiciona al P2 en el alto de los mismos, de manera que este último se extiende por encima de la superficie viral. El subdominio P2 tiene la mayor divergencia de secuencias del genoma, por lo que determina el fenotipo antigénico del virus, y ejerce un papel importante en la unión a los receptores celulares (Prasad *et al.*, 1999; Chakravarty *et al.*, 2005; Green, 2013). La proteína VP2 tiene funciones de regulación de la expresión de VP1 y de estabilización de VP1 en la estructura del virus (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003).

Los norovirus se califican en 5 genogrupos (G) en función del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de VP1 (Zheng *et al.*, 2006; Otto *et al.*, 2011). Los norovirus bovinos (BNoV) pertenecen al genogrupo III (GIII) (Ando *et al.*, 2000; van der Poel *et al.*, 2003), siendo las cepas Jena y Newbury Agent 2 los prototipos de los genotipos GIII.1 y GIII.2, respectivamente (Dastjerdi *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999).

Hasta no hace mucho, no se había conseguido cultivar norovirus en líneas celulares, lo que limitaba el estudio de sus características de supervivencia. Sin embargo, en la actualidad, se conseguido aplicar esta técnica a algunos norovirus humanos y animales (Wobus *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2015), lo que ha permitido confirmar que se trata de virus con una elevada capacidad de supervivencia ambiental, siendo resistentes a la mayoría de los desinfectantes comunes (D'Souza y Su, 2010). No obstante, es preciso tener en cuenta que el grado de resistencia a los distintos compuestos está relacionado con la cepa (Rachmadi *et al.*, 2018). En este sentido, frente al norovirus murino han demostrado eficacia los compuestos halogenados, los agentes oxidantes, como el hipoclorito sódico, y una combinación de compuestos de amonio cuaternario, alcohol y aldehídos (Zonta *et al.*, 2016). Sin embargo, el hipoclorito sódico es menos efectivo frente a los norovirus humanos (Tung *et al.*, 2013). Por lo tanto, si bien los estudios de eficacia frente a norovirus de otras especies pueden orientar sobre la resistencia de BNoV a los desinfectantes, es precisa la realización de estudios específicos que permitan confirmar cuales son los compuestos químicos realmente eficaces frente a las cepas de norovirus bovino.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.2.4.2. Nebovirus

La estructura morfológica del virión de nebovirus es igual a la ya comentada para los norovirus, con las proteínas estructurales VP1 y VP2; su genoma también es un ARN monocatenario de 7,5 kb de tamaño, si bien presenta ligeras modificaciones con respecto al de los norovirus (Oliver *et al.*, 2006; Green, 2013).

1.4.2.4.3. Patogenia y lesiones

Los calicivirus bovinos infectan a las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado. El norovirus bovino ejerce su acción patógena fundamentalmente en el yeyuno e íleon, sin afectar al ciego y colon (Bridger *et al.*, 1984; Smiley *et al.*, 2002; Otto *et al.*, 2011), mientras que el nebovirus afecta en mayor medida a los tramos proximales del intestino delgado (Castells y Colina, 2021). El virus se introduce en las células mediante un proceso de endocitosis dependiente de pH y, tras su replicación, se produce la apoptosis de la célula y la liberación de sus nuevas copias (Mauroy *et al.*, 2011; Gutiérrez-Escolano, 2014). El resultado de este proceso es una pérdida abrupta de enterocitos, que se ve reflejada en la atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas y edema en la submucosa de los tramos intestinales afectados, y que tiene como consecuencia una diarrea por maladigestión y malabsorción (Smiley *et al.*, 2002; Otto *et al.*, 2011).

1.4.2.5. Virus de la diarrea vírica bovina

El virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) raramente causa NCD en terneros, aunque este signo clínico se puede observar esporádicamente en los persistentemente infectados. Estos individuos se han infectado durante la gestación con un biotipo no citopático del BVDV y son inmunotolerantes al mismo. Sin embargo, si se infectan posteriormente con un biotipo citopático o se produce una mutación de su biotipo no citopático que lo convierta en citopático, pueden desarrollar la enfermedad de las mucosas, que a su vez puede provocar la erosión y ulceración del epitelio intestinal (Holland *et al.*, 1993; Bielefeldt-Ohmann, 1995). No obstante, la infección por el BVDV se caracteriza por provocar inmunodepresión, lo que puede contribuir a la infección concomitante por los agentes infecciosos y parasitarios expuestos previamente que terminan por provocar NCD.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.2.6. Otros virus

Existen diversos estudios que relacionan otros virus intestinales como astrovirus, adenovirus, parvovirus y picobirnavirus con casos de NCD, aunque su patogenicidad y grado de contribución al proceso todavía se desconoce (Storz *et al.*, 1978; Orr, 1984; Durham *et al.*, 1985; Vanopdenbosch y Wellemans, 1989; Mohamed *et al.*, 2017).

1.4.3. Agentes causales: enteropatógenos parasitarios

La NCD a menudo tiene un origen parasitario, pues varias especies de parásitos se encuentran involucradas en ella en diferentes momentos de la vida del ternero. Entre ellas, destaca *Cryptosporidium parvum*, que es uno de los enteropatógenos más prevalentes en la NCD, junto con *Giardia duodenalis* y los coccidios del género *Eimeria* (Royer, 2015).

1.4.3.1. *Cryptosporidium* spp.

El género *Cryptosporidium* incluye parásitos protozoarios que infectan principalmente a las células epiteliales del tracto gastrointestinal de todo tipo de vertebrados (Fayer, 2008). Actualmente se reconocen 44 especies válidas y más de 120 genotipos dentro de este género, siendo probable que muchos genotipos alcancen el estatus de especie (Ryan *et al.*, 2021). En el ganado vacuno se han identificado unas 17 especies de *Cryptosporidium* spp. (Tabla 1), siendo las principales *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium parvum y Cryptosporidium ryanae* (Upton y Current, 1985; Lindsay *et al.*, 2000; Fayer *et al.*, 2005, 2008). No obstante, sólo *C. parvum* se considera un agente causal de NCD en terneros menores de 30 días de edad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Especies de *Cryptosporidium* spp. identificadas en el ganado vacuno.

Especie	Referencia
C. parvum	Upton y Current (1985)
C. andersoni	Lindsay *et al.* (2000)
C. bovis	Fayer *et al.* (2005)
C. ryanae	Fayer *et al.* (2008)
C. hominis	Smith *et al.* (2005)
C. muris	Bornay-Llinares *et al.* (1999)
C. wrairi	Azami *et al.* (2007)
C. serpentis	Azami *et al.* (2007)
C. baileyi	Azami *et al.* (2007)
C. felis	Bornay-Llinares *et al.* (1999)
C. suis	Geurden *et al.* (2007)
C. scrofarum	Wang *et al.* (2017)
C. ubiquitum	Fayer *et al.* (2010)
C. meleagridis	Mendonça *et al.* (2007)
C. tyzzeri	Wang *et al.* (2017)
C. occultus (anteriormente conocida como genotipo *C. suis*-like)	Langkjær *et al.* (2007)
C. xiaoi	Mirhashemi *et al.* (2016)

Este género se clasifica taxonómicamente dentro del Filo Apicomplexa, cuyos miembros se caracterizan por ser parásitos intracelulares, con fases capaces de moverse por deslizamiento, con un complejo apical durante al menos algunas de sus fases vitales, y posiblemente capaces de realizar conjugación sexual (Bowman, 2014). Durante mucho tiempo, este género se consideró un coccidio perteneciente a la Subclase Coccidia (Ryan *et al.*, 2021a). Sin embargo, estudios recientes señalaron que los criptosporidios están más relacionados con las gregarinas, lo que explicaría la relación superficial existente entre estes organismos y las células que parasitan, y por qué casi todos los anticoccidiósicos han resultado inadecuados en el control de la infección con este parásito (Carreno *et al.*, 1999; Bowman, 2014). Así, el género *Cryptosporidium* se incluye actualmente en Filo Apicomplexa, Clase Conoidasida, Subclase Gregarinasina y Orden Cryptogregarinorida (Adl *et al.*, 2019).

USC DE COMPOSTELA

Ciclo biológico

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. es directo e incluye una fase asexual con dos generaciones de merontes y una fase sexual que termina con la formación de ooquistes esporulados (De Graaf *et al.*, 1999). Todas las especies de *Cryptosporidium* presentan un desarrollo similar, pero en este trabajo nos centraremos en el de *C. parvum* por tratarse de la especie más importante asociada a la NCD y de la que se dispone de numerosa información.

El ciclo biológico de este parásito (Figura 2) comienza cuando un hospedador adecuado ingiere ooquistes esporulados del protozoo. En el tracto gastrointestinal, y en un período máximo de 48 horas, se produce la exquistación, es decir, la apertura de la pared del ooquiste por la sutura, a través de la cual salen cuatro esporozoítos (Fayer, 2008; Borowski *et al.*, 2010). Los esporozoítos, que son móviles, buscan sus células hospedadoras, generalmente enterocitos maduros que se localizan en el extremo apical de las vellosidades intestinales del yeyuno e íleon (Wetzel *et al.*, 2005; Valigurová *et al.*, 2008). A continuación, se unen a ellas en un proceso mediado por adhesinas que resulta en la internalización del parásito, lo que tiene como consecuencia cambios en la expresión génica de la célula hospedadora (Wanyiri y Ward, 2006; Castellanos-Gonzalez *et al.*, 2008). Así, la membrana apical de la célula envuelve al protozoo, dando lugar a la vacuola parasitófora, de localización intracelular pero extracitoplasmática (Valigurová *et al.*, 2008; Kolářová y Valigurová, 2021). En el punto de contacto entre el parásito y la célula, se forma una organela de alimentación que permite que el parásito adquiera nutrientes de la célula hospedadora, ya que carece de varias rutas metabólicas de síntesis, como las de las purinas, pirimidinas, aminoácidos y algunos ácidos grasos (Borowski *et al.*, 2008; Fayer, 2008). Una vez dentro de la célula hospedadora, los esporozoítos se transforman en trofozoítos y comienza la fase asexual del ciclo. Así, en un proceso de merogonia, los trofozoítos dan lugar a merontes tipo I, que liberan merozoítos tipo I. Estos merozoítos, tras invadir otros enterocitos, pueden generar dos tipos de merontes: otros merontes tipo I, que a su vez originan más merozoítos tipo I en lo que se conoce como ciclo autoinfectivo, o merontes tipo II (Petry, 2004; Fayer, 2008; Borowski *et al.*, 2008, 2010). Cada meronte tipo II da lugar a cuatro merozoítos tipo II, que inician la fase sexual del ciclo tras invadir otros enterocitos y generar micro- y macrogamontes. Cada microgamonte libera microgametos que, tras fecundar a los macrogamontes, forman un zigoto. Finalmente, los zigotos pueden dar lugar

a dos tipos de ooquistes: los ooquistes de pared gruesa, que se eliminan al ambiente con las heces del hospedador; y los de pared fina (Borowski *et al.*, 2008). Ambos están ya esporulados y contienen cuatro esporozoítos en su interior, por lo que ya son infectantes para el hospedador. Los ooquistes de pared fina miden unos 5 μm de diámetro, y su pared de una única capa se rompe con facilidad en la luz intestinal, siendo responsable de un proceso de autoinfección; por tanto, en ausencia de una respuesta inmunitaria protectora, este protozoo puede mantenerse en el hospedador sin que éste ingiera nuevos ooquistes de pared gruesa (Borowski *et al.*, 2008; Jenkins *et al.*, 2010).

El diámetro de los ooquistes de pared gruesa varía en función de la especie de *Cryptosporidium*. Así, en el caso de aquellas que se multiplican en el intestino delgado, como *C. parvum*, oscila entre 4 y 6 μm, mientras que los ooquistes de las que lo hacen en el abomaso, como *C. andersoni*, tienen un tamaño ligeramente mayor (7-8 μm) (Fayer, 2008). El grosor de su pared les confiere una elevada resistencia a las condiciones ambientales adversas; así, se mantienen infectivos durante períodos prolongados a temperaturas entre 4 y 20 ºC, pero temperaturas superiores a 55 ºC los inactivan en segundos (Fayer *et al.*, 1998; Fujino *et al.*, 2002; Pokorny *et al.*, 2002). Además, resisten la acción de numerosos productos químicos empleados para la desinfección de superficies así como para el tratamiento de aguas para el consumo humano, como el cloro y el ozono (Petry, 2004; Borowski *et al.*, 2010). Se ha comprobado que, en terneros, el período de prepatencia oscila entre dos y siete días, mientras que el de patencia varía entre una y tres semanas (Fayer *et al.*, 1998; Egyed *et al.*, 2003).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

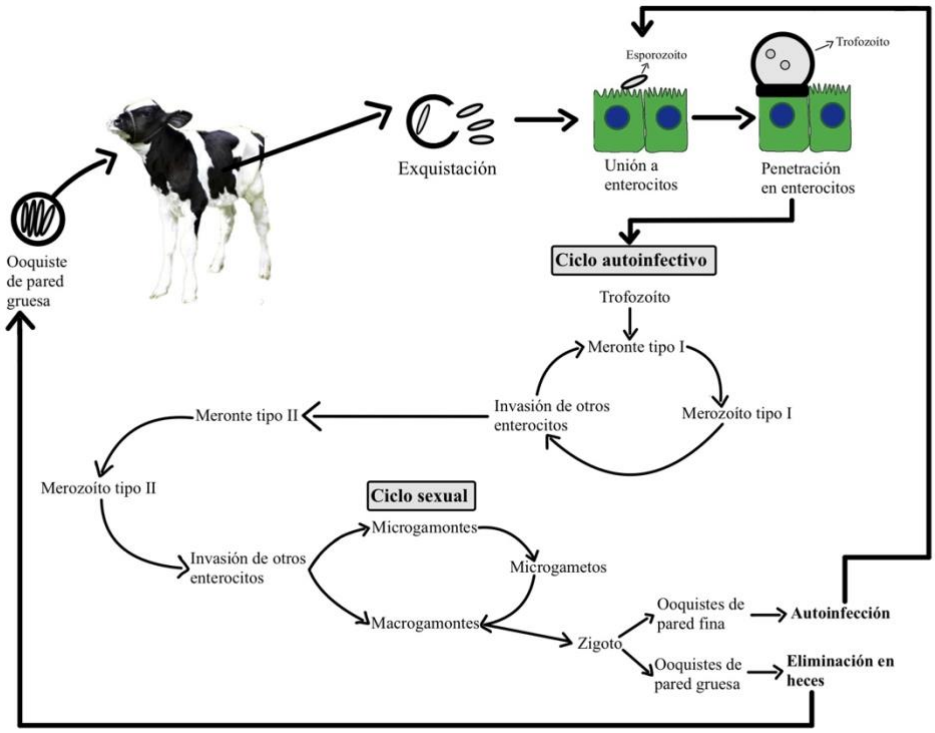


Figura 2. Ciclo biológico de *C. parvum.*

Patogenia

La invasión del parásito tiene importantes efectos negativos sobre el epitelio intestinal del hospedador, ya que se traduce en un incremento de la apoptosis de los enterocitos (McCole *et al.*, 2000; Buret *et al.*, 2003). Sin embargo, dicho proceso de muerte celular está modulado por la fase del ciclo en la que se encuentre el parásito. Así, la apoptosis se inhibe durante la fase de trofozoíto, cuando el organismo es más dependiente del hospedador, pero se incrementa posteriormente (Liu *et al.*, 2009; Mele *et al.*, 2004). Debido a la pérdida de enterocitos, fundamentalmente en el íleon, se produce un acortamiento de la longitud de las vellosidades intestinales y una hiperplasia de las criptas intestinales, que se traduce en una diarrea por malabsorción y maladigestión; esta situación se agrava por una diarrea secretora debida al incremento de la permeabilidad del epitelio intestinal lesionado y a la respuesta inflamatoria en la lámina propia de la zona de la infección (Robinson *et al.*, 2001; O'Handley y Olson, 2006).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.3.2. *Giardia duodenalis*

Giardia es un género de parásitos flagelados que infecta al tracto gastrointestinal de un amplio rango de hospedadores vertebrados. Taxonómicamente se incluye dentro del Filo Metamonada, Clase Fornicata, Orden Diplomonadida y Familia Hexamitidae (Adam, 2000; Bowman, 2014; Ryan *et al.*, 2021a; Rojas-López *et al.*, 2022). Aunque son organismos eucariotas, carecen de ciertos orgánulos y rasgos típicos de estas células, como mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi (Adam, 2000; Plutzer *et al.*, 2010). Actualmente se describen nueve especies dentro de este género en base a la morfología de los quistes y trofozoítos, su especificidad de hospedador y sus características genéticas: *Giardia agilis*, *Giardia ardeae*, *Giardia cricetidarum*, *Giardia duodenalis* (también conocida como *Giardia intestinalis* o *Giardia lamblia*), *Giardia muris*, *Giardia microti*, *Giardia peramelis*, *Giardia psittaci* y *Giardia varani* (Ryan *et al.*, 2021).

G. duodenalis es la única especie que afecta a un amplio rango de mamíferos, entre los que se incluyen el ser humano y la mayoría de animales domésticos de interés veterinario (Ryan y Zahedi, 2019). Se considera un complejo de especies que comprende ocho genotipos (A-H) con diferente especificidad de hospedador (Tabla 2), si bien algunos de ellos, fundamentalmente el A y el B, tienen potencial zoonósico (Cacciò *et al.*, 2018). De todos ellos, en ganado vacuno predomina el E, que se considera específico de ungulados; no obstante, los genotipos A y B también se han identificado con frecuencia en bovinos, por lo que se ha sugerido que estos animales pueden constituir una potencial fuente de infección para las personas (Cai *et al.*, 2021). Asimismo, los genotipos C, D y F, que principalmente afectan a cánidos y felinos, se han identificado de forma esporádica en bovinos (Ryan y Zahedi, 2019; Cai *et al.*, 2021). Cabe señalar que esta clasificación de *G. duodenalis* en genotipos no está exenta de controversia, ya que diversos estudios indican que la distancia genética entre ellos es lo suficientemente grande como para que cada uno constituya una especie distinta (Franzén *et al.*, 2009; Jerlström-Hultqvist *et al.*, 2010; Adam *et al.*, 2013).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2. Genotipos de *Giardia duodenalis* y sus hospedadores más habituales. Adaptado de Ryan y Cacciò (2013).

Genotipo	Hospedador
A	Humanos y otros primates, ganado, perros, gatos, y algunas especies de mamíferos salvajes
B	Humanos y otros primates, perros, gatos y algunas especies de mamíferos salvajes
C	Perros y otros cánidos
D	Perros y otros cánidos
E	Ungulados
F	Gatos
G	Ratas
H	Mamíferos marinos (pinnípedos)

Ciclo biológico

El ciclo biológico de *G. duodenalis* es directo (Figura 3) y comprende dos fases del parásito: trofozoítos que se localizan en la superficie del intestino delgado y quistes que se expulsan con las heces y que presentan una gran resistencia en el ambiente (Monis *et al.*, 2009). El ciclo comienza cuando un hospedador adecuado ingiere los quistes que se encuentran en el medio; en el intestino delgado proximal se produce la exquistación, donde los quistes dan lugar a trofozoítos (Svärd *et al.*, 2003).

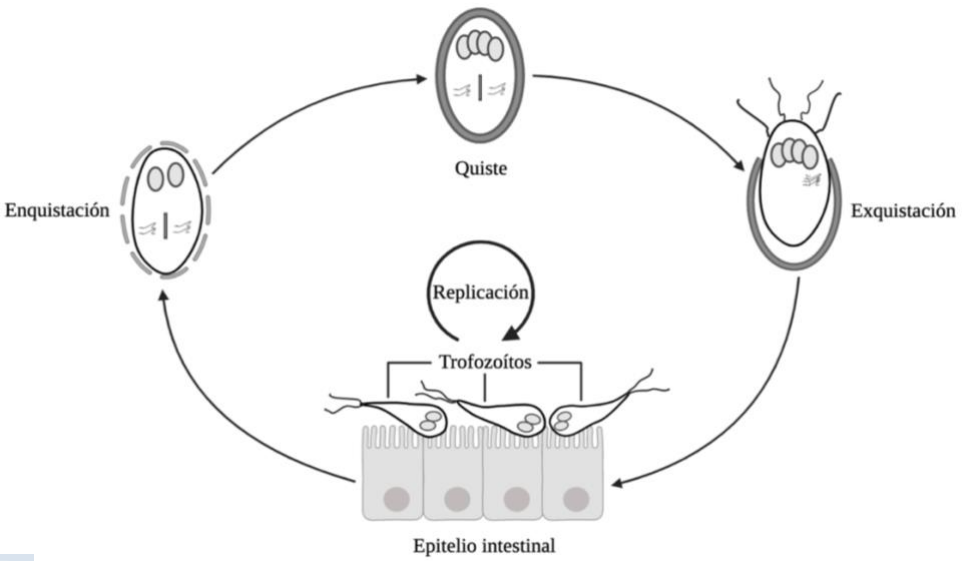


Figura 3. Ciclo biológico de *G. duodenalis*.

Los trofozoítos (12-15 μm x 5-9 μm) tienen forma de pera y presentan cuatro pares de flagelos y un disco adhesivo ventral (Adam, 2001; Elmendorf *et al.*, 2003). Estas estructuras le confieren una elevada movilidad así como la posibilidad de anclarse a los enterocitos para evitar su eliminación por los movimientos peristálticos (Elmendorf *et al.*, 2003; Ankarklev *et al.*, 2010). La transformación de los trofozoítos en quistes infectivos se produce por un largo proceso de diferenciación que se conoce como enquistación, que se inicia cuando los trofozoítos alcanzan la porción distal del intestino delgado, inducido por elevados niveles de bilis, bajos niveles de colesterol y un pH básico (Svärd *et al.*, 2003; Ankarklev *et al.*, 2010). Durante la enquistación se producen cambios en el metabolismo, ultraestructura, transporte proteico y expresión génica del protozoo; así, los flagelos comienzan a internalizarse y el disco adhesivo se fragmenta, impidiendo que se fije al epitelio intestinal, y finalmente entra un período de inactividad metabólica donde se inhiben muchos genes específicos del trofozoíto (Svärd *et al.*, 2003; Ankarklev *et al.*, 2010). En ese momento se forma el quiste (11-14 μm x 7-10 μm), la fase infectante del protozoo, que se elimina con las heces al medio (Paget *et al.*, 1989; Rajurkar *et al.*, 2012). La resistencia ambiental de estos quistes, aunque menor que la de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., es bastante elevada, pudiendo permanecer viables durante al menos un mes a bajas temperaturas y en ausencia de ciclos de congelación y descongelación (Olson *et al.*, 1999; Robertson y Lim, 2011). Se ha comprobado que el período de prepatencia oscila entre dos y diez días (Xiao *et al.*, 1994; Geurden *et al.*, 2006a; Geurden y Olson, 2011).

Patogenia y lesiones

Los trofozoítos de *G. duodenalis* colonizan el intestino delgado, desplazándose a través del fluido intraluminal y resistiendo los movimientos peristálticos y los mecanismos defensivos del hospedador adhiriéndose al epitelio intestinal con su disco adhesivo (Adam, 2001). Sin embargo, a partir de este punto la patogenia de *G. duodenalis* todavía no se conoce completamente. Dado que se localiza en la superficie del intestino delgado, varias investigaciones sugieren que sus efectos sobre el epitelio intestinal son la consecuencia de la acción combinada de ciertos productos del parásito (probablemente toxinas y proteasas), la respuesta inmunitaria celular del hospedador y la interacción con la microbiota intestinal (Adam, 2021). Así, se puede observar la inhibición de la acción enzimática de los enterocitos y su apoptosis, que conduce a la atrofia de las vellosidades intestinales y acortamiento de las

UdC UNIVERSIDADE DA CORUÑA

microvellosidades y se incrementa la permeabilidad intestinal (Buret, 2007). Además, se ha señalado que la infección con este protozoo puede causar una alteración en el patrón de citoquinas que induce un incremento en la secreción de iones de cloro (Troeger *et al.*, 2007). El resultado de todo ello es una diarrea por malabsorción y maladigestión agravada por una diarrea secretora.

1.4.3.3. *Eimeria* spp.

Eimeria es un género de protozoos que se clasifica taxonómicamente dentro del Filo Apicomplexa, Clase Conoidasida y Familia Eimeriidae (Taylor *et al.*, 2016). Aunque se han descrito más de una veintena de especies que pueden afectar al ganado vacuno, solo unas 13 se consideran actualmente válidas (Tabla 3) (Bangoura y Bardsley, 2020). Estas especies presentan notables variaciones en su patogenicidad, siendo *Eimeria zuernii* y *Eimeria bovis* las especies patógenas de mayor importancia y prevalencia a nivel mundial, así como *Eimeria alabamensis*, menos patógena que las anteriores pero de especial importancia en sistemas de producción extensivos (Daugschies y Najdrowski, 2005).

Tabla 3. Especies de *Eimeria* que afectan al ganado vacuno. Datos extraídos de Bangoura y Bardsley (2020).

Especie	Patogenicidad	Localización en el tracto GI	Período de prepatencia (días)
E. bovis	Alta	Intestino delgado y grueso	15-23 días
E. zuernii	Alta	Intestino delgado y grueso	15-22 días
E. alabamensis	Moderada	Parte distal del íleon, ciego y colon proximal	6-11 días
E. auburnensis	Baja	Yeyuno e íleon	18-20 días
E. ellipsoidalis	Baja	Intestino delgado, sobre todo parte distal del íleon	8-13 días
E. brasiliensis	Muy baja	No descrito	No descrito
E. bukidnonensis	Muy baja	Intestino delgado	10-25 días

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3. Continuación.

Especie	Patogenicidad	Localización en el tracto GI	Período de prepatencia (días)
E. canadensis	Muy baja	No descrito	No descrito
E. cylindrica	Muy baja	No descrito	11-20 días
E. illinoisensis	Muy baja	No descrito	No descrito
E. pellita	Muy baja	No descrito	No descrito
E. subspherica	Muy baja	Yeyuno	7-18 días
E. wyomingensis	Muy baja	Intestino delgado	13-15 días

Ciclo biológico

Todas las especies de *Eimeria* tienen un ciclo biológico monoxeno, presentando una gran especificidad de hospedador (Daugschies y Najdrowski, 2005). Aunque en el ganado vacuno todas se desarrollan en las células intestinales, cada especie presenta predilección por determinadas zonas del intestino; en el caso de *Eimeria zuernii* y *Eimeria bovis*, sus diferentes estadios de desarrollo se localizan tanto en el intestino delgado como el grueso (Daugschies y Najdrowski, 2005; Taylor *et al.*, 2016). La mayoría de los estudios sobre las coccidiosis del ganado bovino se han centrado en *Eimeria bovis*, por lo que se tomará esta especie como referencia para la descripción del ciclo biológico (Figura 4). Este ciclo incluye una fase exógena y otra endógena, con varias fases de multiplicación asexual y sexual (Bowman, 2014).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

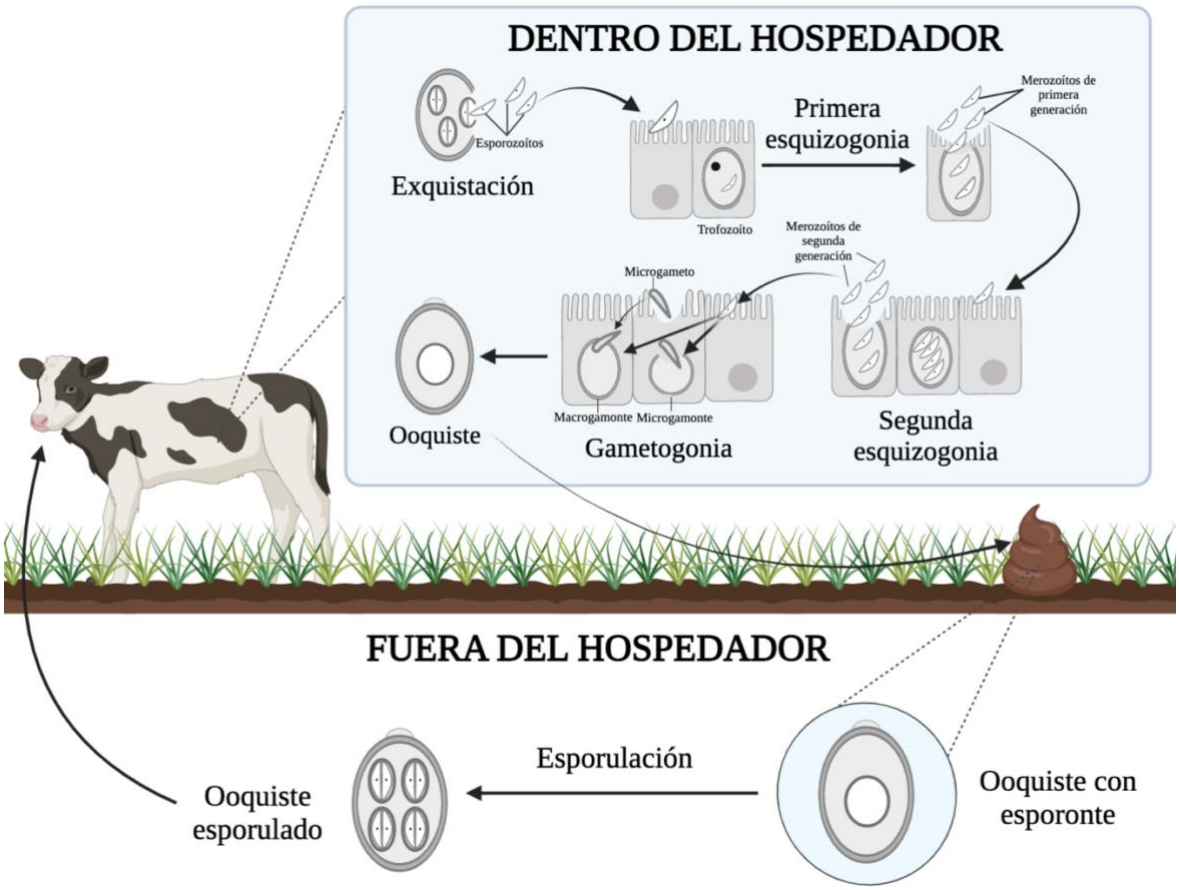


Figura 4. Ciclo biológico de *E. bovis*.

El hospedador se infecta cuando ingiere el ooquiste esporulado, dando comienzo la fase endógena, que en el caso de *E. bovis* puede durar hasta tres semanas. En el intestino, la acción de las sales biliares y de la tripsina favorece la exquistación de los ooquistes, de los que salen ocho esporozoítos (Doran y Farr, 1962; Bangoura y Daugschies, 2018). Los esporozoítos son móviles, penetrando activamente en las células endoteliales del intestino delgado y quedando incluidos dentro de una vacuola parasitófora que les permitirá evadir los mecanismos defensivos del hospedador (Bangoura y Daugschies, 2018). Dentro de la célula hospedadora, el parásito se multiplica de forma asexual (esquizogonia o merogonia), formándose entre cientos y miles de merozoítos de primera generación que, tras provocar la rotura de la célula, invaden nuevas células para convertirse en esquizontes de segunda generación (Bowman, 2014; Hamid *et al.*, 2015; Bangoura y Daugschies, 2018). La segunda esquizogonia y la gametogonia ocurren en las células epiteliales del intestino grueso. Durante la primera se producen merozoítos de segunda generación, que tras infectar nuevas células hospedadoras forman microgamontes o macrogamontes, iniciando la fase sexual del

ciclo (Bowman, 2014; Bangoura y Daugschies, 2018). Los macrogamontes contienen un único macrogameto, que representa una fase parasitaria estacionaria que permanece en su célula hospedadora (Bowman, 2014; Bangoura y Daugschies, 2018). Por el contrario, tras destruir su célula hospedadora, los microgamontes liberan numerosos microgametos que penetran en las células en las que se encuentran los macrogamontes, dando lugar a la formación de un zigoto y posteriormente a un ooquiste (Bangoura y Daugschies, 2018). El ooquiste es ovoide, incoloro y de un tamaño de 23-34 μm x 17-23 μm, y se elimina al ambiente con las heces (Taylor *et al.*, 2016). El período de prepatencia de *E. zuernii* es de 15-23 días, el de *E. bovis* 15-22 días y el de *Eimeria alabamensis* 6-11 días (Bangoura y Bardsley, 2020). Estos ooquistes recién eliminados no están esporulados, por lo que aún no son infectivos; deben madurar mediante la esporulación exógena o esporogonia. La duración de este proceso es de un día en condiciones óptimas, pero puede alcanzar 2-10 días en *E. bovis* y 2-3 días en *E. zuernii*. Tras este proceso se desarrollan cuatro esporocistos, cada uno de los cuales contiene dos esporozoítos, que son los implicados en la fase de invasión de las células del hospedador, y por lo tanto ya son infectivos para su hospedador (Bangoura y Daugschies, 2018).

Patogenia y lesiones

E. zuernii, *E. bovis* y *E. alabamensis* son protozoos intracelulares obligados que se multiplican en el interior de la célula hospedadora, obteniendo para ello nutrientes esenciales a base de modular varias rutas metabólicas celulares, intensificando la acción de las moléculas implicadas en el metabolismo energético, así como en el de los glúcidos, lípidos y ácidos nucleicos (Lutz *et al.*, 2011). Asimismo, en el caso de *E. bovis*, explota los recursos de colesterol celulares incrementando la acción de varias moléculas implicadas en su metabolismo (Hamid *et al.*, 2015).

La actividad de los diferentes estadios de desarrollo de *Eimeria* spp. destruye la célula hospedadora y, como consecuencia, se produce un extenso daño de la mucosa intestinal del hospedador, con pérdida del epitelio intestinal. En este sentido, la extensión de las lesiones va a depender de la especie implicada. Así, mientras que *E. zuernii* provoca una afectación generalizada del intestino delgado, ciego y colon, los cambios patológicos derivados de la infección por *E. bovis* se concentran en el íleon, ciego y colon, teniendo

USC DE COMPOSTELA

como resultado en ambos casos una tiflocolitis muy intensa (Friend y Stockdale, 1980; Mundt *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2016). Además, las especies más patógenas, como *E. bovis*, afectan a zonas más profundas de la mucosa intestinal, de forma que en algunos casos se observa destrucción de la submucosa e incluso la invasión de los vasos linfáticos y de los linfonodos mesentéricos (Lindsay *et al.*, 1990). Sin embargo, los efectos de las infecciones con *E. alabamensis* dependen de la dosis infectiva. Así, las infecciones con dosis elevadas dan lugar, generalmente, a una enteritis en la mitad posterior del intestino delgado, acompañada de una extensa destrucción epitelial y de las vellosidades e infiltración leucocitaria (Davis *et al.*, 1957; Hooshmand-Rad *et al.*, 1994).

Por otra parte, la infección por *Eimeria* spp. altera la respuesta inmunitaria de las células endoteliales hospedadoras a través de la regulación de un mecanismo relacionado con el movimiento leucocitario (Taubert *et al.*, 2010). La inducción de este mecanismo es la responsable de la aparición de macrófagos infiltrados en la mucosa intestinal, que interactúan activamente con diversas fases del ciclo del parásito (Friend y Stockdale, 1980; Behrendt *et al.*, 2008), agravando el daño y la disfunción de la mucosa intestinal.

Como consecuencia tanto de los daños sobre la mucosa intestinal como de la respuesta inflamatoria tiene lugar una diarrea por malabsorción y maladigestión y secretora. Su gravedad va a depender de la extensión de las lesiones, de forma que cuando afectan a las capas más profundas de la mucosa intestinal es común que se produzca una diarrea hemorrágica (Daugschies y Najdrowski, 2005).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.4. Epidemiología

La diarrea neonatal del ternero es un proceso cuya aparición es consecuencia de la interacción entre numerosos factores, que se pueden clasificar en tres tipos: los asociados al ternero, los dependientes del ambiente en que se encuentra y los asociados al patógeno (Johnson *et al.*, 2017).

1.4.4.1. Factores de riesgo asociados al ternero

a) <u>Edad</u>

Los terneros son más susceptibles a presentar diarrea neonatal en sus primeros 30 días de vida (Bendali *et al.*, 1999a), lo que se debe a una concurrencia de factores que provocan que el sistema inmunitario del neonato, que todavía es inmaduro, se vea comprometido (Hulbert y Moisá, 2016). Así, desde su nacimiento, el ternero está expuesto a numerosas situaciones estresantes ya que debe adaptarse al ambiente extrauterino, con una elevada carga de patógenos, y regular su propia temperatura corporal, a lo que se suma que su sistema digestivo debe experimentar una serie de modificaciones y adaptaciones para pasar de prerrumiante a rumiante (Meale *et al.*, 2017; Osorio, 2020). Como consecuencia de todo esto, la prevalencia de NCD es especialmente elevada durante las dos primeras semanas de vida, con un pico de incidencia en el octavo día (Bendali *et al.*, 1999a; Bartels *et al.*, 2010; Urie *et al.*, 2018). De todos modos, la importancia de cada uno de los patógenos implicados varía en función de la edad del animal (Tabla 4).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Rango de edad en el que es más habitual la infección con los agentes causales de NCD durante el primer mes de vida del ternero. Datos extraídos de Hoet y Saif (2004); Heller y Chigerwe (2018); Díaz *et al.* (2019).

Agente causal	Rango de edad más frecuente
E. coli enterotoxigénica	0-7 días
Salmonella spp.	5-14 días
BRoV	5-14 días
BCoV	5-30 días
BToV	2-5 días
BNoV	6-14 días
BNeV	7-20 días
Cryptosporidium parvum	7-28 días
Giardia duodenalis	10-30 días
Eimeria spp.	24-30 días

b) Co-infecciones

La presencia de co-infecciones es un factor predisponente para la aparición de brotes de NCD, sobre todo en el caso de aquellas que afectan al tracto respiratorio y las onfaloflebitis. Esto se debe a que la aparición de una infección compromete el sistema inmune del animal, lo que hace que sea más susceptible a sufrir otras infecciones y, por ende, a padecer enfermedades multifactoriales y plurietiológicas (Klein-Jöbstl *et al.*, 2014).

c) Factores estresantes

Antes del parto, el mantenimiento de las madres en condiciones que les supongan un estrés, como la malnutrición o las elevadas temperaturas, tiene efectos negativos sobre el desarrollo intestinal del feto y su posterior maduración tras el nacimiento, lo que podría facilitar la colonización intestinal por parte de los enteropatógenos (Osorio, 2020). Además, el mantenimiento del ternero en condiciones de alojamiento inadecuadas, como el hacinamiento, temperaturas elevadas, mala ventilación, o el manejo y las condiciones asociadas al transporte, pueden dar lugar a una situación de estrés con un efecto inmunosupresor que aumente el riesgo de que el neonato padezca NCD (Barrington y Parish, 2001; Hulbert y Moisá, 2016; Vlasova y Saif, 2021a).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

d) <u>Fallo en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas</u>

Numerosos estudios señalan el fallo en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas (FTP) como uno de los factores más importantes asociado al incremento de la incidencia de NCD (Arsenopoulos *et al.*, 2017; Lora *et al.*, 2018). La máxima protección se obtiene cuando el ternero absorbe una cantidad suficiente de inmunoglobulinas, lo que se consigue tras la ingesta de un volumen adecuado de calostro de calidad lo antes posible después del nacimiento. En este sentido, en primer lugar, resulta determinante la concentración de inmunoglobulina G (IgG) que contenga el calostro, que tiene una gran variabilidad entre las madres del rebaño (Gulliksen *et al.*, 2008), por lo que es uno de los factores más importantes involucrados en el FTP (Barrington *et al.*, 2002; Arsenopoulos *et al.*, 2017). En este sentido, el calostro de las novillas suele ser de peor calidad, así como el de aquellas vacas con partos prematuros o que paren terneros muy pesados (Gulliksen *et al.*, 2008; Kessler *et al.*, 2020). Asimismo, suelen producir un calostro de menor calidad las madres no vacunadas, las que padecen alguna patología, incluso subclínica, o las que sufren *incontinentia lactis*, donde la elevada presión en la ubre da lugar a la pérdida de calostro antes del parto (Conneely *et al.*, 2013; Phipps *et al.*, 2017; Reschke *et al.*, 2017; Denholm *et al.*, 2018). Otro factor que tiene influencia en la calidad del calostro es la época del año en que se produce el parto, pues se ha descrito que es peor en invierno que durante el resto del año, lo que podría estar relacionado con la superioridad nutricional del pasto, que es más escaso en invierno, con respecto al ensilado (Gulliksen *et al.*, 2008; Conneely *et al.*, 2013; Arsenopoulos *et al.*, 2017). Finalmente, resulta determinante el tiempo que transcurre entre el parto y la primera extracción de calostro, ya que si se prolonga más de 6 horas se produce una reducción significativa de la concentración de IgG por el marcado incremento de la producción láctea (Conneely *et al.*, 2013; Reschke *et al.*, 2017; Kessler *et al.*, 2020). Se ha señalado que el calostro, para ser de buena calidad, debe tener una concentración de IgG por encima de 50 g/L, que equivale a una densidad de 1050 g/L o a un valor de Brix del 22% (Vasseur *et al.*, 2009; Bartier *et al.*, 2015; Bartens *et al.*, 2016; Buczinski y Vandeweerd, 2016). La administración de calostro con concentraciones de IgG inferiores se asocia a un incremento de la morbilidad y mortalidad de los procesos y un descenso del rendimiento futuro del animal (Robison *et al.*, 1988; Donovan *et al.*, 1998; Faber *et al.*, 2005).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además de la concentración de inmunoglobulinas, también se ha de tener en cuenta la procedencia y calidad microbiológica del calostro. En cuanto al primer elemento, el consumo de calostro fresco procedente de las vacas del mismo rebaño probablemente proporcione una protección inmunológica específica frente a los patógenos que se encuentren en dicha granja. Así, se ha observado un aumento de la prevalencia de los agentes causales de NCD en terneros alimentados durante su primera semana de vida con lactorreemplazante o con calostro previamente almacenado, que suele perder calidad y no siempre contiene inmunoglobulinas específicas frente a los patógenos presentes en ese momento en la explotación (Mohammed *et al.*, 1999; Barrington *et al.*, 2002; Trotz-Williams *et al.*, 2008; Al Mawly *et al.*, 2015). En este sentido, la vacunación de la madre en el último trimestre de gestación frente a los principales agentes causales de diarrea puede ser una buena forma de aumentar la inmunidad específica proporcionada con el calostro (Saif *et al.*, 1983, 1984; Ellis *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 2021). Así, se han desarrollado varias vacunas comerciales frente a ETEC, BRoV y BCoV, aunque todavía no se dispone de vacunas frente a *Cryptosporidium* spp. y otros enteropatógenos (Cresswell *et al.*, 2014). Con respecto a la calidad bacteriológica del calostro, la presencia de bacterias puede interferir con la absorción y transporte de moléculas a través de las células epiteliales intestinales (James *et al.*, 1981), además de que puede suponer el primer contacto del neonato con algunos microorganismos patógenos, como *Salmonella* spp., *E. coli* o *Mycobacterium paratuberculosis* (Streeter *et al.*, 1995; Steele *et al.*, 1997). La carga bacteriana del calostro fresco no debe exceder las 100.000 ufc/ml (McGuirk y Collins, 2004) y, para no sobrepasar este umbral, resulta útil la aplicación de medidas preventivas en la recogida de calostro, como una adecuada preparación de la ubre, el uso de recipientes de recogida y materiales limpios y desinfectados, la refrigeración o congelación en el plazo de una hora desde su extracción o la aplicación de tratamientos como la pasteurización o la irradiación (Godden, 2008; Nguyen *et al.*, 2019).

Además de la calidad del calostro, existen otros factores que influyen en la consecución de una adecuada transferencia de inmunoglobulinas al ternero. En primer lugar, reviste una gran trascendencia el consumo temprano de un volumen suficiente de calostro. En este sentido, se recomienda que el neonato ingiera tres o más litros de calostro en las primeras seis horas de vida, y una cantidad similar en las doce horas siguientes (Díaz *et al.*, 2019), ya que la capacidad de absorción de inmunoglobulinas del tracto intestinal del ternero

USC

disminuye a medida que pasa el tiempo tras el parto y es prácticamente nula a las 24 horas *post-partum* (McGee y Earley, 2019). Para asegurar la ingesta de un volumen suficiente de calostro, se recomienda la separación temprana de los neonatos de sus madres y el empleo de sistemas de alimentación como las tetinas o la sonda esofágica. De hecho, diversos estudios han constatado que la FTP es más frecuente entre aquellos terneros a los que se deja consumir el calostro directamente de su madre con respecto a los sistemas artificiales (Besser *et al.*, 1991; Trotz-Williams *et al.*, 2007; MacFarlane *et al.*, 2015). Esto se debe a que los animales que son amamantados ingieren un volumen de calostro muy variable en sus primeras horas, que en muchos casos es insuficiente, lo que está relacionado con varios factores. Por un lado, el encalostrado natural implica que los neonatos han de ser lo suficientemente vigorosos para ponerse en pie y encontrar el pezón materno, lo que es más habitual en aquellos que tienen un mayor peso al nacimiento e implica que tiendan a ingerir calostro más pronto que los animales más pequeños y débiles. Por otra parte, las madres tienen que permanecer levantadas y tener un buen comportamiento maternal con el ternero. En este sentido, las novillas suelen tener un peor comportamiento maternal y es más habitual que rechacen al ternero, lo que impide o dificulta el amamantamiento y está relacionado con unas mayores tasas de FTP en sus crías (Edwards, 1982; Broom, 1983; Weaver *et al.*, 2000; Vasseur *et al.*, 2009; McGee y Earley, 2019).

Finalmente, existen otros factores intrínsecos al ternero que tienen importancia desde la óptica de la adecuada transferencia pasiva de inmunoglobulinas. Los terneros nacidos tras un parto distócico, que es más frecuente en novillas, suelen ser menos vigorosos y tienen una mayor probabilidad de sufrir hipoxia, acidosis o dolor por la tracción ejercida. Además, el estrés derivado de esta situación provoca que tarden más en mostrar su comportamiento normal, lo que retrasa la ingesta de calostro (Chan *et al.*, 1993; Mee, 2008; Barrier *et al.*, 2013). Además, pueden permanecer acostados durante períodos más largos tras el nacimiento, lo que se asocia, además de a un consumo de calostro más tardío, a una mayor exposición a patógenos fecales (Bendali *et al.*, 1999b; Barrier *et al.*, 2012, 2013). Por último, la presencia de anormalidades congénitas, heredables o de desarrollo en un ternero puede constituir un factor de riesgo para el FTP, dependiendo del carácter, localización y grado del defecto (Barrington *et al.*, 2002).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.4.2. Factores de riesgo asociados al ambiente

Los factores de riesgo de NCD asociados con el ambiente son los más susceptibles a la implantación de medidas de bioseguridad específicas. En esta categoría se incluyen las condiciones atmosféricas (temperatura, humedad, ventilación, calidad de aire, etc.), alojamiento (casetas individuales, corrales de grupo, en pastoreo), instalaciones (zona de partos, camas, otros animales, protocolos de limpieza, etc.), densidad de animales y su manejo. Todos estos factores pueden afectar negativamente al sistema inmunitario del ternero e influir en la acumulación de los patógenos en el ambiente, así como en su supervivencia y replicación (Barrington *et al.*, 2002; Maunsell y Donovan, 2008; Hulbert y Moisá, 2016).

a) <u>Alojamientos, parideras y fómites</u>

El alojamiento de los terneros tiene una gran influencia en la aparición de casos de diarrea, pues la mayoría de los agentes causales de este proceso se transmiten de forma muy efectiva por vía fecal-oral a partir del contacto con los animales infectados (transmisión directa) y con un ambiente contaminado (transmisión indirecta) (Lee *et al.*, 2019). Con respecto a la transmisión directa, el mayor riesgo se produce cuando los individuos susceptibles están en contacto con otros terneros con diarrea, aunque también cuando comparten instalaciones con terneros lactantes más mayores o con bovinos de otros grupos de edad, que pueden actuar como portadores asintomáticos (Barrington *et al.*, 2002; Maunsell y Donovan, 2008). En este sentido, el hacinamiento de los animales, más frecuente en las explotaciones más grandes, incrementa las posibilidades de contacto entre individuos y también con superficies contaminadas, por lo que actúa como un factor de riesgo para la aparición de NCD (Frank y Kaneene, 1993; Trotz-Williams *et al.*, 2008; Gulliksen *et al.*, 2009). No obstante, en contraste con lo indicado previamente con respecto al tamaño de la explotación, un estudio realizado en Galicia detectó una mayor incidencia de criptosporidiosis en las granjas más pequeñas, lo que se relaciona con que en este territorio las explotaciones más grandes suelen tener unas mejores condiciones de alojamiento e higiene (Castro-Hermida *et al.*, 2002a).

Por otra parte, la contaminación ambiental también genera una elevada presión de infección sobre el neonato, actuando como uno de los factores de riesgo más importantes de

cara a la aparición de un brote de NCD (Cho y Yoon, 2014), por lo que la ausencia de un protocolo de limpieza y desinfección que se aplique de forma periódica y exhaustiva está asociada a una mayor incidencia de este proceso (Gulliksen *et al.*, 2009; Cummins *et al.*, 2016). Con respecto a esto, resulta de vital importancia el empleo de compuestos que sean realmente efectivos frente a los agentes causales, sobre todo si tenemos en cuenta que algunos de ellos, como *Cryptosporidium* spp., pueden permanecer infectantes en el ambiente durante meses y son resistentes a la mayoría de los desinfectantes de uso común (Quilez *et al.*, 2005; Fayer, 2008; van Mol *et al.*, 2022). Además de la resistencia ambiental, en este tipo de transmisión también tiene gran importancia que la carga del agente en el medio supere la dosis infectiva requerida. En efecto, la carga patogénica del ambiente juega un papel determinante sobre la intensidad de los signos clínicos que padecen los animales y la rapidez de su inicio, sobre todo si tenemos en cuenta que la mayoría de los terneros van a estar expuestos a estos agentes en algún punto de su vida. La existencia de una presión de infección extremadamente alta es muy probable durante los brotes de NCD; es ejemplo de ello un estudio realizado por Zambriski *et al.* (2013), que señala que el número de ooquistes que suele excretar al medio un ternero infectado es inmensamente superior a la dosis infectiva media de *C. parvum.* Esa elevada contaminación ambiental es capaz de sobrepasar incluso a la mejor transferencia pasiva de inmunidad, provocando que el proceso se extienda a terneros que no lo padecían previamente (Barrington *et al.*, 2002; Maunsell y Donovan, 2008).

Las características de las instalaciones en que se alojan los animales también tienen una gran relevancia desde el punto de vista de la contaminación ambiental. En primer lugar, es importante que estén bien drenadas, ya que la acumulación de humedad favorece la supervivencia de los patógenos y aumenta la contaminación del área (Bendali *et al.*, 1999b). Otros elementos a considerar son el tipo de suelo y de cama empleados. Se ha demostrado que el riesgo de NCD es mayor en aquellos rebaños que utilizan paja sobre tierra o suelo de cemento, siendo preferible el emparrillado (Díaz *et al.*, 2018b). No obstante, aunque el material empleado tiene su importancia, quizás sea todavía más determinante la frecuencia de cambio de cama, ya que si está llena de heces se convierte en una de las principales fuentes de patógenos (Medrano-Galarza *et al.*, 2018b). En efecto, existen estudios que demuestran que una renovación frecuente (cada dos o tres días) de la cama de paja, que incluya la retirada de la cama vieja y la limpieza de los puntos donde se acumula la suciedad, se asocia de forma

USC DE COMPOSTELA

significativa a un menor riesgo de infección (Bendali *et al.*, 1999b; Mohammed *et al.*, 1999; Gulliksen *et al.*, 2009; Medrano-Galarza *et al.*, 2018b).

Además del alojamiento, el área de partos es uno de los ambientes con mayor riesgo de transmisión de patógenos a terneros susceptibles y, por lo tanto, una de las áreas más importantes para la higiene ambiental (Maunsell y Donovan, 2008). Por ello, las parideras no deben utilizarse para otras actividades distintas al parto y, particularmente, debe evitarse su uso como alojamiento temporal de animales enfermos. En este sentido, Fossler *et al.* (2005) comprobaron que en aquellas granjas que usan el área de partos como enfermería, el riesgo de que los terneros excreten *Salmonella* spp. se multiplica por dos. De la misma forma, no se recomienda la permanencia del ternero en la paridera durante un largo período de tiempo ya que, aparte de estar asociada a una mayor incidencia de FTP, incrementa su exposición a los patógenos ambientales allí presentes (Klein-Jöbstl *et al.*, 2014). Además, si no existe un área de partos ni se separa al ternero de su madre, un mayor número de neonatos pueden ser abandonados y se favorece la succión cruzada, lo que puede dar lugar a una reducción en la cantidad de calostro ingerida, provocando que los terneros sean más susceptibles a los agentes patógenos (Torsein *et al.*, 2011). Por otra parte, en lo que se refiere a las camas, se ha observado que la incidencia de NCD es menor en los terneros nacidos en parideras con suelo de cemento, ya que permite una limpieza y desinfección más exhaustiva que otros materiales como la tierra o la arena (Castro-Hermida *et al.*, 2002; Trotz-Williams *et al.*, 2008).

Tanto en los alojamientos como en el área de partos, el neonato puede entrar en contacto con un gran número de elementos en los que pueden persistir los agentes causales de NCD, pudiendo por tanto actuar como fómites. Algunos de los más habituales son los empleados para la administración de calostro, como los cubos y las tetinas. También suponen un riesgo en este sentido todas aquellas actividades, como el cambio de cama, que implican el movimiento del personal y del equipamiento entre grupos de animales y corrales (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998; Sischo *et al.*, 2000). Finalmente, tanto los alojamientos como las parideras deberían de estar dotadas de una buena ventilación, ya que si constituyen un espacio cerrado, los procedimientos que provocan la suspensión en el aire de patógenos del polvo o de las heces, como el lavado a presión, pueden aumentar la transmisión de los agentes causales de NCD (Mohammed *et al.*, 1999; Barrington *et al.*, 2002).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

b) Vectores

La presencia de vectores en la granja también puede considerarse como un factor de riesgo para la transmisión de la infección, sobre todo cuando se encuentran en gran número y no se han tomado medidas de control. Uno de los más importantes son las moscas, cuyas poblaciones se incrementan notablemente alrededor de las explotaciones durante los meses de verano, pues constituyen una gran fuente de materia orgánica (especialmente leche así como heces sólidas y diarreicas) para su alimentación y multiplicación (Barrington *et al.*, 2002). Estos insectos pueden transportar un gran número de patógenos entéricos presentes de las heces, contribuyendo por tanto a la diseminación y transmisión de los mismos (Cohen *et al.*, 1991; Barrington *et al.*, 2002). En este sentido, se ha confirmado que las moscas pueden vehicular un elevado número de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., depositándolos en las zonas en las que se posan, y que los pueden albergar durante 3 semanas tras su exposición (Graczyk *et al.*, 2000). De la misma forma, los roedores también pueden actuar como una fuente de patógenos entéricos en el ambiente de la explotación; así, por ejemplo, se ha demostrado que aproximadamente un tercio de los roedores excreta una media de 10^3 ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por pellet fecal (Torres *et al.*, 2000), siendo especialmente importante su papel en la transmisión de *C. parvum* (Chalmers *et al.*, 1997; Bajer *et al.*, 2003). Lo mismo sucede con los pájaros, que pueden jugar un papel importante en la diseminación de los patógenos a diferentes naves y a otras granjas (Smith *et al.*, 2014).

c) Estación

Varios autores han señalado mayores incidencias de este proceso en invierno, pues durante esta estación es habitual que en las explotaciones haya una mayor densidad de animales por alojamiento, a lo que se une una temperatura ambiental más baja y una mayor humedad en el ambiente (Schumann *et al.*, 1990; Frank y Kaneene, 1993; Bendali *et al.*, 1999a; Gulliksen *et al.*, 2009). Todo ello resulta en una mayor carga ambiental de agentes patógenos y una mayor resistencia de los mismos en el medio (Lundborg *et al.*, 2005; Gulliksen *et al.*, 2009), lo que provoca un incremento de la presión de infección. Además, la climatología fría y húmeda puede resultar en un retraso y en una disminución de la absorción de inmunoglobulinas por parte del neonato (Olson *et al.*, 1980; Beam *et al.*, 2009), lo que unido a la ya comentada inferior calidad del calostro producido en esta estación, puede

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

provocar una menor resistencia del ternero a la presión de infección, incrementando las probabilidades de aparición de NCD.

En contraste, en zonas donde se registran temperaturas muy elevadas, la incidencia de diarrea puede ser mayor en el verano, fundamentalmente porque el estrés por calor que padece el ternero provoca un aumento de sus niveles de glucocorticoides que provocan una disminución de la absorción intestinal de inmunoglobulinas (Uetake, 2013).

d) <u>Introducción de animales</u>

La incorporación en la explotación de terneras de reposición también puede suponer un factor de riesgo para la aparición de NCD, pues éstos pueden introducir nuevos agentes infecciosos en la granja, así como contribuir al mantenimiento de la infección con los previamente presentes, dando lugar a un brote diarreico. Además, es más probable que compren animales de reposición los ganaderos cuyos terneros mueren por este proceso (Schumann *et al.*, 1990; Barrington *et al.*, 2002; Gulliksen *et al.*, 2009).

1.4.4.3. Factores asociados con el agente causal

Numerosos agentes patógenos pueden estar involucrados en la aparición de NCD. Su prevalencia varía en función de la zona geográfica en la que se realice el estudio (Tabla 5), pero, en general, son ubicuos y endémicos. Así, se ha comprobado que prácticamente el 100% de los bovinos se infectan con *Cryptosporidium* spp., *G. duodenalis* y *Eimeria* spp., especialmente durante los primeros meses de vida (Xiao y Herd, 1994; Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Daugschies y Najdrowski, 2005), y es habitual que las infecciones persistan en la etapa adulta, aunque en bajas concentraciones y sin signos clínicos de infección (Fayer *et al.*, 2000; Castro-Hermida *et al.*, 2002b, 2007; Trout *et al.*, 2007; Lucas *et al.*, 2014). Además, el resto de agentes causales de NCD también se han detectado en un elevado número de animales asintomáticos (Cho *et al.*, 2013; Coura *et al.*, 2014; Kolenda *et al.*, 2015; Gomez *et al.*, 2017), lo que se debe a que muchos de ellos actúan más como oportunistas secundarios que como patógenos primarios altamente virulentos y a que, como hemos ido mencionando, la aparición de NCD también depende de la presencia de otros factores (Reynolds *et al.*, 1986; Barrington *et al.*, 2002). Por lo tanto, su detección no puede interpretarse por sí sola como causa de la diarrea (De La Fuente *et al.*, 1998).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

La implicación de más de un agente patógeno en la NCD es un fenómeno muy habitual que puede resultar determinante para la aparición de los signos clínicos y normalmente está relacionado con brotes más graves (Reynolds *et al.*, 1986; Cho *et al.*, 2013). Su mayor gravedad podría relacionarse con que, como se ha mencionado previamente, el neonato tiene un sistema inmunitario inmaduro, por lo que es extremadamente susceptible a los patógenos entéricos, de forma que la infección con un gran número de agentes podría superar los mecanismos defensivos del ternero (Hulbert y Moisá, 2016; Gomez y Weese, 2017). Además, la concurrencia de varios patógenos provoca lesiones en diferentes zonas del tracto intestinal que tienen un efecto acumulativo, resultando en una mayor pérdida de funciones digestivas y de absorción que agravaría la diarrea (Hall *et al.*, 1988). Como consecuencia de todo esto, las infecciones mixtas se han observado de forma más frecuente en terneros diarreicos que en sanos (García-Meniño *et al.*, 2015) y, además, varios estudios en los que solamente se incluyeron individuos diarreicos han demostrado altas tasas de co-infección (Izzo *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2013). La co-infección con dos patógenos es la más común, siendo las más habituales las provocadas por *Cryptosporidium* spp. acompañado por un agente vírico (García-Meniño *et al.*, 2015; Delling y Daugschies, 2022), ya que este último, además de causar lesiones en el intestino, provoca una cierta inmunosupresión que favorece el desarrollo del parásito (Cho *et al.*, 2013). No obstante, en las infecciones mixtas pueden estar implicados un gran número de agentes, habiéndose detectado hasta seis en una única muestra de heces diarreicas (Cho *et al.*, 2013).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5. Prevalencias de los principales agentes causales de NCD en terneros lactantes detectadas en estudios realizados en España y otros países europeos con n >30.

Agente	Nº de animales muestreados	Edad	Presencia de diarrea	Prevalencia	País	Referencia
***E. coli* enterotoxigénica**	218	≤ 30 días	Diarreicos	11,9%	España	De La Fuente *et al.* (1998)
	83	≤ 45 días	Diarreicos y sanos	≈8%	España	García-Meniño *et al.* (2015)
	1379	≤ 30 días	Diarreicos	16,5%	Dinamarca	Krogh (1983)
	147	≤ 21 días	Diarreicos	5,5%	Suiza	Lanz Uhde *et al.* (2008)
	424	≤ 21 días	Diarreicos y sanos	2,6%	Países Bajos	Bartels *et al.* (2010)
	421	≤ 30 días	Diarreicos	3,8%	Reino Unido	Thompson *et al.* (2007)
***Salmonella* spp.**	218	≤ 30 días	Diarreicos	0,9%	España	De La Fuente *et al.* (1998)
Rotavirus	218	≤ 30 días	Diarreicos	42,7%	España	De La Fuente *et al.* (1998)
	83	≤ 45 días	Diarreicos y sanos	≈18%	España	García-Meniño *et al.* (2015)
	237	< 2 meses	Diarreicos	50,6%	España	Benito *et al.* (2020)
	789	≤ 10 días	Diarreicos	48%	Francia	Perrin *et al.* (1981)
	147	≤ 21 días	Diarreicos	55,8%	Suiza	Lanz Uhde *et al.* (2008)
	424*	≤ 21 días	Diarreicos y sanos	17.7%	Países Bajos	Bartels *et al.* (2010)
	108	≤ 30 días	Diarreicos	38,9%	Irlanda	Fagan *et al.* (1994)
	806	≤ 30 días	Diarreicos	30%	Reino Unido	Thompson *et al.* (2007)
Coronavirus	218	≤ 30 días	Diarreicos	7,3%	España	De La Fuente *et al.* (1998)
	83	≤ 45 días	Diarreicos y sanos	≈4%	España	García-Meniño *et al.* (2015)
	237	< 2 meses	Diarreicos	23,6%	España	Benito *et al.* (2020)
	806	≤ 30 días	Diarreicos	5,7%	Reino Unido	Thompson *et al.* (2007)
	147	≤ 21 días	Diarreicos	7,8%	Suiza	Lanz Uhde *et al.* (2008)
	424	≤ 21 días	Diarreicos y sanos	3,1%	Países Bajos	Bartels *et al.* (2010)
Torovirus	90	≤ 42 días	Diarreicos	11.1%	Austria	Haschek *et al.* (2006)
	111	< 2 meses	Diarreicos	3,6%	Hungría	Matiz *et al.* (2002)
	119	< 2 meses	Diarreicos	5%	Alemania	Liebler *et al.* (1992)
Norovirus	456	≤ 16 días	Diarreicos	20%	Francia	Kaplon *et al.* (2011)
	381	≤ 4 semanas	Diarreicos	8,9%	Alemania	Deng *et al.* (2003)
	101	7-20 días	Diarreicos	20,8%	Italia	Di Bartolo *et al.* (2011)

Tabla 5. Continuación.

Agente	Nº de animales muestreados	Edad	Presencia de diarrea	Prevalencia	País	Referencia
Norovirus	38	≤ 7 días	Diarreicos	34%	Reino Unido	Milnes *et al.* (2007)
	36	≤ 60 días	Diarreicos	17%	Suecia	Tråvén *et al.* (2022)
Nebovirus	38	≤ 6 semanas	Diarreicos	13,1%	Italia	Di Martino *et al.* (2011)
	456	≤ 16 días	Diarreicos	7%	Francia	Kaplon *et al.* (2011)
	36	≤ 60 días	Diarreicos	8%	Suecia	Tråvén *et al.* (2022)
Cryptosporidium parvum	61	≤ 21 días	Diarreicos	49,2%	España	Díaz *et al.* (2010)
	78	< 1,5 meses	Diarreicos	53,8%	España	Quílez *et al.* (1996)
	287	≤ 21 días	Diarreicos	57,8%	España	Quílez *et al.* (2008)
	218	≤ 30 días	Diarreicos	52,3%	España	De La Fuente *et al.* (1998)
	83	≤ 45 días	Diarreicos y sanos	≈70%	España	García-Meniño *et al.* (2015)
	237	≤ 2 meses	Diarreicos	57,8%	España	Benito *et al.* (2020)
	4060	≤ 4 semanas	Diarreicos	21,5%	Alemania	Joachim *et al.* (2003)
	147	≤ 35 días	Diarreicos y sanos	38,8%	Italia	Díaz *et al.* (2018b)
	779	≤ 30 días	Diarreicos	37,4%	Reino Unido	Thompson *et al.* (2007)
	441	≤ 30 días	Diarreicos	60,8%	Alemania	Göhring *et al.* (2014)
	147	≤ 21 días	Diarreicos	53,7%	Suiza	Lanz Uhde *et al.* (2008)
	424	≤ 21 días	Diarreicos y sanos	27,8%	Países Bajos	Bartels *et al.* (2010)
	258	≤ 30 días	Diarreicos	25%	Rumanía	Imre *et al.* (2011)
	1057	≤ 30 días	Diarreicos	≈53,5%	Alemania	Gillhuber *et al.* (2014)
Giardia duodenalis	78	< 1,5 meses	Diarreicos	14,1%	España	Quílez *et al.* (1996)
	1057	≤ 30 días	Diarreicos	≈4,3%	Alemania	Gillhuber *et al.* (2014)
	53	< 1 mes	Diarreicos y sanos	58,5%	España	Castro-Hermida *et al.* (2006)
	377	< 1 mes	Diarreicos y sanos	24%	Dinamarca	Maddox-Hyttel *et al.* (2006)
	179	≤ 4 semanas	Diarreicos	30,2%	Reino Unido	Bartley *et al.* (2019)
***Eimeria* spp.**	1057	≤ 30 días	Diarreicos	≈5,4%	Alemania	Gillhuber *et al.* (2014)
	30	≤ 60 días	Diarreicos	27%	Finlandia	Seppä-Lassila *et al.* (2015)

1.4.5. Diagnóstico

Dadas las importantes pérdidas económicas asociadas a la NCD, ante la aparición de un brote es de vital importancia aplicar las medidas de tratamiento y control más adecuadas, lo que resulta imposible sin haber realizado antes un buen diagnóstico del proceso. Teniendo en cuenta que se trata de un proceso multifactorial, la presencia de determinados agentes etiológicos debe interpretarse considerando los signos clínicos del animal y los factores que pueden suponer un mayor riesgo de desencadenar el proceso. Por ello, además de la realización de las diversas técnicas laboratoriales que permiten llegar a un diagnóstico etiológico, es imprescindible la exploración clínica de los animales y la recogida de datos epidemiológicos en la explotación (Heller y Chigerwe, 2018; Díaz *et al.*, 2019).

1.4.5.1. Exploración clínica

Aunque la diarrea es el elemento más característico de la NCD, no debemos olvidar que existen otras patologías que pueden manifestarse con este signo clínico. Por lo tanto, para saber si realmente nos enfrentamos a un brote de NCD es preciso realizar el examen clínico completo, sistemático y ordenado de los animales (González y Astiz, 2005; Heller y Chigerwe, 2018).

En primer lugar, se ha de determinar el grado de deshidratación del animal, que si es muy elevado puede resultar en el cese de la diarrea (Blanchard, 2012). La sequedad en las mucosas, la permanencia del pliegue cervical y el enoftalmos son signos fácilmente evaluables a nivel de campo que indican la presencia de deshidratación y permiten determinar su gravedad. Para ello, Constable *et al.* (1998) propusieron unos parámetros de valoración práctica del grado de deshidratación del animal en función de sus signos clínicos que se recogen en la Tabla 6.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Valoración del grado de deshidratación en terneros diarreicos en función de sus signos clínicos. Adaptado de Constable *et al.* (1998).

Deshidratación (%)	Enoftalmos (mm)	Permanencia del pliegue cervical (s)
0	Ausencia	≤ 2
2	1	3
4	2	4
6	3	5
8	4	6
10	6	7
12	7	≥ 8
14	≥ 8	≥ 10

Además de la deshidratación, resulta igualmente importante valorar el grado de acidosis del animal. Para ello, se puede realizar una gasometría sanguínea (Sayers *et al.*, 2016). Sin embargo, a pesar de que existen en el mercado medidores portátiles de gases que se pueden emplear a nivel de granja (Ro *et al.*, 2022), su elevado precio hace que su uso no sea habitual. Por lo tanto, en la práctica, el grado de acidosis se evalúa mediante la observación de varios elementos. Así, la actitud y la postura del animal pueden resultar indicativas, ya que los animales que permanecen recostados y deprimidos suelen tener una acidosis metabólica más intensa (Heller y Chigerwe, 2018). De la misma forma, la incapacidad de retirar la lengua cuando se ve sometida a presión y la disminución o ausencia del reflejo de succión son elementos que permiten sospechar de un déficit básico (Homerosky *et al.*, 2017).

El dolor abdominal es otro de los signos clínicos que suele aparecer en los terneros afectados por NCD. Para detectarlo, puede ser útil comprobar la existencia de una posible distensión abdominal y observar la postura del animal, que suele arquear el lomo o permanecer recostado con las patas posteriores sobreextendidas (Heller y Chigerwe, 2018). Sin embargo, el dolor abdominal también puede derivarse de otros procesos (House *et al.*, 2015), por lo que es necesario descartarlos mediante una exploración clínica más exhaustiva de la zona. Para ello, se ha de comenzar por la palpación abdominal, que además de permitir confirmar la existencia de dolor, es útil para comprobar la existencia de onfaloflebitis, hernias u otros defectos de la pared abdominal (House *et al.*, 2015). A continuación, la

realización de una auscultación y percusión simultáneas permite identificar la presencia de fluido y gases en el abdomen. Asimismo, resulta útil la sucusión, ya que la presencia de ruido de chapoteo es indicativo de la presencia de líquido excesivo en las vísceras abdominales (Heller y Chigerwe, 2018).

Por otra parte, los cuadros clínicos derivados de la NCD pueden complicarse por la aparición de una endotoxemia o septicemia, que empeora notablemente el pronóstico (González y Astiz, 2005). Resulta indicativa de estos procesos la presencia de hipertermia, congestión de mucosas y ojos, hipopión en la cámara anterior ocular y aumento del tiempo de rellenado capilar, así como de otitis, onfaloflebitis o meningitis (Heller y Chigerwe, 2018).

Una vez realizado el examen físico, la observación de las características de la diarrea puede resultar orientativa de cada al diagnóstico etiológico. Además, algunos enteropatógenos dan lugar a signos clínicos específicos a los que es útil prestar atención (Tabla 7).

Tabla 7. Características de la diarrea y del cuadro clínico en función del agente etiológico (Keeton y Navarre, 2018; Peek *et al.*, 2018; Díaz *et al.*, 2019).

Agente etiológico	Características de la diarrea	Otros signos clínicos
***E. coli* enterotoxigénica**	Leve, pastosa o acuosa, con recuperación espontánea o cuadro hiperagudo con diarrea muy acuosa y amarillenta.	
***Salmonella* spp.**	Sanguinolenta con restos de tejido y fibrina.	Fiebre.
Rotavirus	Acuosa y amarillenta.	Algunos individuos pueden tener fiebre e hipersalivación.
Coronavirus	Acuosa y amarillenta que puede presentar restos de moco y de sangre.	Los animales infectados no suelen tener fiebre.
Torovirus	Amarillo-verdosa.	Fiebre moderada.
Norovirus	Amarillo-verdosa con restos de moco.	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7. Continuación.

Agente etiológico	Características de la diarrea	Otros signos clínicos
Nebovirus	Amarillenta con restos de tejidos.	
C. parvum	Acuosa y amarillenta.	Los animales infectados no suelen tener fiebre ni estar deprimidos.
G. duodenalis	Pastosa, suele presentar moco.	Fiebre.
***Eimeria* spp.**	Diarrea mucoide y/o sanguinolenta	Tenesmo. Los terneros con infecciones más graves pueden mostrar una coccidiosis nerviosa, con temblores musculares o nistagmo.

De la misma forma, puede resultar interesante la realización de la necropsia de los individuos inmediatamente tras su muerte, ya que a los cinco minutos del fallecimiento comienza la autolisis y la invasión bacteriana de la mucosa intestinal (Izzo *et al.*, 2015). Durante este procedimiento, se debe prestar atención a la presencia de áreas intestinales con diferente color, consistencia o contenido, así como de otras lesiones que pueden ser orientativas de cara a dilucidar la etiología del proceso (Tabla 8).

Tabla 8. Hallazgos observables en la necropsia en función del agente causal de la diarrea (González y Astiz, 2005; Heller y Chigerwe, 2018; Díaz *et al.*, 2019).

Agente etiológico	Hallazgos en la necropsia
***E. coli* enterotoxigénica**	Intestino dilatado con gas y líquido amarillento, sin daños apreciables en la mucosa ni hemorragia. En caso de endotoxemia, hipopión, meningitis, onfaloflebitis y presencia de fibrina en las articulaciones, en el abdomen, etc.
***Salmonella* spp.**	Enteritis fibrinosa a fibrino-necrótica con contenido sanguinolento, especialmente en yeyuno, íleon y colon. Peritonitis con presencia de fibrina en la cavidad abdominal. Signos de diseminación bacteriana a otros órganos como los riñones. Focos de necrosis hepática.
Rotavirus, Coronavirus y *C. parvum*	Enteritis catarral sin más hallazgos anatomopatológicos observables.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 8. Continuación.

Agente etiológico	Hallazgos en la necropsia
***Eimeria* spp.**	Enteritis hemorrágica con nódulos o líneas blanco-grisáceas, especialmente en el intestino grueso.

1.4.5.2. Diagnóstico epidemiológico

Una vez realizado el examen clínico de los terneros afectados, es igualmente importante recopilar los factores de riesgo y puntos críticos existentes en la explotación que pueden estar detrás del brote, ya que resultará útil para interpretar correctamente los resultados de laboratorio, minimizar las pérdidas asociadas al problema existente y prevenir su reaparición en el futuro (Smith, 2012).

En primer lugar, es importante conocer el historial de diarreas de la explotación y toda la información asociada al brote: su duración y progresión, tasa de mortalidad y morbilidad, estación del año, el número y, especialmente, la edad de los animales afectados ya que, como hemos visto en el apartado de epidemiología, puede resultar muy orientativa de cara a sospechar de unos enteropatógenos u otros (Moran, 2002; Díaz *et al.*, 2019). A continuación, es preciso realizar una visita pormenorizada de la explotación para revisar todas las instalaciones y pautas de manejo que puedan tener incidencia en la salud del ternero neonato. En este sentido, cobran especial importancia el manejo del animal en sus primeros días de vida y su encalostrado (calidad y cantidad del calostro, momento y forma de administración), el diseño de los alojamientos y de las parideras y los protocolos de higiene y desinfección. Asimismo, es conveniente disponer de información sobre los protocolos seguidos para la introducción de animales en la explotación, el manejo de las madres durante el período de secado y periparto, así como conocer las medidas preventivas aplicadas frente a este y otros procesos infectoparasitarios, incluyendo tratamientos y pautas de vacunación administradas (Moran, 2002; González y Astiz, 2005; Heller y Chigerwe, 2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.5.3. Diagnóstico laboratorial

La identificación de los agentes patógenos implicados en un caso o brote de diarrea neonatal es esencial pues permite establecer las medidas preventivas y de control específicas más adecuadas en cada caso, incluyendo la instauración de una pauta de vacunación o tratamiento específico en el caso de ciertos enteropatógenos. Por otro lado, permite identificar agentes zoonósicos que pueden estar implicados en el proceso con importancia desde el punto de vista de la salud pública, como algunas especies de *Salmonella* y *Cryptosporidium* y algunos genotipos de *G. duodenalis* (Holschbach y Peek, 2018; Chalmers *et al.*, 2019; Taghipour *et al.*, 2022).

Sin embargo, a la hora de realizar un adecuado diagnóstico etiológico se debe tener en cuenta que en la mayoría de los animales con diarrea está presente más de un enteropatógeno, y algunos de ellos pueden estar presentes incluso en terneros sanos (Cho y Yoon, 2014; García-Meniño *et al.*, 2015). Algunos, como la mayoría de las cepas de *E. coli*, incluso forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal de los terneros, por lo que su aislamiento a partir de heces o de contenido intestinal no es significativo a no ser que se demuestre la presencia de factores de virulencia (Izzo *et al.*, 2015).

Para la realización de un diagnóstico etiológico correcto es imprescindible recoger las muestras oportunas. En este sentido, la toma de muestras debería incluir animales de todas las semanas de edad afectados por el brote, así como animales aparentemente sanos, ya que podrían estar infectados de forma subclínica. Así, se recomienda recoger un mínimo de 10 gramos de heces directamente del recto de animales, siempre y cuando no hayan sido tratados en las 24-48 horas posteriores a la aparición de los signos clínicos (Díaz *et al.*, 2019). Cuando haya varios animales afectados, pueden examinarse las heces de cada animal de forma individual o elaborarse *pools* que deberían incluir deyecciones de tres individuos (Loy y Brodersen, 2022). Las muestras recogidas deberán conservarse en refrigeración y analizarse en el menor tiempo posible. Asimismo, si se realiza la necropsia de individuos fallecidos a causa del proceso, resulta interesante tomar muestras de duodeno, yeyuno medio, íleon proximal, válvula íleocecal y colon, así como de ganglios linfáticos regionales y otros órganos afectados, para examinarlas en busca de lesiones que confirmen los diagnósticos macroscópicos establecidos previamente (Blanchard, 2012). Se recomienda

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

incluir porciones de tejido que incluyan lesiones acompañadas de otras aparentemente sanas (Díaz *et al.*, 2019). Si las muestras están destinadas a la realización de cultivos bacterianos, se deben enviar en refrigeración, mientras que para el cultivo de virus pueden refrigerarse o congelarse. En el caso de emplearlas para estudios histopatológicos, deben ser frescas o estar fijadas en formol (Lew *et al.*, 1990; Morales *et al.*, 2017).

Se han desarrollado numerosas técnicas para la detección de enteropatógenos en heces (Tabla 9); aunque ninguna presenta una sensibilidad y especificidad del 100%, las técnicas moleculares suelen ser las más fiables.

Tabla 9. Técnicas laboratoriales disponibles para cada agente causal de la NCD. Adaptado de Díaz *et al.* (2019). ELISAd: Enzimoinmunoanálisis de adsorción de captura de antígeno; ICF: Inmunocromatografía; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; qPCR: PCR en tiempo real; IFAT: Inmunofluorescencia directa; RT-PCR: PCR con transcripción inversa. ELISAi: Enzimoinmunoanálisis de adsorción indirecto.

Agente etiológico	Cultivo	Microscópicas	Inmunológicas	Moleculares
***E. coli* enterotoxigénica**	Cultivo bacteriano	-	ELISAd, ICF, Aglutinación	PCR, qPCR
***E. coli* enteropatógena**	Cultivo bacteriano	-	-	PCR, qPCR
***E. coli* productora de toxinas Shiga y enterohemorrágica**	Cultivo bacteriano	-	-	PCR, qPCR
***Salmonella* spp.**	Cultivo bacteriano		Aglutinación	PCR, qPCR
Rotavirus	Aislamiento vírico	Microscopía electrónica	ELISAd, IFAT, ICF	RT-PCR[6], PCR, qPCR
Coronavirus	Aislamiento vírico	Microscopía electrónica	IFAT	RT-PCR, PCR, qPCR
Torovirus	-	Microscopía electrónica	ELISAd, IFAT	RT-PCR, PCR, qPCR
Norovirus	-	Microscopía electronica	ELISAd	RT-PCR, PCR, qPCR

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 9. Continuación.

Agente etiológico	Cultivo	Microscópicas	Inmunológicas	Moleculares
Nebovirus	-	Microscopía electronica	ELISAd	RT-PCR, PCR, qPCR
***Cryptosporidium* spp.**	-	Microscopía óptica tras tinción	ELISAd, ELISAi, IFAT, ICF	PCR, qPCR
G. duodenalis	-	Microscopía óptica tras flotación	ELISAd, IFAT, ICF	PCR, qPCR
***Eimeria* spp.**	-	Microscopía óptica tras flotación	ELISAi	PCR, qPCR

Técnicas de cultivo

Las técnicas de cultivo a partir de heces o de muestras intestinales permiten detectar diversos agentes bacterianos y víricos (Tabla 9). El aislamiento vírico sigue considerándose el *gold standard* para la detección de dichos patógenos (Popow-Kraupp y Aberle, 2011), pero su realización es laboriosa y requiere mucho tiempo, por lo que en la actualidad tan sólo se emplea como método confirmatorio (Cho y Yoon, 2014). Por su parte, el cultivo bacteriano se usa de forma habitual para la identificación de este tipo de agentes; sin embargo, no está exento de inconvenientes ya que, por un lado, los resultados no se obtienen hasta 24-72 h después de realizar la técnica y, por otro, a pesar de la existencia de medios de cultivos selectivos y diferenciales, es un método muy poco específico, lo que hace necesaria su combinación con otros (Cho y Yoon, 2014). Así, en el caso de los patotipos de *E. coli*, el diagnóstico definitivo requiere confirmar que las colonias aisladas poseen determinados factores de virulencia mediante técnicas de detección de antígenos como el ELISA, la inmunocromatografía y la aglutinación en placa o en látex (Blanchard, 2012; Peek *et al.*, 2018) o, preferiblemente, con métodos de identificación molecular como la PCR (Sjöling *et al.*, 2007).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Técnicas microscópicas

Las técnicas microscópicas se emplean fundamentalmente para la detección de los ooquistes o quistes de los protozoos implicados en la NCD. Son métodos que permiten un diagnóstico rápido de forma económica, pero presentan una baja sensibilidad. Para incrementarla se puede recurrir a métodos de concentración previa de los quistes u ooquistes. Con esta finalidad, se emplean técnicas como la flotación con solución salina saturada, sacarosa o sulfato de zinc (Casemore *et al.*, 1985) o la concentración difásica con formol-éter o con agua y acetato de etilo (Mank *et al.*, 1997; Smith, 2008; Díaz *et al.*, 2018a). Además, para incrementar la probabilidad de detectar estas formas parasitarias y, por tanto, aumentar la sensibilidad, se suelen emplear técnicas de tinción, como la de Heine o la de Ziehl-Neelsen modificada, entre otras, para los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Henriksen y Pohlenz, 1981; Heine, 1982), o la tinción con lugol, la de Giemsa, la tricrómica de Mason o la tinción con hematoxilina de hierro para los trofozoítos y quistes de *G. duodenalis* (Ament, 1972; Thornton *et al.*, 1983; Huang y White, 2006; Smith y Paget, 2007).

La baja sensibilidad de las técnicas microscópicas no suele suponer un problema en el diagnóstico de los casos clínicos de *Cryptosporidium* spp., pues suelen caracterizarse por la eliminación de millones de ooquistes en las heces. No obstante, existen casos de animales asintómaticos o en fases iniciales de la infección, donde la intensidad de eliminación de ooquistes es muy baja. Por ello, para aumentar la fiabilidad del diagnóstico, se recomienda realizar una concentración previa de ooquistes y posteriormente confirmar con una técnica de gran sensibilidad como la inmunofluorescencia directa o la PCR (Smith, 2008; Mirhashemi *et al.*, 2015).

Otra de las limitaciones de la utilización de la microscopía es que no permite determinar la especie de *Cryptosporidium* spp. ni el genotipo de *G. duodenalis* implicado en la infección, por lo que no permiten determinar su potencial zoonósico (Thompson y Monis, 2004; Blanchard, 2012). Sin embargo, en el caso de *Eimeria* spp., el análisis morfométrico de los ooquistes permite diferenciar especies; debido a que algunas estructuras de interés sólo aparecen en ooquistes esporulados, una correcta identificación de estas formas parasitarias precisa de su esporulación previa, que se consigue mediante su incubación en

USC DE COMPOSTELA

una solución de dicromato potásico al 2,5% durante 7-10 días (Koutny *et al.*, 2012; Bangoura y Daugschies, 2018).

Por su parte, la microscopía electrónica presenta la ventaja de que se puede emplear para identificar virus difíciles de cultivar, pero es una técnica muy poco sensible (Cho y Yoon, 2014). De hecho, el pleomorfismo de algunos agentes como BCoV o BToV y su similitud puede dar lugar a identificaciones erróneas (Woode, 1987). De todos modos, este inconveniente puede reducirse mediante la introducción de un paso de confirmación serológica en la técnica (microscopía inmunoelectrónica o inmunoelectrónica de fase sólida) (Liebler *et al.*, 1992), que requiere una elevada inversión en equipamiento, de ahí que en la actualidad su uso se limite a situaciones de elevada carga viral o casos de diarrea provocada por agentes infecciosos desconocidos (Cho y Yoon, 2014; Pang y Lee, 2015).

Técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas pueden ser indirectas o directas. Con respecto a las primeras, se han desarrollado varios métodos para detectar anticuerpos frente a varios agentes causales de la NCD, pero no resultan útiles, ya que, por un lado, pueden dar lugar a falsos positivos debido a la presencia de anticuerpos maternales o de reacciones cruzadas con otros microorganismos; y, por otro, pueden resultar en falsos negativos, dado que, en caso de exposición a alguno de estos enteropatógenos, el animal no sería capaz de desarrollar anticuerpos hasta más allá de la cuarta semana de vida (Hulbert y Moisá, 2016; Díaz *et al.*, 2019).

En lo que se refiere a las técnicas directas, destacan el ELISA de captura de antígeno y la inmunocromatografía, dos métodos muy empleados por su rapidez y sencillez. Si bien el primero suele realizarse en entornos laboratoriales, el segundo resulta muy práctico porque constituye el fundamento de los kits de diagnóstico de campo disponibles para ETEC, BRoV, BCoV y *C. parvum*. No obstante, la sensibilidad de ambos métodos tiende a ser inferior que la de las técnicas de cultivo y que la de las moleculares (Cho *et al.*, 2010). Por lo tanto, para obtener resultados fiables, es importante que las muestras sobre las que se aplican estas técnicas procedan de animales con diarrea aguda (Cho y Yoon, 2014).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otra parte, también resulta de utilidad la inmunofluorescencia directa, ya que es una técnica altamente sensible y específica que puede emplearse para un *screening* rápido de un gran número de muestras (Johnston *et al.*, 2003). Además, en el caso de algunos agentes como *Cryptosporidium* spp., se considera la técnica de elección, ya que tiene un umbral de detección mucho más bajo que el ELISA de captura de antígeno (Anusz *et al.*, 1990). Sin embargo, no está exenta de inconvenientes. En primer lugar, no permite diferenciar entre las especies y genotipos de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*, respectivamente (Chalmers y Katzer, 2013; Koehler *et al.*, 2014). Además, en el caso de los agentes víricos, su realización en fragmentos de intestino delgado puede dar lugar a falsos negativos por la pérdida *post-mortem* de las células epiteliales infectadas (Benfield *et al.*, 1984; Dar *et al.*, 1998). Finalmente, el microscopio y el inmunoconjugado necesarios para efectuarla tienen un alto coste económico, por lo que no resulta accesible como método de rutina (Díaz *et al.*, 2019).

Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares son las más utilizadas en la actualidad para el diagnóstico de la mayoría de los enteropatógenos implicados en la NCD, ya que tienen una elevada especificidad y sensibilidad y permiten obtener resultados de forma rápida (Cho y Yoon, 2014). Se basan en la amplificación de fragmentos de ADN o ARN de los distintos agentes mediante el uso de cebadores específicos; en la Tabla 10 se incluyen los principales *loci* empleados para la identificación de los enteropatógenos más importantes en la NCD. Estas técnicas son especialmente útiles para detectar virus de difícil aislamiento y bacterias de crecimiento lento. Además, en el caso de *E. coli*, su realización tras el cultivo permite identificar los factores de virulencia y, de esta manera, conocer el patotipo implicado en el brote. De forma similar, permiten identificar las especies y subtipos de *Cryptosporidium* spp. y los genotipos de *G. duodenalis*, lo que es muy útil para conocer su epidemiología y posibles rutas de infección, así como su potencial zoonósico (Smith, 2008; Plutzer y Karanis, 2009; Feng y Xiao, 2012).

Sin embargo, estas técnicas muestran varias limitaciones que repercuten negativamente en su sensibilidad. En este sentido, destaca la presencia de inhibidores de PCR en la muestra, que es habitual en las heces; así como la incapacidad para detectar el

USC DE COMPOSTELA

patógeno cuando la carga de ADN en la muestra es muy baja, o para identificar determinadas cepas víricas o bacterianas cuya secuencia no coincida con los cebadores utilizados (Cho *et al.*, 2010; Mirhashemi *et al.*, 2015).

Tabla 10. Principales *loci* empleados para la detección y caracterización de los enteropatógenos más habitualmente implicados en la NCD.

Agente etiológico	*Locus*	Referencia
***E. coli* enterotoxigénica**	Gen que codifica para subunidad fimbrial de F5 Sta	Franck *et al.* (1998)
***E. coli* enteropatógena**	Gen *eaeA*	
***E. coli* enterohemorrágica**	Gen *eaeA* Gen que codifica para la subunidad A de Stx1 Gen que codifica para la Subunidad A de Stx2	
Rotavirus	Gen que codifica para la proteína VP4 Gen que codifica para la proteína VP7	Isegawa *et al.* (1993)
Coronavirus	Gen que codifica para la proteína de la nucleocápside (Gen N)	Tsunemitsu *et al.* (1999)
Torovirus	Gen que codifica para la glicoproteína de las espículas (Gen S)	Hoet *et al.* (2002)
Norovirus y Nebovirus	Gen que codifica para la proteína ARN-dependiente ARN polimerasa (RdRp)	Smiley *et al.* (2003)
***Cryptosporidium* spp.**	Gen del ARN ribosomal 18s (Gen SSU rRNA o 18s rRNA)	Xiao *et al.* (1999)
	Gen que codifica para la proteína de la pared del ooquiste (Gen COWP)	Kato *et al.* (2003)
	Gen que codifica para la actina	Homem *et al.* (2012)
	Gen que codifica para la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp*70)	Stinear *et al.* (1996)
	Gen de la glicoproteína de 60 kDa (Gen *gp60*)[1]	Strong *et al.* (2000)

[1]Se utiliza para determinar el subtipo de *C. parvum* tras su identificación mediante la PCR y posterior secuenciación del gen 18s rRNA.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 10. Continuación.

Agente etiológico	*Locus*	Referencia
G. duodenalis	Gen que codifica para la β-giardina (*bg*)	Cacciò *et al.* (2002)
	Gen que codifica para la glutamato-dehidrogenasa (*gdh*)	Read *et al.* (2004)
	Gen que codifica para la triosa fosfato isomerasa (*tpi*)	Sulaiman *et al.* (2003)
	Gen del ARN ribosomal 18s (Gen SSU rRNA o 18s rRNA)	Read *et al.* (2002)

1.4.6. Prevención y control

Como se ha desarrollado previamente, la NCD es una enfermedad multifactorial en la que no se observan demasiadas diferencias en sus signos clínicos en función de los agentes etiológicos implicados, dando lugar a una deshidratación progresiva, pérdida de electrolitos y acidosis metabólica que pueden ser fatales. En este sentido, existen pautas generales para su tratamiento, prevención y control, válidas para todas las etiologías. Sin embargo, el diagnóstico de los agentes causales implicados resulta determinante para el establecimiento de las medidas específicas más adecuadas en cada caso.

1.4.6.1. Tratamiento

1.4.6.1.1. Tratamiento sintomático

Cuando nos enfrentamos a un caso de NCD, antes de conocer su etiología, tras el examen físico y la toma de muestras es importante aplicar un tratamiento sintomático que mejore el estado general y los signos clínicos del ternero afectado. Para ello, en primer lugar, se ha de rehidratar al animal y administrarle fármacos que permitan reducir su dolor abdominal. Posteriormente, cuando ya se haya dilucidado el componente etiológico del proceso, se puede acudir a la antibioterapia, en caso de que tenga un origen bacteriano, y a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

otros tratamientos específicos existentes frente a algunos de los enteropatógenos que pueden estar implicados (Rico Fernández, 2020).

Rehidratación

La rehidratación es clave para reducir la mortalidad provocada por NCD pues permite corregir el estado de deshidratación del animal y los desequilibrios electrolíticos y ácido-base, además de proporcionar soporte nutricional y terapia de mantenimiento (Smith y Berchtold, 2014). La cantidad de fluidos que el animal necesita y su vía de administración dependen del grado inicial de deshidratación y de la estimación de las pérdidas continuas que ocurren durante el tratamiento, así como de los requisitos de mantenimiento, dada la mínima ingesta de agua, electrolitos y nutrientes durante la convalecencia del ternero. Además, para reducir la acidosis metabólica del animal, la brecha aniónica (SID) del tratamiento, que es la relación entre los cationes y aniones primarios que aporta, ha de ser como mínimo de entre 60 y 80 mEq/L (Constable *et al.*, 2005). En relación a las vías de administración, la rehidratación oral es el tratamiento preferido por los ganaderos por ser una forma sencilla y barata de administrar grandes cantidades de fluido al animal. Sin embargo, en aquellos individuos con un grado de deshidratación superior al 8%, que no son capaces de mantenerse en pie y tienen un reflejo de succión muy débil, es preciso recurrir a la fluidoterapia intravenosa (Lorenz *et al.*, 2011; Trefz *et al.*, 2012b).

Por otra parte, algunos expertos recomiendan el cese de la administración de leche mientras los animales muestren diarrea, sugiriendo que la empeora al aportar nutrientes que no se absorben debido al síndrome de maladigestión y malabsorción y que podrían derivar en una diarrea osmótica; además, ciertas bacterias podrían utilizar los nutrientes no absorbidos como fuente de energía causando una disbiosis intestinal que agrave el proceso (Smith, 2009). Sin embargo, con carácter general, es preferible que los terneros reciban tomas del leche del mismo volumen que los individuos sanos, acompañadas de soluciones electrolíticas a lo largo del tratamiento (Constable, 2009; Smith, 2009); privar de la leche al animal causa pérdida de peso, ya que ni las soluciones hipertónicas con altas concentraciones de glucosa son capaces de aportarle la energía suficiente para cubrir sus necesidades de mantenimiento y crecimiento (Garthwaite *et al.*, 1994; Constable *et al.*, 2001).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a) <u>Rehidratación oral</u>

Existen numerosas soluciones para rehidratar oralmente al ternero, siendo muy importante elegir la más adecuada en función del estado del animal (Pfortmueller *et al.*, 2018). Sin embargo, todas ellas deben cumplir ciertas características. En primer lugar, ha de contener suficiente sodio para normalizar el volumen de fluido extracelular, recomendándose concentraciones de entre 90 y 30 mmol/L (Smith, 2009); además, también debe contener agentes que favorezcan su absorción, como la glucosa, los aminoácidos neutros, como la glicina, la alanina o la glutamina y los ácidos grasos volátiles, como el acetato o el propionato (Demigné *et al.*, 1983). Asimismo, también debe compensar las pérdidas de potasio y permitir la restitución de las pérdidas de cloro, aconsejándose productos que contengan concentraciones de potasio de entre 10 y 30 mmol/L y de cloro de entre 40 y 80 mEq/L (Smith, 2009). Otro elemento a tener en cuenta a la hora de escoger una solución de rehidratación es su contenido en glucosa, que constituye una fuente energética y determina en gran medida la osmolaridad de la solución. En la actualidad se comercializan soluciones hipotónicas (<275 mOsm/kg), isotónicas (275-295 mOsm/kg) e hipertónicas (>295 mOsm/kg) (Constable, 2003). En principio, sería preferible el uso de una solución hipertónica por su mayor soporte nutricional, pero su alto contenido en glucosa puede incrementar el riesgo de padecer una diarrea osmótica si no se absorbe (Nouri y Constable, 2006). Por lo tanto, su empleo se limita a aquellos animales a los que se les restringe el consumo de leche. Cuando el animal sigue mamando o ingiriendo lactorreemplazante y mantiene un buen apetito es más apropiado la administración de soluciones isotónicas, no debiéndose emplear soluciones hipotónicas por su insuficiente contenido energético (Smith, 2009). El último requisito que debe cumplir una buena solución de rehidratación es contener agentes alcalinizantes, ya que, como se ha comentado previamente, una de las principales funciones de la rehidratación es corregir la acidosis metabólica. De entre ellos, los más relevantes son el bicarbonato, el propionato y el acetato. Los dos últimos son los más empleados en la actualidad, ya que tienen ciertas ventajas con respecto al bicarbonato al facilitar la absorción de sodio, aportar energía y, sobre todo, no interferir en la formación del coágulo lácteo, haciendo posible su administración conjunta con leche o lactorreemplazante (Demigné *et al.*, 1981; Naylor y Forsyth, 1986; Naylor, 1992).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, una vez elegida la solución a emplear, también reviste relevancia su forma de administración. En general, se deberían de administrar en tomas separadas de las de leche (Smith, 2009). Sin embargo, las soluciones isotónicas que contienen acetato o concentraciones muy bajas de bicarbonato se pueden suministrar directamente preparadas en leche o lactoreemplazante, convirtiéndose en hipertónicas y siendo más efectivas en el tratamiento de la deshidratación y la acidosis (Constable *et al.*, 2005; Bachmann *et al.*, 2009).

b) <u>Rehidratación intravenosa</u>

Los principios básicos de la rehidratación intravenosa coinciden con los ya expuestos para la rehidratación oral. Dos de las soluciones más conocidas son el Ringer Lactato y el Ringer Acetato, que si bien son adecuadas para tratar la deshidratación y los desequilibrios electrolíticos, tienen poca capacidad alcalinizante, por lo que no se recomienda su uso en terneros muy acidémicos (Kasari y Naylor, 1985c; Constable, 2003; Taylor *et al.*, 2017). En estos animales se recomienda emplear bicarbonato de sodio y, de entre las soluciones que lo contienen, las hipertónicas son especialmente efectivas en caso de diarrea aguda, acidosis D-láctica o acidosis metabólica y respiratoria (Bleul *et al.*, 2007; Koch y Kaske, 2008; Coskun *et al.*, 2010; Constable *et al.*, 2021). Otra solución que se puede emplear es el salino hipertónico, que permite expandir el volumen plasmático rápidamente en un ternero intensamente deshidratado. Además, si se combina con la administración de soluciones electrolíticas orales, puede ser tan efectivo como el Ringer Lactato con la ventaja de que es mucho más económico (Walker *et al.*, 1998). Finalmente, la dextrosa es el único fluido no alcalinizante que se usa habitualmente en casos de NCD. Con carácter general, se emplea al 5-10% en combinación con los fluidos previamente mencionados para contrarrestar el balance energético negativo de los terneros afectados (Tsukano *et al.*, 2017).

Analgésicos y antiinflamatorios

La NCD puede acompañarse de cólicos intestinales y dolor abdominal, por lo que los terneros afectados pueden beneficiarse del uso de tratamientos analgésicos. En este sentido, destacan los antiinflamatorios no esteroideos, cuya administración se recomienda como parte del tratamiento inicial de terneros con diarrea que presenten enfermedad sistémica, ya que reduce el grado de inflamación del tracto gastrointestinal y palia los efectos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de una posible septicemia o endotoxemia concomitante. Así, se ha demostrado que la utilización de meloxicam en conjunción con la rehidratación oral tiene un mayor efecto positivo sobre la ingesta de leche, el grado de hidratación, la consistencia de las heces, los signos de dolor abdominal y la ganancia de peso que la fluidoterapia por sí sola (Philipp *et al.*, 2003; Todd *et al.*, 2010). Por su parte, la administración de flunixin meglumine ha resultado eficaz en animales con diarrea sanguinolenta, si bien no se ha observado ningún efecto en aquellos en los que no aparece sangre en las heces (Barnett *et al.*, 2003).

Empleo de probióticos

La diarrea neonatal se ha asociado frecuentemente con un incremento de los recuentos de coliformes en el intestino y un descenso de *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* (Sandine, 1979; Ouwehand *et al.*, 2002; Krehbiel *et al.*, 2003). Por ello, en las primeras semanas de vida del ternero, algunos autores recomiendan el uso de probióticos que contengan bacterias lácticas, como *Lactobacillus rhamnosus* GG (Ewaschuk *et al.*, 2004) o *Lactobacillus acidophilus* (Cruywagen *et al.*, 1996). En este sentido, varios estudios han demostrado que, si se emplean de forma preventiva, pueden reducir la incidencia de la diarrea y mejorar la ganancia media diaria de peso (Timmerman *et al.*, 2005; Signorini *et al.*, 2012), mientras que en otros no se ha observado ningún efecto (Harp *et al.*, 1996; Ewaschuk *et al.*, 2004). Además, todavía no existen evidencias que apoyen su uso como terapia de soporte en la diarrea neonatal (Constable, 2009), por lo que se necesitan más estudios para comprobar si realmente tienen algún efecto positivo en la prevención, control y/o tratamiento de este proceso.

1.4.6.1.2. Tratamientos específicos

Antibioterapia

En contraste con la unanimidad acerca del empleo de la fluidoterapia en el tratamiento de la diarrea neonatal, existe una mayor controversia en cuanto al uso de antibióticos. Algunos autores no recomiendan su empleo, aduciendo que muchos de los enteropatógenos diarreagénicos no son bacterianos, por lo que la antibioterapia no sería efectiva en la resolución del proceso. Además, se ha constatado que alteran la microbiota

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

intestinal del animal y agravan la diarrea, tal y como se ha observado con la administración de determinados antimicrobianos, como el cloranfenicol, la penicilina y la neomicina (Shull y Frederick, 1978; Holland *et al.*, 1986; Rollin *et al.*, 1986). Sin embargo, una de las principales desventajas de la administración de antibióticos a terneros con diarrea neonatal reside en que el uso excesivo o inadecuado de la antibioterapia es una de las principales causas de aparición y diseminación de resistencias antimicrobianas (Grove-White, 2004).

No obstante, en numerosas ocasiones e independientemente de la etiología de la NCD, los animales afectados presentan un sobrecrecimiento de coliformes en el intestino delgado que causan lesiones y alteraciones de la eficiencia digestiva junto con una mayor susceptibilidad a padecer una bacteriemia (Constable, 2004); este hecho es más probable en terneros menores de cinco días de edad y en aquellos que no han recibido una adecuada transferencia pasiva de inmunoglobulinas (Fecteau *et al.*, 1997; Lofstedt *et al.*, 1999). Por ello, en animales con signos clínicos graves, como la disminución del reflejo de succión, debilidad, incapacidad para mantenerse en pie o depresión, o que presenten sangre o mucosidad en las heces, estaría recomendado el uso de antibióticos para prevenir o tratar una posible bacteriemia por *E. coli* (Constable, 2004, 2009). Por el contrario, en animales con diarrea leve o moderada, los tratamientos antimicrobianos pueden ser contraproducentes e incrementar la intensidad de la diarrea, ya que pueden reducir la capacidad de la flora normal para evitar la colonización intestinal por parte de los agentes causales o inducir un sobrecrecimiento de microorganismos potencialmente patógenos (Wagner *et al.*, 2008; Berge *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta todo lo comentado, resulta lógico que el empleo de la antibioterapia deba basarse en el estudio de la susceptibilidad bacteriana a los agentes antibióticos, lo que habitualmente se realiza a partir de muestras de heces (Constable, 2009; Smith, 2015b). No obstante, es preciso reseñar que la flora bacteriana detectada en este tipo de muestras no siempre es representativa de la población bacteriana del intestino delgado y que la cepa de *E. coli* predominante en las deyecciones de un ternero diarreico puede cambiar varias veces durante el proceso de la enfermedad (Smith, 2015b).

Una vez que se ha decidido administrar antimicrobianos a los animales con NCD, el éxito del tratamiento viene determinado por varios elementos: el índice de mortalidad, el

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

índice de crecimiento en los animales que sobreviven, y la gravedad y duración de la diarrea en ellos (Constable, 2004). En este sentido, la eficacia de la terapia puede variar en función de la vía de administración (Palmer *et al.*, 1983) recomendándose, siempre tras el estudio de la susceptibilidad bacteriana, la aplicación de un antimicrobiano bactericida y de espectro Gram negativo vía parenteral. Además, este producto debería excretarse en forma activa en la bilis para tener un efecto antimicrobiano local en el intestino delgado (Constable, 2004). En el caso de los antimicrobianos orales, su efectividad varía con su presentación. Así, si se administran disueltos en leche, en soluciones electrolíticas orales o en agua se activa la gotera esofágica, evitando así el paso por el rumen, que causa un retraso en la absorción y una reducción en la concentración plasmática de los antibióticos que se aplican en forma de bolo o comprimido (Thompson y Black, 1978; Constable, 2004).

Finalmente, y teniendo en cuenta que, en todo caso, la selección del compuesto a administrar debe apoyarse en la realización de un antibiograma, los antibióticos de elección para el tratamiento de la diarrea neonatal en animales con enfermedad sistémica incluyen las aminopenicilinas, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, el trimetoprim-sulfametoxazol, las tetraciclinas y, en algunos casos, las fluoroquinolonas (Constable, 2009; Peek *et al.*, 2018). No obstante, la Agencia Europea del Medicamento aboga por limitar su uso a aquellas situaciones en que no existen otras alternativas terapéuticas, ya que facilita la aparición de bacterias patógenas multirresistentes (Agencia Europea del Medicamento, 2019).

a) <u>Resistencias antimicrobianas</u>

Numerosos estudios han permitido detectar cepas multirresistentes de *E. coli* en las heces de terneros, con una especial incidencia en aquellos que padecen problemas de diarrea (Orden *et al.*, 2000; Gunn *et al.*, 2003; Donaldson *et al.*, 2006; Güler *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2009; Berge *et al.*, 2010; De Verdier *et al.*, 2012; Shahrani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2017; Umpiérrez *et al.*, 2017; Cengiz y Adigüzel, 2020; Feuerstein *et al.*, 2022; Jia *et al.*, 2022). Su prevalencia aumenta principalmente por la administración de antibióticos a los animales, si bien en algunos casos este incremento sólo se ha observado de forma transitoria (Berge *et al.*, 2006; Chantziaras *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014; Jarrige *et al.*, 2020). Sin embargo, otros factores no directamente relacionados con el uso de antibióticos también

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

influyen en la aparición de cepas resistentes. En este sentido, la edad del animal juega un papel importante, predominando los *clusters* resistentes en los animales de entre 2 y 4 semanas de edad por el desarrollo insuficiente de su microbiota (Berge *et al.*, 2005, 2010; Oikonomou *et al.*, 2013). Para conocer el espectro de antibióticos frente a los que se han desarrollado resistencias y su evolución en el tiempo, resulta muy útil la realización de estudios de resistencias, cuyos resultados permiten optimizar la selección de los antibióticos a administrar ante un brote.

La detección de las resistencias asociadas a *E. coli* y otros agentes bacterianos puede hacerse de diversas formas. El método más utilizado en la actualidad es la determinación fenotípica de los patrones de resistencia, que consiste en exponer al agente bacteriano a antibióticos representantes de las distintas familias empleadas en terapéutica para conocer frente a cuáles es resistente; los resultados permiten predecir la respuesta a la acción de un determinado antibiótico a nivel de campo, incluso aunque ese en concreto no haya sido incluido en el análisis (Livermore *et al.*, 2001). Esta técnica también resulta útil para deducir los mecanismos de resistencia presentes en el agente bacteriano en cuestión (Cantón, 2010), pero no permite conocerlos con exactitud, lo que supone un problema dado que se pueden diseminar a otras bacterias. Además, algunos mecanismos genéticos de resistencia son difíciles de detectar mediante las técnicas fenotípicas y pueden dar lugar a fallos de tratamiento a nivel de campo (Anjum *et al.*, 2017). Por todo ello, se han desarrollado técnicas de caracterización molecular de los mecanismos de resistencia antibiótica (Anjum *et al.*, 2017). Sin embargo, dada la gran diversidad de genes potencialmente implicados en las resistencias, no resulta sencillo identificarlos todos en función de su secuencia, fundamentalmente debido a que se están descubriendo continuamente nuevos genes o variantes alélicas de los ya conocidos (Anjum *et al.*, 2017). Además, la presencia de un determinante de resistencia no implica su expresión, y por tanto, la manifestación fenotípica de la resistencia a nivel de campo (Cantón, 2010). Por lo tanto, a la hora de conocer la susceptibilidad de una cepa a un antibiótico, el uso de las técnicas moleculares todavía no es excluyente de la determinación fenotípica.

En esta revisión se analizarán los principales mecanismos de resistencia presentes en los *E. coli* de terneros con NCD en función de las principales familias antibióticas utilizadas para su tratamiento. La resistencia a los beta-lactámicos como las penicilinas o

cefalosporinas, muy empleadas para el tratamiento de la NCD (Constable, 2009; Peek *et al.*, 2018), puede ser la consecuencia de la disminución de la permeabilidad de la membrana externa bacteriana, la alteración de la diana celular o la existencia de bombas de expulsión activa; sin embargo, el mecanismo más importante es la producción de enzimas, en concreto betalactamasas (Navarro *et al.*, 2010). La producción de unas u otras da lugar a distintos patrones de resistencia que se resumen en la Tabla 11.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 11. Patrones de resistencia a betalactámicos de *E. coli* en función de la beta-lactamasa producida. Adaptado de Navarro *et al.* (2010)**.**

Fenotipo de resistencia adquirida	Betalactamasas producidas	AMP	AMC	TIC	PIP	C1ª	FOX	CXM	C3ª	C4ª	CARB
Producción de penicilinasas	TEM-1, TEM2, SHV-1	R	S	R	r	S/r	S	S	S	S	S
Hiperproducción de penicilinasas	TEM-1, TEM2, SHV-1	R	r	R	R	R	S	S	S	S	S
Producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	Enzimas derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1; enzimas de la familia CTX-M	R	S/R	R	R	R	S	R	S/R	S/R	S
Producción de betalactamasas resistentes a los inhibidores	Enzimas derivadas de TEM-1, TEM-2 y, en menor medida, SHV-1	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
Hiperproducción de betalactamasa cromosómica de clase C y AmpC plasmídicas	Betalactamasa cromosómica no inducible de clase C; betalactamasas AmpC plasmídicas	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S
Producción de betalactamasas activas frente a carbapenémicos	Carbapenemasas de clase A, clase B y/o clase D	R	R	R	R	R	R	R	r	r	r

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; TIC: ticarcilina; PIP: piperacilina; C1ª: cefalosporinas de primera generación; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; C3ª: cefalosporinas de tercera generación; C4ª: cefalosporinas de cuarta generación; CARB: carbapenémicos; S: sensible; r: halos reducidos o concentración mínima inhibitoria elevada pero dentro del rango de sensibilidad; R: resistente

Otra familia antibiótica frecuentemente empleada para el tratamiento de la NCD es la de las fluoroquinolonas, que incluye antibióticos como el enrofloxacino o el marbofloxacino. La resistencia a estos compuestos suele ser la consecuencia de mutaciones en los genes que codifican para la ADN girasa y la ADN topoisomerasa IV, que son las enzimas diana de estos compuestos, reduciendo la capacidad de las quinolonas para unirse a ellas e inhibir su actividad (Hopkins *et al.,* 2005; Hooper y Jacoby, 2015). Las mutaciones en estas enzimas suelen producirse en las regiones denominadas QRDR (región determinante de la resistencia a las quinolonas) y están ligadas a un incremento en la concentración mínima inhibitoria de todos los compuestos de esta familia. En efecto, la aparición de alguna de estas mutaciones implica que posteriormente se van a ir desarrollando más en esa o en otra QRDR, por lo que ante una resistencia a alguna fluoroquinolona deberíamos considerar resistencia a todas ellas (Navarro *et al.*, 2010). Además de los mecanismos de resistencia cromosómicos, también se ha descrito la adquisición de plásmidos específicos de resistencia a las quinolonas (resistencia las quinolonas mediada por plásmidos o PMQR). Estos plásmidos contienen genes que codifican para diversos mecanismos de resistencia, incluyendo proteínas Qnr, que protegen a las enzimas diana de la bacteria de la acción del antibiótico; la enzima AAC(6′)-Ib-cr acetiltransferasa, que modifica la estructura de ciertas quinolonas, y las bombas de expulsión activa (Hooper y Jacoby, 2015; Poirel *et al.*, 2018).

La resistencia a los aminoglucósidos, a la que pertenecen compuestos tan habituales a nivel de campo como la neomicina o la gentamicina, se corresponde con varios mecanismos de modificación de los puntos diana del fármaco, disminución de la permeabilidad celular o eliminación del antibiótico de la célula a través de bombas de expulsión activas; sin embargo, lo más frecuente es que se deba a la inactivación enzimática del fármaco, que consiste en la producción de enzimas capaces de modificar la estructura molecular de los aminoglucósidos de forma que no puedan alcanzar o unirse a su punto diana en la bacteria (Ramirez y Tolmasky, 2010). En la actualidad, se conocen tres tipos de enzimas capaces de inactivar a los aminoglucósidos: las acetiltransferasas, las nucleotidiltransferasas y las fosfotransferasas. En los *E. coli* de origen humano y animal son especialmente frecuentes las acetiltransferasas AAC(3)-II/IV y AAC(6')-Ib, las nucleotidiltransferasas ANT(2″) y ANT(3″) y las fosfotransferasas APH(6)-Ia, APH(6)-Id y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

APH (3')-I/II (Poirel *et al.*, 2018). El patrón de resistencia fenotípico asociado a cada una de estas enzimas se indica en la Tabla 12.

Tabla 12. **Patrones de resistencia a aminoglucósidos de *E. coli* en función de la enzima producida.** Adaptado de Livermore *et al.*, (2001), Navarro *et al.*, (2010) y Ramirez y Tolmasky, (2010).

Enzima	GEN	NET	TOB	AMK	KAN	NEO	Observaciones
AAC(3)-II	R	R	R	S	R	S	Más resistente a GEN que a TOB, resistencia moderada a KAN y NET.
AAC(3)-IV	R	R	R	S	R	R	Resistente también a apramicina.
AAC(6')	S/r	R	R	R	R	R	
ANT(2″)	R	S	R	S	R	S	
ANT(3″)	-	-	-	-	-	-	Resistente a estreptomicina y espectinomicina.
APH(6)-Ia/Id	-	-	-	-	-	-	Resistente a estreptomicina.
APH(3')-I/II	S	S	S	S	R	R	

GEN: gentamicina; NET: netilmicina; TOB: tobramicina; AMK: amicacina; KAN: kanamicina; NEO: neomicina; S: sensible; r: halos reducidos o concentración mínima inhibitoria elevada pero dentro del rango de sensibilidad; R: resistente.

La resistencia a las tetraciclinas es el resultado de la adquisición de genes que activan dos tipos principales de mecanismos: el más frecuente es la expulsión del compuesto de la célula a través de las bombas de expulsión activa, aunque también se han descrito proteínas de protección ribosómica que se unen a las regiones diana de las tetraciclinas en los ribosomas, impidiendo que el antibiótico pueda acceder a ellos (Nguyen *et al.*, 2014). En cuanto a su presencia en *E. coli*, en las diversas cepas de esta especie bacteriana se han identificado nueve genes *tet* que codifican para la producción de bombas de expulsión activa (*tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G), *tet*(J), *tet*(L) y *tet*(Y)), siendo *tet*(A) y *tet*(B) los más frecuentes; y dos que codifican para la síntesis de las proteínas de protección ribosómica (*tet*(M) and *tet*(W)). Además, en algunos aislados, se ha detectado la presencia de un tercer mecanismo de resistencia que consiste en la producción de una oxidorreductasa que inactiva las tetraciclinas, codificada por el gen *tet*(X) (Poirel *et al.*, 2018). Una misma cepa puede tener más de uno de estos mecanismos de resistencia; de hecho, se ha detectado la presencia de más de un gen *tet* en un solo aislado, lo que puede deberse a su adquisición a través de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

plásmidos u otros elementos genéticos móviles que, en ocasiones, también contienen genes de resistencia frente a otras familias de antibióticos (Poirel *et al.*, 2018).

Las sulfonamidas suelen administrarse en combinación con el trimeptoprim para el tratamiento de la NCD, denominándose sulfonamidas potenciadas por el efecto sinérgico de ambos compuestos. La resistencia a las sulfonamidas potenciadas puede deberse a dos tipos de mecanismos: la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las enzimas diana de estos compuestos (dihidropteroato sintasas para las sulfonamidas y dihidrofolato reductasas para el trimetoprim) y la adquisición de los genes *sul* y *dfr*, que codifican para la producción de dihidropteroato sintasas y dihidrofolato reductasas resistentes a las sulfonamidas y al trimetoprim, respectivamente, de forma que estas enzimas sustituyen a las sensibles (Poirel *et al.*, 2018; Van Duijkeren *et al.*, 2018).

Antiprotozoarios

a) *Cryptosporidium* spp.

En la actualidad, existen muy pocos fármacos comercializados con actividad frente a *Cryptosporidium* spp. Además, aquellos que están disponibles no son muy efectivos y, en la mayoría de los casos, sólo reducen la duración de la diarrea y del período de excreción de ooquistes, por lo que se emplean fundamentalmente de forma preventiva (Thomson *et al.*, 2017).

El lactato de halofuginona es uno de los pocos fármacos autorizados para el tratamiento específico y prevención de la criptosporidiosis. Se trata de un coccidiostático que se administra por vía oral y cuyo mecanismo de acción no se conoce completamente, si bien se ha sugerido que afecta a varios procesos celulares reduciendo la viabilidad de las fases de merozoíto y esporozoíto (Naciri *et al.*, 1993; Keller *et al.*, 2012). El tratamiento consiste en administrar 100 μg de halofuginona por kg peso vivo, una vez al día durante 7 días consecutivos, siempre tras la ingesta de calostro, leche o lactorreemplazante. Este fármaco puede emplearse de forma metafiláctica en explotaciones con antecedentes de criptosporidiosis, iniciándose la pauta en las primeras 24-48 horas de vida del ternero; o de forma terapéutica, comenzando su administración en las 24 horas posteriores a la aparición de la diarrea (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2020a). El

tratamiento con halofuginona no previene o cura la enfermedad por completo, pero se ha descrito que puede retrasar la aparición de la diarrea y reducir la intensidad de la excreción de ooquistes, disminuyendo por tanto la contaminación ambiental con el parásito y el riesgo de que otros animales se infecten (Lefay *et al.*, 2001; Jarvie *et al.*, 2005; Trotz-Williams *et al.*, 2011).

Algunos antibióticos han demostrado su eficacia frente a la criptosporidiosis. Uno de ellos es la paromomicina, un aminoglucósido con efecto criptosporidiostático que ha demostrado su utilidad como tratamiento preventivo (Fayer y Ellis, 1993; Grinberg *et al.*, 2002). Se administra por vía oral a una dosis de 35.000 UI de paromomicina por kg de peso vivo durante 7 días consecutivos. No se recomienda su uso en animales menores de tres días de edad y, una vez que se deja de administrar, se vuelve a producir la diarrea y la eliminación del parásito, por lo que se recomienda su empleo a partir de los 5 días de edad para cubrir el período de mayor incidencia de la criptosporidiosis (Grinberg *et al.*, 2002; Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2022).

Finalmente, se han hecho numerosos estudios para verificar la eficacia de otros fármacos frente a la criptosporidiosis. Entre ellos, el decoquinato ha resultado poco eficaz frente a esta parasitosis, ya que administrado por vía oral entre los 7 y 14 días de edad o a partir del nacimiento no tiene ningún efecto sobre la excreción de ooquistes, la consistencia fecal y el grado de deshidratación de los animales afectados (Lallemond *et al.*, 2006). En contraste, el lasalocid, un ionóforo que se administra por vía oral, puede funcionar como un tratamiento efectivo frente a la criptosporidiosis, si bien se ha de tener cuidado con su dosificación, ya que dosis de tan sólo 5 mg por kg de peso vivo pueden tener efectos letales en terneros, motivo por el cual no se debe usar en animales tan jóvenes (Agencia Europea del Medicamento, 2005; Murakoshi *et al.*, 2014).

b) *Giardia duodenalis*

El tratamiento específico frente a *G. duodenalis* se basa en el uso de bencimidazoles, destacando el fenbendazol y el albendazol. Se administran por vía oral a una dosis de 50 mg por kg de peso vivo durante tres días consecutivos y reducen significativamente la excreción de quistes en las heces (Xiao *et al.*, 1996; O'Handley *et al.*, 1997, 2000; Geurden *et al.*, 2006c). Además, en algunos estudios se ha observado que el empleo de estos fármacos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

resulta en un incremento de la ganancia diaria de peso (Geurden *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de su elevada eficacia, se elimina rápidamente por lo que, una vez se retira el tratamiento, es habitual que se produzcan reinfecciones si los terneros no se separan de las fuentes ambientales de infección (Xiao *et al.*, 1996).

Al igual que en el caso de *Cryptosporidium* spp., también se han realizado estudios para comprobar la eficacia de otros fármacos frente a la giardiosis. En este sentido, la paromomicina, que se administra en el agua de bebida, ha demostrado una eficacia comparable al fenbendazol en condiciones experimentales (Geurden *et al.*, 2006b); o el secnidazol, un nitroimidazol que ha dado buenos resultados frente al parásito en estudios preliminares y tiene la ventaja de que se administra en una sola dosis, pero no está autorizado en España (Volpato *et al.*, 2018).

c) *Eimeria* spp.

De cara a establecer un tratamiento frente a *Eimeria* spp., debemos tener en cuenta que los fármacos específicos frente a los coccidios se pueden clasificar en función de su mecanismo de acción frente al parásito. Por un lado, los coccidiostáticos detienen o ralentizan el desarrollo del parásito en determinadas etapas de su ciclo biológico, mientras que los coccidicidas dañan irreversiblemente al protozoo en una o varias fases de su ciclo (Bangoura y Bardsley, 2020). Algunos compuestos funcionan como coccidiostáticos o coccidicidas en función de la dosis administrada o la duración del tratamiento (Bangoura y Daugschies, 2020).

Las sulfonamidas fueron los primeros anticoccidianos que se emplearon en el tratamiento de la coccidiosis bovina. Se administran en el agua de bebida durante unos 5-7 días y son coccidiostáticos a dosis bajas y coccidicidas a dosis altas (Taylor *et al.*, 2016). Sin embargo, su empleo durante varios días sólo resulta en una cierta reducción de la excreción de ooquistes y de los signos clínicos (Svensson y Olofsson, 1996; Svensson, 1998). Además, existen estudios que señalan que poseen una efectividad limitada y únicamente sobre las fases asexuales del parásito, o incluso que no son eficaces y su efecto se debe principalmente a la acción frente a otras bacterias entéricas que actúan de forma concomitante en animales con coccidiosis (Daugschies y Najdrowski, 2005; Keeton y Navarre, 2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El decoquinato es un fármaco coccidiostático que actúa únicamente sobre los esporozoítos y los merontes de primera generación, evitando el desarrollo y liberación de merozoítos y, por tanto, el posterior daño intestinal (Taylor y Bartram, 2012). Por este motivo, en terneros con riesgo de coccidiosis, debe administrarse de forma continuada en pienso a una dosis de 0,5-1 mg/Kg peso vivo durante al menos 28 días (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2021a).

De entre todos los tratamientos disponibles, los más utilizados en la actualidad son los derivados triazinónicos, destacando el toltrazurilo y el diclazurilo. Ambos compuestos se administran por vía oral en dosis única de 15 mg por kg de peso vivo el primero, y de 1 mg por kg de peso vivo el segundo (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2020b, 2021b). Son coccididas y efectivos frente a varias fases del ciclo biológico de *Eimeria* spp., reduciendo la magnitud de los signos clínicos y la intensidad y duración de la eliminación de ooquistes, dando lugar a una mejora en la ganancia diaria de peso (Hackstein *et al.*, 1995; Epe *et al.*, 2005; Mundt *et al.*, 2007; Le Sueur *et al.*, 2009; Philippe *et al.*, 2014). Cabe destacar que, mientras el toltrazurilo es eficaz frente a todas las fases del parásito y permite reducir la excreción de ooquistes por parte de los animales infectados en los primeros días tras el tratamiento, el diclazurilo es menos efectivo durante esta primera fase, pero previene la eliminación durante un período de tiempo más prolongado (Bohrmann, 1991; Mundt *et al.*, 2007; Philippe *et al.*, 2014). Con estos fármacos es fundamental determinar el momento ideal para comenzar a administrarlos; en este sentido, para programar adecuadamente su punto de inicio, se recomienda hacer una monitorización previa de la evolución de la enfermedad en varios animales y así conocer cuándo aparecen los signos clínicos (Epe *et al.*, 2005; Mundt *et al.*, 2005; Ghanem *et al.*, 2008; Enemark *et al.*, 2015). Esto permitirá estimar el momento más adecuado para administrar el fármaco de forma metafiláctica, que tiene como ventaja que permite que el animal entre en contacto con el protozoo, sin que éste pueda causarle lesiones graves, y se desarrolle una respuesta inmunitaria, de forma que el animal queda protegido frente a la reinfección (Bangoura y Bardsley, 2020). Esto es especialmente importante cuando se emplea el toltrazurilo, que al destruir todas las fases del protozoo inmediatamente tras su administración, puede impedir el desarrollo de una inmunidad específica frente a la especie de *Eimeria* spp. que ha causado el brote en la explotación. Como consecuencia de ello, se podría producir una coccidiosis subclínica tras el tratamiento con un importante impacto en la ganancia media diaria de los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

animales afectados (Philippe *et al.*, 2014). Por otra parte, el tratamiento de los animales que ya han desarrollado sintomatología clínica, en muchas ocasiones, no tiene mucho sentido por el carácter autolimitante de la enfermedad; aunque produce una cierta reducción de los signos clínicos, no suele traducirse en la desaparición inmediata de la diarrea, porque el daño intestinal ya es muy grave (Epe *et al.*, 2005; Bangoura y Daugschies, 2018).

Finalmente, es importante tener en cuenta que los coccidios pueden terminar desarrollando resistencias frente a los anticoccidianos más utilizados. En avicultura, ya se han descrito numerosas cepas de *Eimeria* spp. resistentes a anticoccidianos como consecuencia de su empleo rutinario durante largos períodos de tiempo (Blake y Tomley, 2014), mientras que, en rumiantes, ya se ha descrito la presencia de cepas de *Eimeria* spp. resistentes al toltrazurilo en ovejas (Odden *et al.*, 2018). Por lo tanto, para evitar que este tipo de problemas se agraven, el uso de los tratamientos específicos frente a cualquier agente parasitario o bacteriano debe apoyarse en un diagnóstico previo y ha de combinarse con pautas de manejo preventivas.

1.4.6.2. Otras medidas de prevención

La prevención de la diarrea neonatal se basa principalmente en minimizar la exposición al patógeno, mejorando las medidas de bioseguridad de la granja, y aumentar la inmunidad del neonato, donde cobra gran importancia asegurar un correcto encalostrado.

1.4.6.2.1. Minimizar la exposición al patógeno

Dado que los agentes implicados en la aparición de NCD se transmiten por vía fecal-oral, la reducción de la contaminación ambiental es un elemento fundamental tanto en el control como en la prevención del proceso donde, además de las rutinas de limpieza y desinfección, juegan un papel muy relevante las características de las instalaciones en las que se alojan los terneros.

Reducir la presión de infección en la zona donde se encuentran los terneros neonatos es esencial. En general, las casetas individuales que se limpian y desinfectan adecuadamente y se cambian de lugar entre terneros son el mejor sistema para limitar la acumulación y la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

transmisión de los patógenos entéricos (Frank y Kaneene, 1993; Maunsell y Donovan, 2008; Bertoni *et al.*, 2021). Las casetas han de ser preferiblemente de materiales poco porosos como fibra de vidrio, pues pueden limpiarse fácilmente con agua a presión y desinfectarse en profundidad, demostrándose una menor incidencia de diarrea en este tipo de alojamiento que en corrales grupales (Lorenz, 2006; Curtis *et al.*, 2016). En caso de emplear un manejo por grupos, evitar el hacinamiento y separar a los animales diarreicos de los sanos resulta imprescindible para reducir, en la medida de lo posible, la contaminación ambiental y las posibilidades de transmisión (Maunsell y Donovan, 2008).

El material del suelo también tiene influencia sobre la incidencia de la diarrea. Así, se ha visto que el riesgo disminuye en granjas con suelo de emparrillado, y es significativamente mayor en las que emplean paja sobre suelo o tienen un suelo de cemento (Díaz *et al.*, 2018b). No obstante, el empleo de paja como material para las camas reduce la incidencia de diarrea con respecto a otros como el serrín o el heno (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998; Al Mawly *et al.*, 2015). Además, la renovación frecuente (cada dos o tres días) de dicho material durante el tiempo que el ternero permanezca en la caseta se ha asociado de forma significativa a un menor riesgo de infección (Bendali *et al.*, 1999b; Mohammed *et al.*, 1999; Gulliksen *et al.*, 2009). Sin embargo, en referencia a esto, es necesario comentar que hay estudios que han asociado una excesiva frecuencia de cambio de la cama a un mayor riesgo de infección, dado que esta actividad implica el movimiento del personal y de equipamiento entre grupos de animales y corrales, que actúan como fómites para la expansión de los agentes patógenos (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998; Sischo *et al.*, 2000).

Por otra parte, para evitar la acumulación de los patógenos y el aumento de la contaminación ambiental, es importante que el alojamiento esté bien drenado y cuente con una buena ventilación (Bendali *et al.*, 1999b; Barrington *et al.*, 2002). Este elemento también es aplicable al área de partos, cuya higiene ambiental juega un papel determinante para evitar la transmisión de agentes patógenos a los animales neonatos. En este sentido, se recomienda el uso de parideras individuales, y el cambio de cama y la limpieza de dicha zona entre partos (Frank y Kaneene, 1993; Klein-Jöbstl *et al.*, 2014). Inmediatamente después del parto, el ternero debe trasladarse a su alojamiento individual para administrarle el calostro, reduciendo al mínimo su contacto con la madre y, por ende, la transmisión de patógenos (Cho y Yoon, 2014). También resulta fundamental limpiar y desinfectar tras cada

USC

administración los utensilios empleados para el encalostrado (cubos, sondas, tetinas, etc.) (McGuirk, 2003). Además, cuando sea posible, se recomienda utilizar el mismo cubo y tetina para el mismo ternero durante toda su lactancia (González y Astiz, 2005). Con respecto a esto, se desaconseja el uso de amamantadoras automáticas, ya que el empleo de este sistema se ha asociado a una incidencia más temprana de la diarrea y de mayor gravedad, lo que podría deberse a que el uso de la misma tetina favorece la transmisión de patógenos entre los animales del grupo (Svensson *et al.*, 2003; Medrano-Galarza *et al.*, 2018a). Además, este tipo de manejo se ha asociado a una mayor tendencia a presentar un comportamiento de succión cruzada en presencia de otros terneros, lo que también favorece la infección (Nielsen *et al.*, 2008; De Passillé *et al.*, 2011).

La realización de una adecuada limpieza y desinfección de todos los elementos mencionados debe basarse en el uso de un protocolo efectivo frente a todos los enteropatógenos, incluidas las formas más resistentes como los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. En primer lugar, es preciso recordar que para una buena desinfección se debe comenzar realizando una limpieza exhaustiva que elimine todos los restos de materia orgánica (Kahrs, 1995); a continuación, se han de emplear desinfectantes adecuados. Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. han mostrado una resistencia considerable frente la mayoría de los desinfectantes comerciales y algunos sólo son eficaces a elevadas concentraciones que resultan muy caras y/o altamente tóxicas, o requieren un período de exposición excesivamente largo o altas temperaturas para ser efectivos (Fayer, 2008). Entre los desinfectantes que resultan más eficaces frente a los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y, por ende, frente al resto de agentes causales, se encuentran el peróxido de hidrógeno, el dióxido de cloro o el amoníaco. Aunque los compuestos derivados del bromo, cloro y yodo también pueden reducir sustancialmente la capacidad infectiva de los ooquistes, para hacerlo requieren períodos de exposición muy largos o concentraciones muy elevadas, lo que limita mucho su aplicación práctica (Fayer, 2008). Finalmente, el ozono y la luz ultravioleta han demostrado una elevada efectividad para inactivar los ooquistes, pero su empleo a nivel de granja resulta muy complicado (Clancy y Hargy, 2008).

De la misma forma que la limpieza y desinfección son cruciales para mantener una baja contaminación ambiental, la higiene del personal también reviste relevancia para cortar los ciclos de transmisión de los agentes patógenos, sobre todo en las explotaciones

USC UNIVERSIDADE DE CORUÑA

intensivas. Por ello, los trabajadores deben lavarse las manos con jabón, frecuentemente y durante un tiempo suficiente, y aplicarles un desinfectante basado en alcohol. Asimismo, deben lavar con lejía la ropa de trabajo y limpiar y desinfectar sus botas con la máxima frecuencia posible (Barrington *et al.*, 2002; Boyce y Pittet, 2002).

1.4.6.2.2. Mejorar la inmunidad

Debido a que la placenta bovina no permite la transferencia de inmunoglobulinas al feto, el ternero neonato es muy susceptible a los patógenos ambientales. Por ello, un buen encalostrado es un paso muy importante en la prevención de NCD. La ingestión de calostro proporciona inmunoglobulinas maternales que los terneros absorben por pinocitosis en sus primeras 24 horas de vida. Para poder afirmar que un ternero está bien encalostrado, su concentración sérica de inmunoglobulinas ha de ser superior a 10 g/L (Furman-Fratczak *et al.*, 2011), de ahí que sea fundamental el consumo de calostro de alta calidad en tiempo y cantidad adecuados. Comenzando por la cantidad, el ternero neonato debería recibir tres o más litros de calostro en sus primeras seis horas de vida, y una cantidad similar en las doce horas siguientes (Díaz *et al.*, 2019). En cuanto a la calidad, viene determinada por su concentración de inmunoglobulinas, que ha de ser superior a 50 g de IgG/L (Vasseur *et al.*, 2009). Este parámetro no se puede determinar a simple vista, por su aspecto o el volumen de producción de la madre. En ciertas ocasiones, se pesa el calostro con el fin de evaluar de forma cualitativa su concentración de IgG, pero esta práctica no está justificada por su baja sensibilidad. Por todo ello, una correcta valoración de la calidad del calostro se basa en la medición indirecta de su contenido en IgG mediante el empleo del calostrímetro o refractómetro, considerándose adecuados valores por encima de 1050 g/L o 22%, respectivamente (Bartier *et al.*, 2015; Bartens *et al.*, 2016; Buczinski y Vandeweerd, 2016). Además de que contenga una adecuada concentración de inmunoglobulinas, también resulta interesante que el calostro proceda de vacas del mismo rebaño, ya que le aporta al ternero una inmunidad específica frente a los agentes patógenos que circulan en la explotación, y muy especialmente en aquellos casos en que se vacuna a las madres frente a los principales agentes causales de la NCD (Barrington *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2021).

USC

Por otra parte, en lo que se refiere a la administración del calostro, no se recomienda dejar que el ternero sea amamantado directamente por su madre, ya que en muchos casos

ingiere una cantidad insuficiente de calostro y de forma tardía (Beam *et al.*, 2009). Así, resulta preferible la separación del ternero de su madre y el uso de tetinas o, sobre todo, de sondas, que permiten administrar un volumen óptimo de calostro en el tiempo adecuado (Kaske *et al.*, 2005; Chigerwe *et al.*, 2008; Beam *et al.*, 2009). Además, no se recomienda mezclar el calostro procedente de varias madres, ya que puede producirse una reducción en su concentración de inmunoglobulinas, si se añaden calostros de mala calidad, e incrementar la exposición del ternero a agentes patógenos transmitidos a través del mismo (Weaver *et al.*, 2000; Godden, 2008; Beam *et al.*, 2009; Aly *et al.*, 2013).

Otro de los factores claves a considerar es la calidad microbiológica del calostro, que está condicionada por su extracción higiénica y su almacenamiento. En este sentido, la refrigeración del calostro retrasa el crecimiento de patógenos, si bien este efecto tiene una escasa duración. Si bien la concentración de inmunoglobulinas en el calostro refrigerado permanece estable durante una semana, el recuento bacteriano tan sólo se mantiene a unos niveles aceptables un máximo de dos días. Por lo tanto, los productores que empleen este método de conservación deben proceder a su administración lo más rápido posible o adicionar conservantes, que permiten que la calidad microbiológica del calostro se mantenga aceptable hasta seis días (Stewart *et al.*, 2005; Godden, 2008). Para prolongar su conservación, hasta un máximo de un año, se debe recurrir a la congelación (Godden, 2008). No obstante, el calostro sometido a este proceso debe ser de la máxima calidad, ya que provoca la pérdida de las células maternas viables que sí contiene el calostro fresco, por lo que induce un peor desarrollo de la función inmune del ternero (Costa *et al.*, 2017). Los recipientes empleados para la conservación no deben tener una capacidad superior a dos litros, ya que volúmenes más elevados retrasan el enfriamiento y favorecen la multiplicación bacteriana; y en ellos se indicará la fecha de recogida, la identificación de la madre y la calidad de su contenido (McGuirk y Collins, 2004).

Por otra parte, uno de los mejores métodos para mejorar la calidad microbiológica es la pasteurización, que puede reducir la carga bacteriana del calostro mientras su viscosidad y concentración de IgG permanecen en niveles adecuados (Elizondo-Salazar *et al.*, 2010; Donahue *et al.*, 2012). Los terneros alimentados con calostro pasteurizado presentan concentraciones séricas de IgG y valores de proteínas séricas más elevados, así como una mayor eficiencia de absorción (Johnson *et al.*, 2007; Gelsinger *et al.*, 2014) y una menor

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

incidencia de NCD diarrea neonatal (Godden *et al.*, 2012). No obstante, el calostro sometido a este tratamiento térmico ha de ser de la máxima calidad, ya que tiene como inconveniente que, en algunos casos, las elevadas temperaturas pueden provocar la desnaturalización de las IgG, reduciendo por tanto su concentración, y de otros constituyentes esenciales, como hormonas y factores del crecimiento, retrasando el crecimiento o el desarrollo gastrointestinal (Godden *et al.*, 2003).

Finalmente, cuando no hay disponibilidad suficiente de calostro o su calidad es inadecuada, en muchas granjas se tiende al uso de reemplazantes de calostro. Su efectividad es muy variable, pero con carácter general, los reemplazantes de buena calidad dan lugar a concentraciones de IgG en el suero sanguíneo del ternero suficientes para garantizar una adecuada transferencia pasiva de inmunoglobulinas, pero inferiores a las obtenidas con la administración de calostro materno (Quigley *et al.*, 2001; Hammer *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2004; Swan *et al.*, 2007; Poulsen *et al.*, 2010). Además, diversos estudios indican que carece de ciertos componentes importantes en el calostro, como inmunoglobulinas A, inmunoglobulinas M, vitaminas o factores de crecimiento (Kühne *et al.*, 2000; Drackley, 2008; Godden *et al.*, 2009).

Por otra parte, también se han de tener en cuenta otros elementos que perjudican al sistema inmunitario del ternero y que, por lo tanto, favorecen la aparición de la NCD. Como se ha comentado antes, los terneros son muy susceptibles a las condiciones ambientales inadecuadas, por lo que es importante que inmediatamente después del parto permanezcan secos, resguardados y con una temperatura ambiente superior a 15ºC, y que posteriormente no estén sometidos a temperaturas excesivamente altas, bajas o a corrientes de aire (González y Astiz, 2005; Díaz *et al.*, 2019). Asimismo, se ha de evitar el hacinamiento de los animales y realizar un buen manejo de la alimentación. En este sentido, una vez pasado el período de encalostrado de 2-3 días, se debe administrar a los terneros leche entera de vaca pasteurizada o sustitutivos lácteos. La cantidad que el animal debe ingerir depende de los objetivos de ganancia diaria de peso, pero también de la temperatura ambiental, de forma que en invierno ha de suministrársele una mayor cantidad (Heinrichs y Radostits, 2001; González y Astiz, 2005). No obstante, si se opta por el empleo de lactoreemplazantes, es muy importante prestar atención a su composición, sobre todo en lo que se refiere al aporte proteico, que deber ser de origen lácteo en al menos un 60% (Heinrichs y Radostits, 2001).

USC

También reviste trascendencia la temperatura a la que se administran, que debe oscilar entre los 38 y 40 ºC, y el modo de alimentación, siendo recomendable el uso de cubos con tetinas que permitan al ternero alimentarse desde arriba para garantizar la activación de la gotera esofágica (González y Astiz, 2005). Los terneros deben recibir diariamente un volumen de leche o lactoreemplazante que suponga entre un 10 y un 12% de su peso vivo, repartido en entre una y tres tomas (Heinrichs y Radostits, 2001; González y Astiz, 2005). Con respecto a esto, el uso de amamantadoras automáticas puede tener un efecto negativo sobre la cantidad ingerida por la competición entre los animales del grupo. Para paliar este efecto, en este tipo de sistemas se recomienda ofrecerles a los animales un menor número de tomas, pero de mayor volumen, de forma que queden saciados tras cada una de ellas, lo que también es efectivo para reducir las succiones cruzadas (Costa *et al.*, 2016). Finalmente, todos estos elementos también resultan útiles como medidas preventivas frente a otras enfermedades concurrentes en los animales neonatos, que como se ha comentado previamente, actúan como un factor predisponente para padecer NCD.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5. DIARREA NEONATAL POR CAUSAS NUTRICIONALES

Además de los agentes causales más habituales, de cara a determinar las causas que provocan la diarrea neonatal del ternero, también se han de contemplar otros elementos de variada naturaleza, de entre los que destacan las deficiencias en los alimentos administrados a los terneros o en su manejo.

a) *Ruminal drinking*

El *ruminal drinking* o acidosis ruminal del ternero lactante provoca cuadros de indigestión derivados del reflujo de la leche del abomaso al rumen, donde se acumula y fermenta. Su aparición puede explicarse por la administración de cantidades excesivas de leche por toma, o por la disfunción de la gotera esofágica, que se produce fundamentalmente por un incorrecto manejo de la leche o del lactoreemplazante, estrés o administración de agua *ad libitum*. Este proceso, que va acompañado de acidosis metabólica, puede desencadenar abomasitis y enteritis, responsables de la diarrea (González y Astiz, 2005).

b) Variaciones bruscas en la composición y/o concentración de la leche y administración de lactoreemplazantes de mala calidad

Las variaciones bruscas en la composición y/o concentración de la leche, a las cuales el sistema digestivo del ternero no está adaptado, provocan un exceso de nutrientes no digeridos en el intestino que resulta en la aparición de una diarrea osmótica. Este mismo efecto se produce tras la ingestión de lactoreemplazantes de baja digestibilidad o con una composición relativa inadecuada de nutrientes. En este sentido, es importante tener en cuenta que los terneros no digieren adecuadamente las proteínas vegetales, salvo la soja (González y Astiz, 2005; Blanchard, 2012). No obstante, en algunos animales, la administración de esta última puede dar lugar a una reacción alérgica sistémica con aparición de diarrea osmótica (Kilshaw y Sissons, 1979).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

c) Pauta inadecuada de destete

El desarrollo del rumen de los bóvidos durante la etapa lactante se basa en la administración de cantidades crecientes de alimentos sólidos a partir de los 7 días de vida (Vermunt, 1994). Si este proceso no se realiza de una forma adecuada, en el momento del destete el animal todavía no es capaz de digerir adecuadamente el pienso, lo que resulta en la aparición de una diarrea osmótica (González y Astiz, 2005).

d) Empleo de antibióticos

El uso prolongado de antibióticos como tratamiento o como componente de lactoreemplazantes medicamentosos puede causar una disrupción de la flora normal de los preestómagos y del intestino, dando lugar a una disbiosis que puede estar asociada a la diarrea (Elad *et al.*, 1998; Blanchard, 2012).

e) Deficiencia de cobre

Esta patología, más frecuente en terneros de cebo que se alimentan de pastos ricos en molibdeno (Enjalbert *et al.*, 2006), provoca un incremento de la mortalidad perinatal y signos clínicos como la pérdida del color del pelo alrededor de los ojos, retraso del crecimiento y diarrea (Suttle y Angus, 1976; Enjalbert *et al.*, 2006).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Teniendo en cuenta los antecedentes recogidos en la Revisión Bibliográfica, en esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes **objetivos**:

1º. Determinar la prevalencia de los principales enteropatógenos implicados en la diarrea neonatal en terneros menores de un mes del noroeste de España.

2º. Analizar la posible influencia de la edad del animal y la consistencia de las heces en la prevalencia de infección de cada uno de los agentes patógenos.

3º. Identificar las asociaciones más comunes entre los enteropatógenos implicados en la diarrea neonatal del ternero y analizar su relación con la edad del animal.

4º. Identificar los subtipos de *C. parvum* presentes en terneros diarreicos menores de un mes del noroeste de España, conocer su distribución por granjas e investigar su potencial zoonósico.

5º. Identificar los genotipos de *G. duodenalis* presentes en terneros menores de un mes con diarrea del noroeste de España, conocer su distribución por granjas y determinar su potencial zoonósico.

6º. Determinar, empleando un sistema automatizado de caracterización fenotípica, la susceptibilidad a cinco familias antibióticas (beta-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y trimetoprim-sulfonamidas) de las cepas de ETEC aisladas de las heces de terneros diarreicos del noroeste de España.

7º. Determinar la frecuencia de las resistencias frente a los beta-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y trimetoprim-sulfonamidas en estas cepas, así como la presencia de cepas multirresistentes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. ESTUDIO I:

PREVALENCIA E INTERACCIONES DE LOS PRINCIPALES ENTEROPATÓGENOS IMPLICADOS EN LA DIARREA NEONATAL DEL TERNERO

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La NCD es el proceso más común en terneros menores de un mes y una fuente de importantes pérdidas económicas para los ganaderos tanto de forma directa como indirecta (Gomez y Weese, 2017). Es un proceso multifactorial, por lo que la aparición de un brote en una granja no depende exclusivamente de la presencia de enteropatógenos que habitualmente se transmiten por vía fecal-oral, sino que es el resultado de la interacción entre varios factores, incluyendo aquellos que afectan al estado inmunitario del ternero o a la presión de infección (Cho y Yoon, 2014).

Se ha demostrado que numerosos agentes de naturaleza bacteriana, vírica y parasitaria están involucrados en la aparición de NCD (Cho y Yoon, 2014; Díaz *et al.*, 2019). Un elevado número de estudios sobre este proceso se centran en un único enteropatógeno; sin embargo, aquellos que analizan la presencia de múltiples agentes demuestran que la aparición de NCD es, habitualmente, el resultado de infecciones mixtas (Brunauer *et al.*, 2021), que además suelen relacionarse con brotes de mayor gravedad (Reynolds *et al.*, 1986; Cho *et al.*, 2013). Por ello, la identificación de los agentes etiológicos, así como su grado de implicación y sus interacciones es esencial para aplicar las medidas de control más apropiadas en cada caso, incluyendo los tratamientos específicos, y para evaluar su posible impacto en el ámbito de la salud pública, teniendo en cuenta que algunos enteropatógenos, como *Cryptosporidium parvum*, son zoonósicos (Xiao *et al.*, 1996; Mundt *et al.*, 2007; Thomson *et al.*, 2017).

El período de mayor riesgo de aparición del proceso abarca las cuatro primeras semanas de vida del animal (USDA, 2018). No obstante, se ha comprobado que la importancia de los patógenos implicados puede variar dependiendo de la edad, por lo que el momento concreto en el que aparecen los signos clínicos podría ayudar a reforzar la sospecha de infección por determinados agentes (Bartels *et al.*, 2010). De la misma forma, no todos los enteropatógenos que pueden estar implicados en el proceso poseen la misma patogenicidad. Si bien la gravedad de los signos clínicos no está directamente relacionada con la consistencia de las heces, es cierto que este elemento, junto con la edad del animal, podría resultar muy orientativo de cara a un diagnóstico preliminar. Por ello, establecer una

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

relación entre la presencia de cada enteropatógeno y la edad del animal y la consistencia de las heces podría resultar especialmente útil en la actuación temprana ante un brote de NCD, ya que guiaría al veterinario hacia una sospecha etiológica preliminar que, aunque debería confirmarse posteriormente en el laboratorio, le permitiría implementar unas primeras medidas de control.

En base a estos antecedentes, los objetivos planteados en este Estudio son:

1º. Determinar la prevalencia de los principales enteropatógenos implicados en la diarrea neonatal en terneros menores de un mes del noroeste de España.
2º. Analizar la posible influencia de la edad del animal y la consistencia de las heces en la prevalencia de infección de cada uno de los agentes patógenos.
3º. Identificar las asociaciones más comunes entre los enteropatógenos implicados en la diarrea neonatal del ternero y analizar su relación con la edad del animal.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Diseño del estudio y obtención de las muestras

El estudio se llevó a cabo entre 2017 y 2020 en diferentes granjas de ganado vacuno de Galicia y el occidente de Asturias, regiones eminentemente ganaderas con un censo de más de un millón de bovinos (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2020c). Antes de comenzar la toma de muestras, se calculó el tamaño muestral necesario para estimar la prevalencia aparente con un intervalo de confianza del 95% y una precisión del 95% usando la calculadora epidemiológica Epitools (https://epitools.ausvet.com.au). Teniendo en cuenta los resultados de investigaciones previas sobre terneros lactantes con diarrea realizadas en la misma área de estudio (Díaz *et al.*, 2010), se estimó que el tamaño muestral mínimo necesario era de 385 animales.

En un primer lugar, se contactó con 26 veterinarios que, en conjunto, cubrían toda la zona de estudio, para que recogiesen muestras fecales de los terneros menores de un mes con diarrea que encontrasen durante su práctica clínica. Sólo se incluyeron en el estudio muestras de animales que no hubiesen recibido un tratamiento antibiótico, aunque sí se recogieron heces de terneros tratados con lactato de halofuginona, siempre y cuando el veterinario lo indicase. Las muestras se recogieron directamente del recto del ternero empleando un bote estéril de 50 ml y un hisopo estéril con medio de transporte AMIES (Deltalab, Barcelona, España), que se almacenaron a 4ºC hasta su procesado, que tuvo lugar en las 48 horas posteriores a su llegada al laboratorio. Se elaboró un registro en el que se incluyeron los datos relacionados con cada muestra: la edad del animal, la explotación de origen y su localización. Además, cada muestra, en función de su consistencia, se clasificó como pastosa (con aspecto de pasta, pero que se adaptaba a la forma del recipiente), pastosa-acuosa (líquida con elementos sólidos) y acuosa (completamente líquida, sin elementos sólidos) (Allen *et al.*, 1994).

Mediante este método se recogieron un total de 420 muestras fecales procedentes de 222 ganaderías. La distribución por edades fue la siguiente: el 47,1% (198/420) fueron terneros menores de una semana de edad, el 29,3% (123/420) tenían entre 8 y 14 días de

USC DE COMPOSTELA

edad, el 12,6% (53/420) estaban en su tercera semana de vida y, finalmente, el 11% (46/420) se encontraban entre los días 21 y 30 de edad, siendo la edad media de 10,11 días. En cuanto a su consistencia, el 20,9% (88/420) eran pastosas, el 19,3% (81/420) pastosas-acuosas y el 59,8% (251/420) acuosas.

3.2.2. Análisis laboratorial de las muestras

3.2.2.1. Análisis bacteriológico

Primeramente, las muestras se cultivaron para detectar la presencia de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*. Para ello, en las primeras 24 horas tras su llegada al laboratorio, se utilizó la muestra recogida con el hisopo y se procedió a su siembra por aislamiento en estría empleando dos tipos de medios de cultivo diferenciales y selectivos para enterobacterias: agar MacConkey y agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) (VWR Chemicals, Leuven, Bélgica). El primero inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas porque contiene cristal violeta y sales biliares, y permite diferenciar entre las bacterias que fermentan o no la lactosa gracias al indicador de pH rojo neutro. De esta forma, las bacterias que son capaces de fermentar la lactosa, como *E. coli*, producen un color rosado al crecer, mientras que las bacterias incapaces de fermentar este compuesto se observan translúcidas o de color amarillo pálido (Atlas y Snyder, 2015). Por su parte, el XLD es un medio rojizo que vira su color en función de la capacidad de las bacterias para fermentar la xilosa, ya que contiene el indicador de pH rojo de fenol. Así, las bacterias que son capaces de fermentar ese azúcar generan un color amarillo en el medio. Además, contiene tiosulfato, que algunas bacterias como *Salmonella* spp. son capaces de fermentar para producir sulfuro de hidrógeno, lo que se plasma con la formación de colonias con centros negros (Atlas y Snyder, 2015).

Una vez efectuada la siembra, las placas se incubaron en una estufa a 37 ºC durante 24 horas en condiciones aerobias. A continuación, se procedió a su lectura, en la que se anotó una descripción de las colonias observadas en cada placa, su grado de crecimiento y su capacidad para fermentar la lactosa y la xilosa y de producir sulfuro de hidrógeno. Esto permitió identificar colonias compatibles con *Salmonella* spp. y *E. coli.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aquellas muestras donde se identificaron colonias compatibles con *E. coli* mediante cultivo se seleccionaron para su análisis molecular mediante qPCR; el estudio de cinco genes que codifican para factores de virulencia (*eae*, F5, STa, Stx1, Stx2) permitió diferenciar cuatro patotipos de *E. coli*:

- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) si amplificaban fragmentos de los genes que codifican para la fimbria F5 y la toxina Sta;
- *E. coli* enteropatógena (EPEC) si estaba presente el gen *eae*, que codifica para la adhesina intimina;
- *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC) si se detectaban fragmentos de los genes que codifican para las toxinas Stx1, Stx2 o ambas;
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) si se identificaba la presencia del gen *eae* acompañado por los genes que codifican para las toxinas Stx1, Stx2 o ambas.

Además de los cinco genes antes mencionados, se analizó la presencia de otras tres dianas moleculares que codifican para otros tres factores de virulencia: el F17, muy típico en aislados de ganado vacuno (Kolenda *et al.*, 2015), el STb y el LT. La detección de los dos últimos es habitual en las cepas de ETEC que afectan a otras especies, como el porcino, pero nunca se ha descrito su presencia en los aislados de ETEC que infectan al ganado vacuno (Gyles y Fairbrother, 2010). Además, para confirmar que los aislados compatibles eran efectivamente *E. coli* se empleó el gen que codifica para la glutamato descarboxilasa (GAD), específico de este microorganismo (McDaniels *et al.*, 1998).

Para la realización de la qPCR, primeramente se extrajo el ADN bacteriano de cada muestra siguiendo el protocolo indicado por Yamagishi *et al.* (2016); para ello, se preparó un microtubo estéril de 1,5 ml en el que se introdujeron 200 µl de buffer Tris-EDTA (TE) estéril y una estría recogida del confluente de la placa de agar MacConkey. La suspensión obtenida se agitó en el vórtex durante un minuto y se incubó 15 minutos a 100 ºC con una agitación de 300 revoluciones por minuto (rpm) en un termobloque Eppendorf ThermoMixer C (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). A continuación, la suspensión se mantuvo 15 minutos en un baño de hielo, se centrifugó cinco minutos a 13000 rpm (Hettich Mikro 20 Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemania) y se pasaron 100 µl del sobrenadante a un nuevo microtubo.

USC DE COMPOSTELA

Posteriormente se llevó a cabo la qPCR, utilizando diferentes kits comerciales del laboratorio Exopol que permiten detectar cada uno de los factores de virulencia antes citados: EXOone *E. coli* virulence factor F17, EXOone *E. coli* virulence factor Stx1, EXOone *E. coli* virulence factor Stx2, EXOone *E. coli* virulence factor F5 (K99), EXOone STa STb LT MULTIPLEX oneMIX y EXOone *E. coli* eae gene (Exopol, Zaragoza, España). Cada uno de ellos contiene los siguientes reactivos:

- Agua destilada, que funciona como control negativo;
- *Master Mix*, que incluye los cebadores, el buffer, la enzima Taq polimerasa y los desoxirribonucleótidos necesarios para que tenga lugar la PCR. Además, la *Master Mix* del kit EXOone *E. coli* eae gene incluye un control endógeno marcado con el fluorocromo VIC que permite detectar el gen GAD.
- Control sintético positivo, que contiene una secuencia diana de cada uno de los genes que codifican para los factores de virulencia antes mencionados marcada con el fluorocromo FAM.

Para analizar las muestras, se emplearon placas de qPCR de 96 pocillos (Deltalab, Barcelona, España). En cada pocillo se depositaron 15 µl de la *Master Mix* correspondiente al factor de virulencia que se pretendía detectar en cada caso y 5 µl del ADN extraído de cada muestra. Además, para cada uno de los factores de virulencia y por cada placa, se reservaron dos pocillos en los que, en lugar de añadir el ADN de la muestra, se depositaron 5 µl del control sintético positivo correspondiente y 5 µl de agua destilada, respectivamente. A continuación, las muestras se sometieron al protocolo térmico indicado en la Tabla 13, empleando un termociclador Applied Biosystems ABI Prism 7500 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Tabla 13. Protocolo para la amplificación parcial, mediante qPCR, de los genes de *E. coli* que codifican para los distintos factores de virulencia estudiados.

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	5 minutos	95ºC
42 ciclos	15 segundos	95ºC
	60 segundos	60ºC

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los resultados obtenidos se validaron e interpretaron según las instrucciones del fabricante, de forma que se consideraron positivas aquellas muestras con un ciclo umbral (Ct) inferior o igual a 38. Así, la presencia de diferentes factores de virulencia permitió identificar los patotipos de *E. coli* presentes en cada muestra. Además, en aquellas muestras que presentaban unos Ct suficientemente bajos (por debajo de 25) para los factores de virulencia constitutivos de un patotipo concreto, se procedió a intentar aislarlo. Para ello, de la placa de agar MacConkey en la que se había sembrado la muestra de heces, se seleccionaron tres colonias que se sembraron en sus respectivas placas de agar sangre. De esta forma, se obtuvo un cultivo puro de cada una que fue sometido a extracción de ADN y posterior qPCR mediante el protocolo ya indicado. A continuación, los aislados individuales que se lograron identificar como pertenecientes a un patotipo concreto se congelaron a -80ºC en crioviales de 2 ml con crioperlas de vidrio tratadas con crioprotectores, que actúan como conservante (Crioinstant, Deltalab, Barcelona, España).

En las muestras donde se detectaron colonias compatibles con *Salmonella* spp. tras cultivo en agar XLD, dichas colonias se resembraron en agar sangre (VWR Chemicals, Llinars del Vallès, España) y se confirmaron empleando una prueba comercial de suero aglutinante (*Salmonella* Antisera, PRO-LAB Diagnostics, Bromborough, Reino Unido), que se basa en la detección de los antígenos somático y Vi. Para ello, en un portaobjetos se homogeneizó una pequeña parte de la colonia con dos gotas de solución salina estéril, de forma que se obtuvieron dos suspensiones homogéneas. A continuación, se añadió una gota del antisuero a una de las gotas de la suspensión, mientras que a la otra, que se empleó como control, se le adicionó una gota de solución salina estéril. Se mezcló el antisuero con la suspensión bacteriana empleando un asa de siembra estéril y se inclinó suavemente el portaobjetos a un lado y a otro durante un minuto. Finalmente, empleando el microscopio, se observó si se había producido aglutinación, que es indicativa de la presencia de *Salmonella* spp.

3.2.2.2. Análisis virológico

En este estudio, la detección de agentes víricos realizada incluyó dos especies implicadas comúnmente en la NCD (rotavirus A y coronavirus) y tres consideradas emergentes (torovirus, norovirus y nebovirus). Para ello se emplearon técnicas moleculares,

USC UNIVERSIDADE

efectuando en primer lugar una extracción de ARN directamente sobre las muestras fecales mediante un kit comercial (RNeasy PowerMicrobiome Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez efectuada la extracción del ARN vírico, se procedió a su detección mediante una qPCR con transcripción inversa (RT-qPCR) utilizando los kits comerciales EXOone Rotavirus A oneMIX, EXOone Bovine Coronavirus oneMIX, EXOone Bovine Torovirus oneMIX, EXOone Norovirus Genotype 3 oneMIX y EXOone Nebovirus oneMIX (Exopol, Zaragoza, España). Se empleó el mismo protocolo de qPCR usado para los factores de virulencia de *E. coli*, si bien difiere el protocolo térmico debido a que en el primer paso del mismo se realiza el proceso de transcripción inversa (Tabla 14). Los resultados obtenidos se validaron e interpretaron según las instrucciones del fabricante, de forma que se consideraron positivas aquellas muestras con un Ct inferior o igual a 38.

Tabla 14. Protocolo para la replicación del ARN vírico en la qPCR.

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	15 minutos	45ºC
1 ciclo	5 minutos	95ºC
42 ciclos	15 segundos	95ºC
	60 segundos	60ºC

3.2.2.3. Análisis parasitológico

Cryptosporidium spp. y Giardia duodenalis

Para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia duodenalis*, se empleó una técnica de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales (IFAT) comercial (Aqua Glo G/C, Waterborne Inc., Nueva Orleans, EE. UU). Para incrementar la sensibilidad, primeramente se realizó una concentración difásica de las formas parasitarias empleando un protocolo con agua destilada y acetato de etilo (Díaz *et al.*, 2018a):

1. Mezclar 2 g de heces con 20 ml de agua destilada y filtrar la suspensión obtenida utilizando una malla de 40-60 μm de diámetro de poro.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. Verter el filtrado obtenido en un tubo con tapón de rosca de 15 ml y centrifugar cinco minutos a 2.000 x g (Allegra 21R, Beckman Coulter, Fullerton, California, EE.UU.).
3. Desechar el sobrenadante obtenido y añadir 8 ml de agua destilada y 2 ml de acetato de etilo (Ethyl Acetate 99.8% GLR, Labkem, Vilassar de Dalt, Barcelona, España).
4. Agitar para mezclar y centrifugar a 2.000 x g (Allegra 21R, Beckman Coulter, Fullerton, California, EE.UU.) durante 5 minutos.
5. Desechar el sobrenadante y mezclar el sedimento de cada tubo con 1 ml de agua destilada y traspasar a un microtubo de 2 ml.
6. Centrifugar la suspensión obtenida a 6.700 x g durante cuatro minutos en una centrífuga Eppendorf Minispin (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y desechar el sobrenadante hasta que solo queden 0,25 ml en cada tubo.

Para realizar la IFAT se vertieron, tras homogeneizar en vórtex, 10 µl de cada concentración de oo/quistes en un portaobjetos y se dejaron secar al aire. A continuación, se fijaron con metanol durante 5 minutos; para asegurar un contacto óptimo con el anticuerpo, se rodeó cada muestra con un rotulador de silicona (Super Pap Pen Mini, Daido Sangyo, Tokio, Japón) y se añadieron unos 45 µl de inmunoconjugado 1x. Después, los portaobjetos se incubaron en una cámara húmeda a 37 ºC durante 30 min. Al final de este período, las muestras se lavaron cuidadosamente y se dejaron secar al aire; finalmente, se añadió una gota de medio de montaje (No-Fade™ Mounting Medium, Waterborne Inc., Nueva Orleans, EE.UU.) a cada preparación y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus CX-43-RFAB, Olympus, Tokio, Japón), a 200 aumentos. Se realizó una estimación semicuantitativa de la intensidad de eliminación en función del número medio de oo/quistes observado por campo de acuerdo con la siguiente escala: 1 (pocos; <1 oo/quistes), 2 (moderada; 2-5 oo/quistes) y 3 (muchos; > 5 oo/quistes) (Avendaño *et al.*, 2019).

Análisis genotípico de Cryptosporidium spp.

Las muestras que resultaron positivas a *Cryptosporidium* spp. mediante IFAT se seleccionaron para proceder a su análisis genotípico y determinar las especies de *Cryptosporidium* presentes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En primer lugar, se procedió a la extracción del ADN parasitario presente en la muestra. Para ello se emplearon 200 µl del sedimento obtenido mediante la técnica de sedimentación difásica con agua destilada y acetato de etilo previamente descrita. Como la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* es especialmente resistente, la eficiencia del procedimiento de extracción se incrementó rompiendo mecánicamente los ooquistes empleando varios ciclos de congelación-descongelación (Díaz *et al.*, 2010). Para ello, la concentración de ooquistes se sometió a un proceso de tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido (-196°C durante un minuto) y descongelación (100°C durante siete minutos). A continuación, se procedió a la extracción del ADN de *Cryptosporidium* spp. empleando el kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGen, Valencia, California, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante.

Una vez efectuada la extracción se realizó el análisis genotípico. Para ello se llevó a cabo una PCR anidada que amplifica un fragmento del gen que codifica para la subunidad ribosomal 18s (SSU ARNr), empleando los cebadores (Tabla 15) y el protocolo previamente descritos por Xiao *et al.* (2001) y Jiang *et al.* (2005), seguida del análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) empleando tres endonucleasas (Feng *et al.*, 2007).

Tabla 15. Cebadores usados en la amplificación del gen que codifica para la subunidad ribosómica 18s de *Cryptosporidium* spp. (Xiao *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2005).

Primer	**Secuencia (5' – 3')**
18S1F	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG
18S1R	CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA
18S2F	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG
18S2R	CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A

El protocolo de PCR consistió en dos etapas independientes entre sí, incluyéndose controles positivos (*Cryptosporidium tyzzeri*) y negativos (agua destilada) en cada una de ellas. La primera PCR permite amplificar un fragmento de 1.325 pares de bases (pb), para lo que se añadieron 5 µl de ADN purificado de cada muestra a 45 µl de una mezcla compuesta de 0,2 µM de los cebadores 18S1F y 18S1R, 200 µM de cada desoxirribonucleótido (dNTP) (dNTPs MIX, NZYTech, Lisboa, Portugal), 2,5 unidades de

USC DE COMPOSTELA

Taq polimerasa (NZYTaq DNA polymerase, NZYTech, Lisboa, Portugal), 6 mM de $MgCl_2$.y tampón de la Taq polimerasa 1x. Los 50 µl de volumen final de reacción de cada muestra se introdujeron en un termociclador (T100 thermal cycler, Bio-Rad, Hércules, California, EE.UU.) para realizar la amplificación según el protocolo indicado en la Tabla 16.

Tabla 16. Protocolo de amplificación del gen que codifica para la subunidad ribosómica 18s de *Cryptosporidium* spp.

Número de ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	**Desnaturalización inicial**	94ºC	3 minutos
35 ciclos	**Desnaturalización**	94ºC	45 segundos
	Hibridación	55ºC	45 segundos
	Extensión	72ºC	60 segundos
1 ciclo	**Extensión final**	72ºC	7 minutos

La segunda etapa del protocolo tiene como propósito la amplificación de un fragmento interno de aproximadamente 840 pb. Para ello, se añadieron 5 µl del producto de la primera PCR de cada muestra a 45 µl de una mezcla de idéntica composición a la anterior salvo en el caso de los cebadores, que se sustituyeron por los 18S2F y 18S2R (Tabla 15) y del $MgCl_2$, ya que en este caso se empleó una concentración de 3 mM. La amplificación se realizó empleando el mismo termociclador y protocolo usado en la primera PCR. A continuación, los productos de PCR obtenidos se cargaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1x (Applichem GmbH, Darmstadt, Alemania) al que se añadió un sustituto de bromuro de etidio 1x (RedSafe, INTRON biotecnology, Gyeonggi, Corea del Sur). Posteriormente se realizó una electroforesis en tampón TAE 1x, usando una fuente de alimentación Power Pac Basic (BioRad, Hércules, California, EE.UU.) que se programó a 100V durante 40 minutos. Finalmente, se observaron los resultados en un analizador de imagen GelDoc Go Imaging System (Bio-Rad, Hércules, California, EE.UU.).

Aquellas muestras donde se observaron amplicones del tamaño esperado se seleccionaron para la realización de la RFLP, que permite identificar la especie de *Cryptosporidium* al comparar los tamaños de los fragmentos obtenidos con los señalados previamente en varios estudios. Primeramente, se efectuó una digestión de los productos

USC COMPOSTELA

obtenidos en la segunda reacción de PCR empleando las endonucleasas *SspI*, *VspI* y *MboII* (New England Biolabs, Massachusetts, EE.UU.). La digestión se realizó durante dos horas a 37ºC en un volumen total de 20 µl, aunque el protocolo varió en función de la cantidad de ADN obtenido en la PCR anidada (Tabla 17).

Tabla 17. Protocolo empleado para la digestión de los productos obtenidos en la segunda PCR que amplifica un fragmento del gen que codifica para la subunidad ribosómica 18s de *Cryptosporidium* spp.

	Bandas intensas	Bandas moderadas	Bandas tenues
Endonucleasas	10 U	10 U	10 U
Buffer	1x	1x	1x
Producto PCR	2 µl	10 µl	17 µl

Los fragmentos de restricción obtenidos se cargaron en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1x con un sustituto de bromuro de etidio (RedSafe, INTRON biotecnology, Gyeonggi, Corea del Sur) y, tras sumergirlos en tampón TAE 1x, se sometieron a una electroforesis a 110V durante 70 minutos. El patrón de bandas se visualizó con el GelDoc Go Imaging System (Bio-Rad, Hércules, California, EE.UU.) y, para determinar las especies y/o genotipos de *Cryptosporidium* presentes, se compararon los patrones de restricción obtenidos con los señalados en estudios previos (Tabla 18) (Feng *et al.*, 2007; Xiao y Ryan, 2008).

Tabla 18. Patrones de restricción (en pares de bases) para las especies de *Cryptosporidium* más frecuentes en ganado bovino en función de la endonucleasa utilizada.

	SspI	***VspI***	***MboII***
C. parvum	450, 267, 108, 12, 11	629, 115, 104	771, 76
C. bovis	432, 267, 103, 34	617, 115, 104	412, 185, 162, 76
C. ryanae	432, 267, 103, 34	616, 115, 104	574, 185, 76
C. andersoni	448, 397	730, 115	769, 76

Finalmente, para confirmar los resultados de la RFLP, se realizó la secuenciación de un número representativo de aislados cuyo patrón de restricción no coincidió con el de *C. parvum*. La purificación de las muestras y la determinación de la secuencia nucleotídica se

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

realizó en la Unidad de Secuenciación y Análisis de fragmentos de la Universidad de Santiago de Compostela. Los productos de amplificación se secuenciaron en ambos sentidos utilizando el BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) y se leyeron en un secuenciador automático ABI-prism 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Las secuencias obtenidas se examinaron y solaparon con el programa Chromas Pro v.1.7.5. (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia) y posteriormente se alinearon con BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.3. (Ibis Biosciences, Carlsbad, California, EE.UU.). Finalmente, la identificación de las especies presentes se realizó mediante la comparación de las secuencias de ADN obtenidas con aquellas de especies/genotipos de *Cryptosporidium* depositadas en la base de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI), usando la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Eimeria spp.

La presencia de ooquistes de *Eimeria* spp. se evidenció con la técnica de flotación modificada de McMaster que permite, además, realizar un análisis cuantitativo de la intensidad de excreción de ooquistes. Primeramente, se mezclaron 3 gramos de heces de cada muestra con 42 ml de agua y la suspensión obtenida se filtró utilizando una malla de 150 µm de diámetro de poro. El líquido filtrado se recogió en tubos de 12 ml que se centrifugaron a 380 x *g* durante 10 minutos en una centrífuga Selecta Centromix (J.P. Selecta, Abrera, España). Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el sedimento resultante se resuspendió en solución salina saturada (densidad= 1,19) con el que se llenaron las dos celdillas de la cámara de McMaster. Finalmente, se procedió al recuento mediante visualización al microscopio óptico (CH-2, Olympus, Tokio, Japón) a 100 aumentos, empleando la siguiente fórmula para estimar los ooquistes por gramo de heces (opg).

$$Ooquistes\ por\ gramo\ de\ heces\ (opg) = \left(\frac{(nº\ ooquistes\ observados) x\ 45\ ml}{0{,}30\ ml} \right) / \ 3\text{g}$$

Todas aquellas muestras que resultaron positivas mediante flotación se seleccionaron para su posterior identificación específica mediante el estudio morfométrico de los ooquistes esporulados, que se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Hendrix y Robinson

USC DE COMPOSTELA

(2022); así, las heces se depositaron en una placa de Petri y posteriormente se añadió una solución de dicromato potásico al 2,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). La mezcla se incubó a 20 ºC durante al menos 5 días, ya que en este período todas las especies de *Eimeria* que afectan al ganado vacuno suelen haber completado su esporulación (Taylor *et al.*, 2016); la mezcla se homogeneizó diariamente con una pipeta pasteur, con el objetivo de oxigenarla y permitir así la esporulación de los ooquistes. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se introdujo en tubos de 12 ml y se centrifugó a 380 x *g* (Selecta Centromix, J.P. Selecta, Abrera, España) durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se homogeneizó con solución de sacarosa de Sheather (densidad = 1,27); el tubo se rellenó con la solución de flotación hasta formar un menisco en la parte superior, donde se colocó un cubreobjetos de 18 x 18 mm; posteriormente, se centrifugó de nuevo a 380 x *g* durante 5 minutos. Por último, el cubreobjetos se depositó sobre un portaobjetos y los ooquistes se observaron al microscopio (CH-2, Olympus, Tokio, Japón) a 400 aumentos.

Para identificar las especies de *Eimeria* se tuvieron en cuenta una serie de características de los ooquistes, como su tamaño, color o presencia de diferentes estructuras siguiendo las descripciones de Taylor *et al.* (2016) y Joachim *et al.* (2018), que se recogen en la Tabla 19. Para realizar el análisis morfométrico de los ooquistes se empleó un ocular micrométrico (Olympus 19-10/100, Olympus, Tokio, Japón), que permite medir su longitud y su anchura. En este trabajo se identificaron un máximo de 100 ooquistes por muestra.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 19. Características morfométricas de los ooquistes que resultan útiles para identificar la especie de *Eimeria.* Adaptado de Taylor *et al*. (2016) y Joachim *et al*. (2018**).**

Especie	Forma	Tamaño medio (µm)	Micrópilo	Gránulo polar y/o residuos del ooquiste	Pared externa	Cuerpo residual del ooquiste	Cuerpo residual del esporocisto	Cuerpos de Stieda
E. alabamensis	Ovoide	13-24 x 11-16	No	No	Bicapa	No	Sí	Sí
E. auburnensis	Elongado u ovoide	32-46 x 20-25	Si	Si (residuos no)	Bicapa, granulada	No	Sí	Sí
E. bovis	Ovoide o subesférica	23-34 x 17-23	Si	No	Bicapa, anaranjada	No	Sí	Sí
E. brasiliensis	Elipsoidal	33-43 x 24-30	Si	Si (residuos no)	Bicapa, amarronada, a veces con placas	No	Sí	Sí
E. bukidnonensis	Ovoide o con forma de pera	47-50 x 33-38	Si	Si (residuos no)	Bicapa, con listas radiales	No	No	No
E.canadensis	Ovoide o elipsoidal	28-37 x 20-27	Variable	Si		No	Sí	No descrito
E. cylindrica	Cilíndrico o elongada	16-37 x 12-15	No	No	Una capa, incolora	No	Sí	No
E. ellipsoidalis	Elipsoidal u ovoide	20-26 x 13-17	Sí	No	Fina, oscura	No	Sí	Sí
E. pellita	Forma de huevo	36-41 x 26-30	Si	Si (residuos no)	Gruesa, marrón, con protuberancias	No	Sí	Sí
E.subspherica	Redondeada o subesférica	9-14 x 8-13	No	No	Una capa, incolora	No	No	Sí
E. wyomingensis	Ovoide	37-45 x 26-31	Si	No	Una capa, amarronada	No	No	Sí
E. zuernii	Subesférica	15-22 x 13-18	No	No	Una capa	No	Sí	Sí, muy pequeños
E. illinoisensis	Elipsoidal u ovoide	24-29 x 19-22	No	No	Una capa, incolora	No descrito	No descrito	No descrito

3.2.3. Análisis de datos

Los datos obtenidos en este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EE.UU.) y su análisis estadístico se realizó mediante los paquetes estadísticos SPSS Statistics v.25 (International Business Machines Corp., Armonk, Nueva York, EE.UU.) y R 4.1.2 (R Core Team, 2021).

En primer lugar, se calculó el porcentaje de muestras positivas para cada patógeno y su distribución según la edad del animal de procedencia (en semanas) y la consistencia de las heces. A continuación, para determinar la posible influencia de estos dos parámetros sobre la probabilidad de detectar cada uno de los enteropatógenos incluidos en el estudio se realizaron regresiones logísticas de efectos mixtos, incluyendo la granja como intercepción aleatoria, empleando el paquete *lme4* de R (Bates *et al.*, 2015). En esta regresión, para el caso de *E. coli*, se consideró cada patotipo como un patógeno independiente y se incluyeron las variables cuantitativas indicadas a continuación:

- Variable dependiente: resultado para cada muestra del enteropatógeno acerca del que se pretende averiguar si su aparición está relacionada con los predictores: positivo o negativo.
- Predictores:
    - Edad del animal: menos de 7 días, entre 7 y 14 días, entre 14 y 21 días y más de 21 días.
    - Consistencia de las heces: pastosa, pastosa-acuosa y acuosa.
    - Resultado para cada muestra de los demás agentes incluidos en el estudio: positivo o negativo.

El resultado de la regresión se consideró significativo cuando $p<0,05$ y, en esos casos, se calculó el *Odds Ratio* (OR) con un intervalo de confianza del 95%. Se comprobó la existencia de una posible colinealidad entre las variables mediante la función "vif" del paquete *car* de R (Fox y Weisberg, 2019).

Por otra parte, para poder realizar el análisis integrado de los enteropatógenos estudiados, en primer lugar, se clasificaron las muestras en aquellas que eran positivas a un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

solo agente (infecciones simples) y las que contenían más de un enteropatógeno (infecciones mixtas) empleando el paquete *dplyr* de R (Wickham *et al.*, 2022). Para ello, en el caso de *Cryptosporidium* spp., solo se tuvieron en cuenta aquellas muestras que habían resultado positivas a *C. parvum* en el análisis genotípico, por ser ésta la única especie confirmada como agente causal de NCD (Santin, 2020). A continuación, se estableció el porcentaje de infecciones dobles, triples, cuádruples, quíntuples y provocadas por seis o más agentes y se determinó el número total de combinaciones posibles y cuáles fueron las treinta más frecuentes. Posteriormente, para determinar las posibles asociaciones existentes entre los enteropatógenos implicados, se realizó un análisis de co-ocurrencias empleando la función "cooccur" del paquete *cooccur* de R (Griffith *et al.*, 2016). Esta función permite determinar la probabilidad de que una combinación de patógenos se observe más o menos frecuentemente de lo que sería esperable en función de la prevalencia de cada uno de ellos. Asimismo, se determinaron las treinta combinaciones más frecuentes y se realizaron análisis de co-ocurrencias para cada una de las semanas de edad incluidas en el estudio. Finalmente, se analizó, en función de la semana de edad, la existencia de posibles comunidades de patógenos, su grado de agrupamiento y la intermediación entre ellas, empleando el paquete *igraph* de R (Csardi y Nepusz, 2006).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Análisis individual de los enteropatógenos

Prevalencia de los enteropatógenos analizados

Tras analizar todas las muestras se observó que en el 97,1% se detectó al menos uno de los agentes incluidos en el estudio; estos resultados sugieren que la presencia de agentes patógenos juega un papel muy relevante en la aparición de la NCD. Como se puede observar en la Figura 5, tres enteropatógenos (*Cryptosporidium* spp., rotavirus A y norovirus bovino) fueron especialmente prevalentes, con porcentajes de infección superiores al 40%. En menor proporción se detectaron tres de los cuatro patotipos de *E. coli* estudiados (ETEC, EPEC y EHEC) junto con el nebovirus bovino y *G. duodenalis*, cuyas prevalencias fueron cercanas al 20%. El porcentaje de muestras positivas al resto de los agentes (coronavirus y torovirus bovinos, *Eimeria* spp. y STEC) fue siempre inferior al 10%. Cabe destacar que *Salmonella* spp. no se aisló en ninguna de las muestras analizadas.

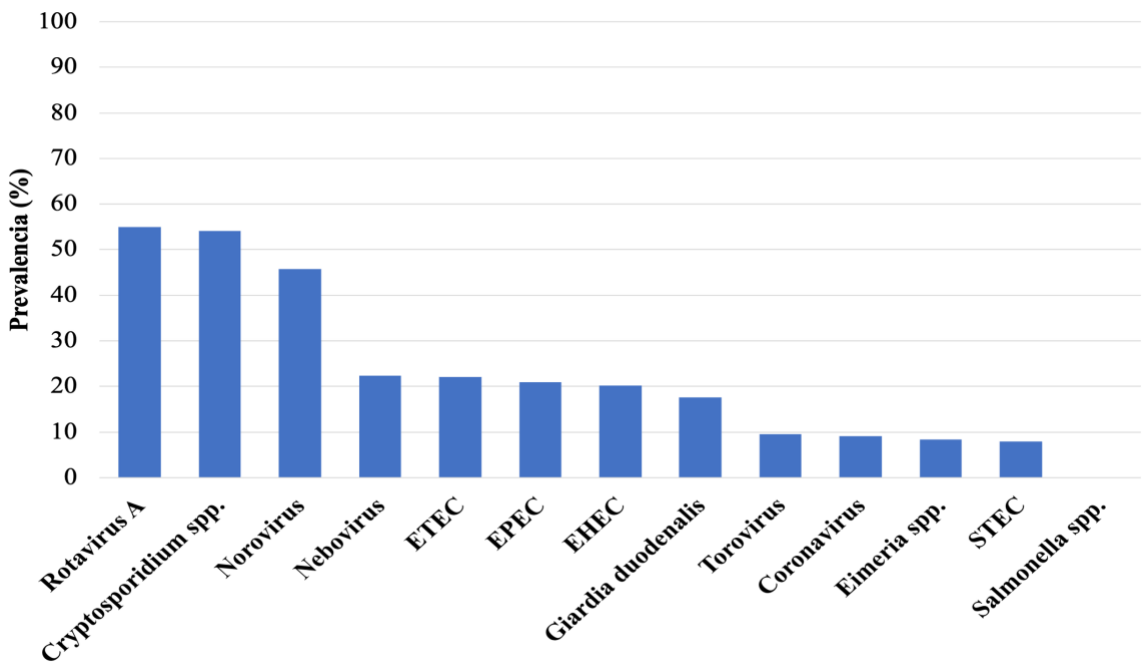


Figura 5. Prevalencia de los enteropatógenos asociados con la aparición de NCD en terneros neonatos con diarrea de Galicia y Asturias. ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EPEC: *E. coli* enteropatógena; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga.

El agente patógeno más común en este estudio fue el rotavirus A bovino (BRoV), que se detectó en un 55,0% de las muestras y en un 67,6% de las granjas. Nuestros resultados muestran una prevalencia ligeramente superior a las obtenidas previamente en terneros con diarrea de España (42,7%-50,6%) (De La Fuente *et al.*, 1998; Benito *et al.*, 2019, 2020); sin embargo, un trabajo realizado en terneros menores de 45 días de Galicia (García-Meniño *et al.*, 2015) señaló un porcentaje de infección mucho menor en animales diarreicos (7,2%), lo que puede deberse a la menor sensibilidad de la técnica empleada (ELISA directo) y al mayor rango de edad de los animales incluidos en el estudio, pues este virus suele ser especialmente frecuente en las dos primeras semanas de vida (Cho y Yoon, 2014). La mayoría de los resultados obtenidos en España (De La Fuente *et al.*, 1998; Benito *et al.*, 2019, 2020) y en otros países del mundo (Alfieri *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Lanz Uhde *et al.*, 2008; Swiatek *et al.*, 2010; Izzo *et al.*, 2011; Bertoni *et al.*, 2020; Castells *et al.*, 2020b; Barkley *et al.*, 2021; Caffarena *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022; Cho *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022) demuestran que este virus continúa siendo uno de los enteropatógenos más frecuentemente involucrados en la aparición de procesos diarreicos en bovinos neonatos, con prevalencias que oscilan entre el 24,2% y el 79,9%. De hecho, la gran mayoría de las investigaciones señalan a este virus y a *C. parvum* como los dos enteropatógenos más frecuentemente identificados en muestras de terneros neonatos con diarrea. Si bien nuestros resultados coinciden con los de algunas investigaciones previas en las que BRoV es el enteropatógeno predominante (Lanz Uhde *et al.*, 2008; Izzo *et al.*, 2011; Barkley *et al.*, 2021; Renaud *et al.*, 2021), la mayoría señalan mayores prevalencias de *C. parvum* (Thompson *et al.*, 2007; Bartels *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2013; Caffarena *et al.*, 2021; Garro *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022), encontrándose entre ellas las realizadas previamente en España (De La Fuente *et al.*, 1998; García-Meniño *et al.*, 2015; Benito *et al.*, 2020). La elevada prevalencia de BRoV hallada en este estudio, así como su predominancia sobre otros enteropatógenos, puede resultar sorprendente dado que, en los últimos años, se ha extendido el uso de vacunas comerciales frente a este agente, que se administran a las madres en el preparto y, en su inmensa mayoría, incluyen también cepas inactivadas de ETEC y BCoV (Maier *et al.*, 2022). En este sentido, se ha sugerido que el empleo de estas vacunas comerciales ha permitido disminuir de forma significativa la prevalencia de este virus en terneros con diarrea neonatal en Bélgica durante el período 1982-1993, favoreciendo la predominancia de *Cryptosporidium* spp. (de Graaf *et al.*, 1999). En nuestro estudio tan sólo se emplearon

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vacunas frente a BRoV en el 33% de las explotaciones y, paradójicamente, el porcentaje de terneros positivos al virus en estas granjas (56,3%) fue ligeramente superior al detectado en las que no la administran (55%). Con respecto a esto, es preciso tener en cuenta que, aunque estas vacunas permiten reducir la incidencia de la diarrea causada por BRoV, así como la mortalidad y la excreción del agente por parte de los animales infectados, no previenen la infección (Parreño *et al.*, 2004; Kaplon *et al.*, 2013). No obstante, en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en los niveles de excreción vírica entre los terneros procedentes de granjas en las que se empleaba la vacunación y el resto. Sin embargo, estos resultados no implican necesariamente que la vacuna no esté siendo efectiva, ya que la aparición de NCD puede deberse a la infección concomitante por otros patógenos no incluidos en la vacuna que sean la verdadera causa (Cho y Yoon, 2014). Además, una de las condiciones necesarias para que las vacunas frente a BRoV sean eficaces es que exista una adecuada transferencia de inmunidad pasiva de la madre al neonato, lo que depende de un buen encalostrado; por tanto, la elevada tasa de prevalencia de este virus en explotaciones que vacunan podría deberse también a deficiencias en este proceso (Maier *et al.*, 2022). Por otra parte, la importante presencia de BRoV en las heces de animales diarreicos también podría deberse al desarrollo de nuevas cepas capaces de evadir la respuesta inmunitaria como consecuencia del aumento de la vacunación frente al virus y la consecuente presión de selección. Aunque este fenómeno ya se ha observado en rotavirus humanos (Usonis *et al.*, 2012; Bonura *et al.*, 2022), los estudios realizados hasta la fecha en el ganado bovino muestran resultados discordantes. Si bien algún estudio señala que la presión ejercida por la vacunación no se ha reflejado en la detección de variaciones en las cepas de campo (Kaplon *et al.*, 2013), la mayoría de las investigaciones, incluyendo las más recientes, constatan diferencias entre las cepas circulantes y las vacunales (Barreiros *et al.*, 2004; da Silva Medeiros *et al.*, 2015; Gomes Rocha *et al.*, 2017; Karayel *et al.*, 2017; Benito *et al.*, 2019, 2020; Fritzen *et al.*, 2019). Estas diferencias podrían tener su origen en la extensa diversidad genómica y antigénica propia de los rotavirus, que se manifiesta incluso en aquellas cepas que circulan al mismo tiempo en la misma región, y en su elevada capacidad de mutación a través de mecanismos como la acumulación de mutaciones puntuales, la reorganización genómica o la recombinación con otras cepas (Matthijnssens y Desselberger, 2012). Por lo tanto, se necesitan más datos, incluyendo la caracterización molecular de las cepas de BRoV implicadas en los casos de NCD, para determinar si las cepas vacunales son

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

significativamente diferentes a las de campo, lo que supondría una menor protección frente a las infecciones, o si han aparecido cepas más virulentas o incluso con potencial zoonósico (Benito *et al.*, 2020; Alotaibi *et al.*, 2022).

El segundo agente patógeno más frecuente fue *Cryptosporidium* spp., con una prevalencia del 54,0%. Este porcentaje está en línea con los resultados de estudios previos realizados en España en los últimos 25 años (49,2-64,7%) (Quílez *et al.*, 1996, 2008b; De La Fuente *et al.*, 1998; Castro-Hermida *et al.*, 2002a; Díaz *et al.*, 2010; García-Meniño *et al.*, 2015; Benito *et al.*, 2020) y confirma que este protozoo sigue siendo uno de los enteropatógenos más prevalentes en terneros diarreicos menores de un mes, estando presente en el 54,5% de las granjas. Considerando la escala de evaluación semicuantitativa para valorar la eliminación de ooquistes, la intensidad media de excreción ascendió a 2,88, con una desviación típica de 0,41. Llama la atención que, durante los últimos 25 años, los porcentajes de infección por *Cryptosporidium* spp. se han mantenido más o menos estables en los terneros neonatos con diarrea a pesar de disponer de fármacos, como el lactato de halofuginona y la paromomicina, útiles en la prevención de la criptosporidiosis (Díaz *et al.*, 2019). En nuestro estudio tan sólo se había administrado lactato de halofuginona a un 9,3% de los animales analizados; en ellos, la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. (53,8%) fue ligeramente inferior a la obtenida en los animales no tratados (56,8%). No obstante, es preciso tener en cuenta que el lactato de halofuginona es un criptosporidiostático, por lo que no previene la infección, aunque sí permite retrasar la aparición de la diarrea, reducir la mortalidad y la intensidad de excreción de ooquistes (Brainard *et al.*, 2021). Este último efecto se reflejó en nuestros resultados; la intensidad media de eliminación de los animales infectados tratados (2,3) fue inferior a la de aquellos a los que no se les había administrado el fármaco (2,9), si bien la diferencia entre ambos grupos no resultó significativa. Por lo tanto, dada la inexistencia de vacunas y tratamientos completamente efectivos frente a este parásito, la profilaxis y el control de las infecciones debería centrarse en mejorar las prácticas de manejo que se llevan a cabo en las granjas. En ese sentido, se recomienda disminuir la densidad de animales, separar a los animales jóvenes de los adultos, limpiar y desinfectar con compuestos eficaces los cubículos de los terneros antes de introducir nuevos animales, asegurarse de que los neonatos se han encalostrado adecuadamente y aislar a los animales diarreicos (Santin, 2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En lo que se refiere a las especies de *Cryptosporidium* presentes en las muestras analizadas, tras amplificar un fragmento del gen que codifica para la subunidad 18s del ARNr de *Cryptosporidium* spp., se obtuvieron amplicones del tamaño esperado en el 94,3% de las muestras positivas a IFAT (214/227). Tras realizar la digestión con las endonucleasas *SspI*, *VspI* y *MboII*, se analizó el patrón de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos permitiendo identificar tres especies de *Cryptosporidium*: *C. bovis*, *C. parvum* y *C. ryanae*. *Cryptosporidium parvum* fue la especie predominante, pues se identificó en el 98,12% (210/214) de las muestras positivas, recogidas en 118 granjas, lo que coincide con resultados previos obtenidos en terneros lactantes con diarrea del norte de España, donde esta especie representó el 98,7-100% de todos los aislados positivos (Quílez *et al.*, 2008b; Díaz *et al.*, 2010). Estos resultados son esperables si se tiene en cuenta que todas las muestras procedían de animales con diarrea menores de un mes, donde *C. parvum* se considera, junto con BRoV, uno de los enteropatógenos más prevalentes (De La Fuente *et al.*, 1999; Lanz Uhde *et al.*, 2008; Bartels *et al.*, 2010; Gillhuber *et al.*, 2014; Benito *et al.*, 2020), especialmente entre la segunda y tercera semana de vida (De La Fuente *et al.*, 1999; Santín *et al.*, 2004; Gillhuber *et al.*, 2014; Soilán, 2014; Díaz *et al.*, 2018b).

Por el contrario, *C. bovis* y *C. ryanae* se hallaron sólo en un 0,94% (2/214) de las heces positivas, respectivamente; cada una de estas muestras procedió de explotaciones distintas. Debido al reducido número de aislados de estas dos especies, todas las muestras positivas se secuenciaron. El análisis de la secuencia permitió confirmar la identificación específica. Así, las dos secuencias de *C. bovis* fueron idénticas entre sí, y mostraron una homología del 100% con la secuencia de referencia MH028031.1 obtenida en yaks de China (Ren y Lin, no publicado). Por su parte, las dos secuencias de *C. ryanae* fueron idénticas a las depositadas en GenBank bajo el número de acceso KY711520.1 y obtenidas en vacuno de aptitud lechera de China (Cai *et al.*, 2017). El pequeño porcentaje de muestras en las que se identificaron ambas especies coincide con estudios previos realizados en terneros con diarrea en España, donde *C. bovis* representó el 1,3% de los aislados positivos (Quílez *et al.*, 2008b). En otros países europeos, el porcentaje de terneros neonatos diarreicos positivos a estas especies también fue muy bajo, oscilando entre el 0% y el 4% (Thompson *et al.*, 2007; Imre *et al.*, 2011; Gillhuber *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2018b). Estos datos pueden deberse a que ambas especies suelen ser mucho más frecuentes en animales sin clínica y de mayor edad, especialmente en terneros destetados (Santin, 2020; Díaz *et al.*, 2021). Como no se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

consideran especies patógenas, su presencia en los terneros con diarrea puede deberse a su circulación en la explotación. En este sentido, un estudio realizado recientemente en la misma zona geográfica señala que tanto *C. bovis* como *C. ryanae* circulan de forma habitual en las granjas, pues se observó una elevada prevalencia de ambas especies en animales asintomáticos mayores de un mes, donde representaron entre el 42,9% y el 84,2% de todos los bovinos positivos al protozoo (Díaz *et al.*, 2021). Por lo tanto, su detección en terneros diarreicos no implica que estén actuando como agente causal de la NCD y es probable que la diarrea observada en estos animales sea el resultado de una infección concurrente con otros enteropatógenos. De hecho, en una de las muestras positivas a *C. bovis* también se detectó la presencia de *G. duodenalis*, ETEC y EPEC, y en la otra se halló STEC. Asimismo, en una de las positivas a *C. ryanae* se identificó *G. duodenalis*, *Eimeria* spp., BRoV, BNoV y BNeV, mientras que en la otra se hallaron *G. duodenalis*, EHEC, BRoV, BToV y BNeV.

Por otra parte, los resultados del análisis genotípico de *Cryptosporidium* mostraron la ausencia de terneros infectados con más de una especie, lo que podría deberse al claro predominio de *C. parvum* en terneros diarreicos menores de un mes. Las infecciones mixtas con varias especies de *Cryptosporidium* tampoco se han detectado con frecuencia en estudios moleculares previos, con prevalencias que no superaron el 1,9% en ningún caso (Santín *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022) a excepción de un trabajo realizado por Wang *et al.* (2011), donde se identificaron varias especies del protozoo en el 12,8% de las muestras, si bien la mayoría se detectaron en animales más mayores que los incluidos en este trabajo (4-8 semanas de edad). Sin embargo, la existencia de infecciones mixtas en nuestro estudio no puede excluirse ya que las técnicas de PCR utilizadas tienden a amplificar selectivamente las poblaciones de *Cryptosporidium* predominantes, subestimando la presencia de especies que se encuentran en menor número (Cama *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007; Santín y Zarlenga, 2009; Silverlås *et al.*, 2010). Con respecto a esto, si bien se ha señalado que la realización de la RFLP permite mejorar la identificación de co-infecciones (Feng *et al.*, 2007), se ha sugerido que el uso de cebadores específicos para la detección de cada especie de *Cryptosporidium* spp. puede aumentar notablemente la sensibilidad de la técnica, permitiendo detectar aquellas especies presentes en menor cantidad. En este sentido, Jeníková *et al.* (2011) detectaron un 10% de infecciones mixtas empleando cebadores específicos para cada especie de *Cryptosporidium*, frente al 0,2% identificado mediante un protocolo de PCR-RFLP similar al utilizado en este trabajo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Por último, con respecto a la distribución de las especies de *Cryptosporidium* identificadas por explotaciones, en la mayoría de las granjas en las que se dispuso de muestras procedentes de dos o más animales se identificó una única especie, a excepción de un rebaño donde se encontraron *C. parvum* y *C. bovis*, lo que supone el 1,61% de las granjas en las que se detectó este protozoo. Este resultado, si bien es ligeramente inferior a los porcentajes obtenidos en estudios previos, que oscilan entre un 3 y un 14% (Quílez *et al.*, 2008b; Díaz *et al.*, 2018b; Santoro *et al.*, 2019), demuestra la elevada morbilidad de *C. parvum* dentro de la granja.

Otros enteropatógenos muy prevalentes en los terneros neonatos con diarrea de Galicia y Asturias fueron los norovirus (BNoV) y nebovirus bovinos (BNeV), que estuvieron presentes en un 45,7% y 22,4% de las muestras y en un 52,3% y 28,4% de las granjas, respectivamente. Este es el primer estudio que demuestra la presencia de estos calicivirus en teneros con diarrea menores de un mes de España; nuestros resultados muestran que los BNoV están involucrados en mayor medida en la NCD que los BNeV, lo que coindice con los datos obtenidos en otros países europeos (Kaplon *et al.*, 2011; Tråvén *et al.*, 2022). Además, los porcentajes de infección observados en terneros con diarrea del noroeste de España fueron los más elevados de Europa; las investigaciones realizadas en terneros diarreicos en otros países europeos mostraron porcentajes de infección de BNoV que oscilaron entre el 8,9% y el 34,2% (Deng *et al.*, 2003; Milnes *et al.*, 2007; Di Bartolo *et al.*, 2011; Kaplon *et al.*, 2011; Tråvén *et al.*, 2022) y de BNeV de entre el 7% y el 13,1% (Di Martino *et al.*, 2011; Kaplon *et al.*, 2011; Tråvén *et al.*, 2022). Estas notables diferencias dependen en gran medida de la región donde se realizó el estudio, de la sensibilidad de los cebadores utilizados para la PCR, del tamaño muestral y de la edad de los animales analizados (Mauroy *et al.*, 2009; Hassine-Zaafrane *et al.*, 2012; Di Felice *et al.*, 2016). Por ello, en otras partes del mundo se han obtenido resultados muy diferentes: por ejemplo, en Irán las prevalencias son inferiores a las nuestras (39,5% de prevalencia de BNoV y 15% de BNev) (Pourasgari *et al.*, 2018), mientras que en Uruguay y EE.UU. el porcentaje de infección de BNoV supera el 70% (Cho *et al.*, 2013; Castells *et al.*, 2020a). Por el contrario, en Turquía la prevalencia de BNoV es muy reducida (3,9%) y menor que la de BNeV, que alcanza un 25,2% (Turan *et al.*, 2018). Además, los datos de seroprevalencia de BNoV obtenidos en varios países europeos como Alemania, Reino Unido o Bélgica (Deng *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2007; Mauroy *et al.*, 2009) muestran que más del 90% de los bovinos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

han estado en contacto con este patógeno; esta información, unida a que se trata de virus muy estables y altamente contagiosos que se excretan durante períodos de tiempo prolongados (Jung *et al.*, 2014) y frente a los cuales no se ha desarrollado ninguna vacuna, sugieren que la prevalencia de estos dos calicivirus continuará incrementándose en terneros diarreicos menores de un mes en Europa. Este hecho plantea la necesidad de realizar un mayor número de investigaciones que esclarezcan su papel en la NCD y permitan dilucidar la conveniencia de incluirlos en los paneles diagnósticos de rutina y de desarrollar vacunas frente a ellos.

Al considerar todas las muestras positivas a *E. coli*, independientemente de su patotipo, se constató que representaba el agente más frecuentemente identificado en las heces de terneros con diarrea, pues se aislaron colonias de esta bacteria en el 99,3% de las muestras. Esta elevada prevalencia se debe a que esta bacteria forma parte de la flora normal del tracto gastrointestinal del ternero (Gyles y Fairbrother, 2010). Por tanto, para conocer la prevalencia de patotipos diarreagénicos de *E. coli*, primeramente, se investigó la presencia de genes que codifican para sus factores de virulencia. Así, se identificó al menos uno de los factores virulencia estudiados en un 88,6% de todas las muestras incluidas en el estudio. Sin embargo, todavía se desconoce si la presencia de algunos de estos factores de virulencia de forma aislada puede asociarse con un incremento en su patogenicidad; así, en el 20,2% del total de muestras analizadas se hallaron *E. coli* cuyo único factor de virulencia presente fue la fimbria F17, la más típica en aislados de ganado vacuno y de la que se desconoce si juega algún papel en la NCD (Kolenda *et al.*, 2015). Como consecuencia, la presencia de los *E. coli* considerados diarreagénicos en ganado vacuno (ETEC, EPEC, EHEC y STEC) se detectó teniendo en cuenta la identificación conjunta de los factores de virulencia propios de cada patotipo (Gyles y Fairbrother, 2010). Así, un 61% de las muestras fecales (71,4% de las granjas) presentaron resultados compatibles con alguno de los patotipos señalados. Esta prevalencia es ligeramente superior a la obtenida en estudios previos realizados en otras partes del mundo (48,2-54,1%) (Shahrani *et al.*, 2014; Ryu *et al.*, 2020a); sin embargo, todos estos datos demuestran que la detección de *E. coli* patógenos sigue siendo habitual en los brotes de diarrea neonatal, si bien su papel depende del patotipo implicado (Kolenda *et al.*, 2015).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

De entre los patotipos de *E. coli* incluidos en este estudio, el más común fue ETEC, pues se identificaron los factores de virulencia F5 y STa en el 22,1% de las muestras; cabe destacar que este patotipo es el único que se ha asociado claramente con la NCD (Dubreuil *et al.*, 2016), y que no se detectó la presencia de los factores de virulencia STb y LT en ninguna de las muestras recogidas. La prevalencia obtenida en este trabajo fue superior a la señalada en investigaciones previas realizadas en terneros diarreicos menores de un mes en España (4,1-8%) (De La Fuente *et al.*, 1998; García-Meniño *et al.*, 2015); de manera similar, los porcentajes de infección observados en otros países europeos (3,8-16,5%) también fueron inferiores a los descritos en el presente estudio (Krogh, 1983b; Thompson *et al.*, 2007; Lanz Uhde *et al.*, 2008; Bartels *et al.*, 2010). No obstante, es preciso reseñar que en todos estos estudios se emplearon técnicas serológicas que únicamente detectan antígenos específicos de *E. coli* F5, cuya sensibilidad es menor a la mostrada por las técnicas moleculares (Blanchard, 2012).

Para tratar de reducir el impacto de ETEC en los terneros neonatos se pueden instaurar diversas medidas preventivas en las explotaciones, entre las que destaca la vacunación. De manera similar a lo descrito para BRoV, las vacunas frente a ETEC se administran a las madres durante el período de preparto para aumentar la transferencia de anticuerpos específicos a través del calostro, y son efectivas para reducir su prevalencia y las tasas de mortalidad (Kolenda *et al.*, 2015; Viidu y Mõtus, 2022). De hecho, en nuestro estudio esta medida tan sólo se había implantado en un 33% de las explotaciones incluidas y, en ellas, se observó una menor prevalencia de ETEC, pues sólo se detectó este agente en el 11,7% de las muestras procedentes de esas granjas comparado con el 26,8% de prevalencia en las granjas que no aplican la vacunación. Por lo tanto, y aunque no se detectaron diferencias significativas en los niveles de excreción de ETEC entre los individuos positivos procedentes de granjas vacunadas y no vacunadas, teniendo en cuenta las importantes pérdidas económicas causadas por este agente, sería recomendable la implantación de un programa de vacunación en aquellas granjas donde se hayan detectado casos de NCD causados por ETEC o donde los factores de riesgo presentes sugieran que es probable la aparición de brotes.

Resultaron sorprendentes las elevadas prevalencias detectadas para EPEC y EHEC, que oscilaron entre el 20% y el 21%, y que fueron similares a la de ETEC. Estos datos

también fueron superiores a los obtenidos en un estudio previo realizado en terneros diarreicos en España, donde los porcentajes de infección por estos patotipos oscilaron entre el 8 y el 9% (Orden *et al.*, 1998). No obstante, es preciso tener en cuenta que, aunque en ese trabajo se empleó PCR para identificar los factores de virulencia constitutivos de cada patotipo, la técnica se efectuó a partir de colonias previamente seleccionadas, lo que supone una menor sensibilidad que la realización de qPCR directamente a partir de muestras de heces. No se dispone de mucha información sobre la presencia de estos patotipos en terneros con NCD en Europa, pero un estudio realizado en Bélgica en terneros con diarrea de hasta diez semanas de edad también constató una elevada prevalencia de EPEC (25%), que fue ligeramente superior a la obtenida en este trabajo, si bien la de EHEC (9,85%) fue muy inferior (China *et al.*, 1998). La presencia de estos dos patotipos en más de un 20% de las muestras podría justificar su inclusión en el diagnóstico etiológico de la NCD, dado que la mayoría de los laboratorios sólo incluyen la identificación de ETEC en sus paneles de rutina (Peek *et al.*, 2018); no obstante, todavía no se ha conseguido dilucidar completamente su papel en el proceso, ya que EPEC y EHEC también se han detectado en un importante porcentaje de terneros sanos (Wu *et al.*, 2010; Kolenda *et al.*, 2015; Ngeleka *et al.*, 2019). Finalmente, la prevalencia de STEC fue mucho menor y tan sólo se detectó en un 7,9% de las muestras, lo que coincide con la tendencia descendente de la importancia de este patotipo observada a nivel mundial (Kolenda *et al.*, 2015), lo que podría deberse a que, aunque es capaz de persistir en la mucosa intestinal, solo lo hace en cantidades muy bajas (Menge, 2020), por lo que los niveles de excreción y la capacidad de transmisión de los animales infectados podría ser más reducida.

La mayoría de las investigaciones sobre la etiología de la NCD no suelen analizar la presencia de *G. duodenalis*, por lo que su prevalencia en los animales afectados y su papel en el proceso todavía no se conocen con exactitud (Xiao *et al.*, 1993). No obstante, nuestros resultados muestran que la presencia de *G. duodenalis* es relativamente frecuente en las heces procedentes de terneros diarreicos lactantes, pues se detectó en un 17,6% de los animales incluidos en el estudio, resultando positivas el 19,4% de las granjas. Considerando la escala de evaluación semicuantitativa para valorar la excreción de quistes, la intensidad media de eliminación ascendió a 2,66, con una desviación típica de 0,6. La prevalencia de *G. duodenalis* en este trabajo fue superior a la obtenida en los pocos estudios previos realizados en terneros lactantes con diarrea de Europa, incluyendo España (9,8%) (Quílez *et*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

al., 1996), Austria (10,6%) (Lichtmannsperger *et al.*, 2019) o Alemania (3,5%) (Gillhuber *et al.*, 2014). Por el contrario, los porcentajes de infección obtenidos en otros países del mundo, como Irán o Brasil, fueron superiores al hallado en este estudio (21,3% y 25,6%, respectivamente) (Davoudi *et al.*, 2011; Glombowsky *et al.*, 2017). Es preciso mencionar que se dispone de mucha más información en animales asintomáticos, donde *G. duodenalis* es muy común (Quílez *et al.*, 1996; Huetink *et al.*, 2001; Björkman *et al.*, 2003) y, de hecho, nuestros resultados son notablemente inferiores a los obtenidos en otros estudios en los que se incluyeron terneros diarreicos y sanos en España (31,9%) (Castro-Hermida *et al.*, 2006) y en otros países europeos (31,8-34%) (Langkjær *et al.*, 2007; Minetti *et al.*, 2014). Sin embargo, algunos estudios indican que *G. duodenalis* contribuye a la NCD (Xiao *et al.*, 1993; Ruest *et al.*, 1995) y un meta-análisis reciente mostró que los terneros diarreicos tienen una probabilidad 2,6 veces mayor de estar infectados con *G. duodenalis* que los animales sanos (Taghipour *et al.*, 2022). Por lo tanto, y a pesar de que se necesiten más estudios para dilucidar su papel en el proceso, *G. duodenalis* debería incluirse en el diagnóstico etiológico de rutina de la NCD, sobre todo si tenemos en cuenta su presencia en casi una quinta parte de las granjas incluidas en este estudio, lo que refuerza la idea de que es un enteropatógeno bastante extendido. En este sentido, es importante señalar que la excreción de los quistes de *G. duodenalis* es intermitente, por lo que el análisis de una única muestra por animal puede traducirse en una subestimación de la prevalencia (Xiao y Herd, 1994).

De todos los enteropatógenos con porcentajes de infección inferiores al 10%, el torovirus bovino (BToV) fue el más prevalente pues se identificó en el 9,5% de las muestras; el 15,3% de las granjas presentaron al menos un animal positivo. Este estudio tiene un gran interés epidemiológico pues aporta los primeros datos de prevalencia de este virus en terneros lactantes con diarrea de España. Al comparar nuestros resultados con los obtenidos previamente en otros países europeos, el porcentaje de infección obtenido es claramente superior a los observados en los estudios más antiguos realizados en Alemania (5%) (Liebler *et al.*, 1992) o Hungría (3,6%) (Matiz *et al.*, 2002); sin embargo, es similar al señalado por Haschek *et al.* (2006) (11,1%) en Austria, y que supone el dato más reciente obtenido en terneros con NCD en Europa. El análisis de estos resultados, junto con los datos obtenidos en otros países del mundo, parece indicar que la presencia de este virus en terneros diarreicos es, por lo general, baja. Por ejemplo, el porcentaje de terneros positivos fue cercano al 3% y 5% en Corea del Sur y en EE.UU., respectivamente (Koopmans *et al.*, 1991; Park *et al.*,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

2008; Cho *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2020b), mientras que en Japón alcanzó un 15,7% (Kirisawa *et al.*, 2007). Por el contrario, las prevalencias de BToV más elevadas se hallaron en Canadá, donde el 36,4% de los animales analizados resultaron positivos (Duckmanton *et al.*, 1998). Los porcentajes de infección tan bajos obtenidos en la mayoría de los trabajos, así como las discrepancias observadas, podrían tener su origen en la corta duración del período de excreción de este agente, que es de tan sólo 3-4 días (Woode *et al.*, 1982, 1985). Esto permitiría clasificar como negativos a algunos animales positivos, pues en el momento de la toma de muestras ya habrían dejado de eliminar el virus. Debido a que los datos sobre la presencia de BToV en terneros con NCD son limitados y obtenidos en estudios realizados hace más de una década, se necesitan más estudios para conocer, de forma más robusta, su impacto actual en la NCD tanto en nuestro continente como en el resto del mundo.

El coronavirus bovino (BCoV) se identificó en un porcentaje de muestras similar al de BToV, detectándose en un 9% de las muestras y en un 12,2% de las granjas. Esta baja prevalencia en terneros diarreicos lactantes está en la línea de lo obtenido en estudios previos realizados en España, en los que no supera el 7,3% (De La Fuente *et al.*, 1998; García-Meniño *et al.*, 2015); sin embargo, un estudio reciente señala una prevalencia del 23,6% (Benito *et al.*, 2020), aunque estos datos pueden deberse a la inclusión de animales de hasta dos meses de edad, pues se ha descrito que la infección por BCoV puede ocurrir entre las 24 horas de vida y los cinco meses (Vlasova y Saif, 2021b). Los estudios realizados previamente en otros países europeos también reflejan una situación similar a la descrita en terneros con diarrea de España, pues las prevalencias oscilaron entre el 5,7% y el 8,8% (Thompson *et al.*, 2007; Lanz Uhde *et al.*, 2008; Bartels *et al.*, 2010); en este caso también difiere un único trabajo realizado en Austria, donde la prevalencia alcanzó el 40%, pero que también incluyó terneros diarreicos más mayores, de hasta 42 días de edad (Haschek *et al.*, 2006). Un análisis retrospectivo de los porcentajes de infección del BCoV en casos de NCD sugiere que la importancia de este virus en este proceso ha disminuido notablemente. Por ejemplo, una investigación que analizó la importancia de varios virus y *C. parvum* en terneros con diarrea realizada por el Veterinary and Agrochemical Research Centre de Bruselas durante los años 1982-1993, mostró que la prevalencia de las infecciones con BCoV como único patógeno disminuyó desde el 35% al principio del estudio, hasta menos del 25% al final del mismo (de Graaf *et al.*, 1999). Este hecho puede deberse, en parte, al incremento del uso de vacunas frente a este enteropatógeno, que se comercializan combinadas con las de ETEC o BRoV, y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

cuya forma de administración ya se ha comentado previamente, siendo de gran importancia un correcto encalostrado para que sean eficaces (Maier *et al.*, 2022). En nuestro estudio, el empleo de este tipo de vacunas dio lugar a una reducción de la prevalencia, pues solo alcanzó el 6,3% en las explotaciones que las utilizaron frente al 10,3% en las que no lo hicieron. No obstante, al igual que se comentó en el caso de BRoV, el objetivo principal de la vacunación no es prevenir la infección, si no evitar el desarrollo de diarreas graves que requieran tratamiento y den lugar a un aumento de la mortalidad, así como reducir la excreción del agente por parte de los animales infectados (Castells *et al.*, 2019; Vlasova y Saif, 2021b).

La prevalencia de *Eimeria* spp. fue similar a la de BToV y BCoV, pues se detectaron ooquistes en el 8,3% de los animales, siendo positivas el 9,9% de las granjas. Nuestros datos suponen una importante contribución al conocimiento de las infecciones por coccidios en ganado vacuno, pues la información disponible sobre la implicación de este parásito en la aparición de diarrea en terneros menores de un mes de edad es muy escasa. La tasa de prevalencia obtenida en este estudio fue baja, pero similar a la detectada previamente en un estudio realizado en terneros diarreicos de la misma edad en Alemania (4,5%) (Gillhuber *et al.*, 2014). Este resultado puede deberse a que la infección con este protozoo en terneros es especialmente frecuente entre las 3 semanas y los 6 meses de edad (Delling y Daugschies, 2022), lo que se observa en el trabajo de Gillhuber *et al.* (2014), en el que la prevalencia aumentó desde el 4,5% en los primeros 30 días a valores superiores al 50% en el tercer mes de vida. En la misma línea, un estudio realizado por Lee *et al.* (2018) en terneros diarreicos de Corea del Sur muestra un porcentaje de infección con este protozoo en torno al 5% en las tres primeras semanas de vida, que se incrementa a más de un 40% en los individuos de entre cuatro semanas y tres meses de edad. La intensidad de eliminación media de los animales positivos de nuestro estudio alcanzó los 22422,5 opg, con una desviación estándar de 77543,6 opg. La distribución de las muestras positivas en función de su recuento de opg se observa en la Figura 6.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

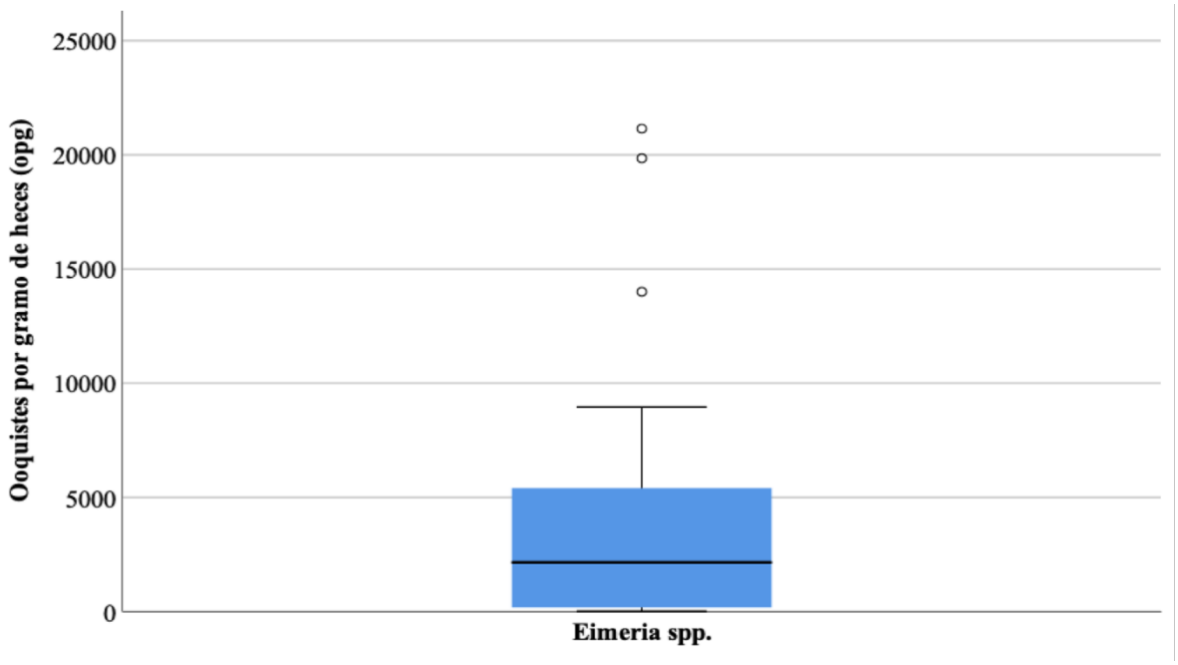


Figura 6. Distribución de las muestras positivas a *Eimeria* spp. en función de sus recuentos de ooquistes por gramo de heces (opg). Las líneas horizontales inferior y superior de la caja representan el 25% (primer cuartil, Q1) y 75% (tercer cuartil, Q3) respectivamente. La línea horizontal del interior de la caja indica el segundo cuartil (Q2), es decir, la mediana (50%). La línea inferior y superior de cada caja se extiende desde Q1/Q3 al valor mínimo/máximo dentro de 1,5 * rango Q1-Q3. Los datos más allá del final de las líneas son valores atípicos y están expresados mediante un punto. Se han eliminado tres valores atípicos superiores a los 25000 opg para facilitar la visualización.

El examen morfométrico de los ooquistes permitió identificar las especies de *Eimeria* implicadas en el proceso en el 80% (28/35) de las muestras positivas. La mayoría de las muestras donde no se realizó la identificación específica correspondieron con aquellas con menores recuentos (<100 opg); además, en dos muestras no se dispuso de suficiente cantidad de heces para realizar este análisis. Se detectaron diez especies, siendo *E. ellipsoidalis* (96,4%), *E. bovis* (85,7%) y *E. zuernii* (71,4%) las más prevalentes (**Tabla** 20). Además, en todas las heces analizadas se detectó la presencia de infecciones mixtas, encontrándose un máximo de siete especies diferentes de *Eimeria* en una misma muestra. Estos resultados coinciden con estudios previos que indican que las infecciones con una única especie de *Eimeria* son poco frecuentes, incluso en terneros asintomáticos y de mayor edad que los incluidos en este trabajo (Faber *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2008).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 20. Prevalencia de las especies de *Eimeria* identificadas en muestras fecales de terneros diarreicos de entre 0 y 30 días de edad del noroeste de España.

Especies de *Eimeria*	Prevalencia (%)	Positivas / Positivas a Eimeria spp.[1] (%)
E. ellipsoidalis	27/420 (6,4)	27/28 (96,4)
E. bovis	24/420 (5,7)	24/28 (85,7)
E. zuernii	20/420 (4,8)	20/28 (71,4)
E. auburnensis	12/420 (2,9)	12/28 (42,9)
E. cylindrica	9/420 (2,1)	9/28 (32,1)
E. subspherica	7/420 (1,7)	7/28 (25,0)
E. canadensis	6/420 (1,4)	6/28 (21,4)
E. alabamensis	6/420 (1,4)	6/28 (21,4)
E. wyomingensis	2/420 (0,5)	2/28 (7,1)
E. pellita	1/420 (0,2)	1/28 (3,6)

[1]Muestras positivas a *Eimeria* en las que se pudo identificar la especie implicada.

Finalmente, resulta interesante destacar que en nuestro estudio no encontramos ninguna muestra positiva a *Salmonella* spp., lo que coincide con investigaciones previas realizadas en España (De La Fuente *et al.*, 1998) y en otros países europeos (Naciri *et al.*, 1999; Haschek *et al.*, 2006; Seppä-Lassila *et al.*, 2015) en las que su prevalencia fue muy baja o incluso nula (0-0,5%). Este hecho podría estar relacionado con su baja prevalencia en el conjunto de los rebaños en Europa (Ågren *et al.*, 2016; Cummings *et al.*, 2018; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2022), resultado de la vigilancia epidemiológica realizada a nivel de la Unión Europea (Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre la vigilancia de las zoonosis y de los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo) y de la aplicación de programas nacionales de control de este agente en algunos de sus Estados Miembros (Hodnik *et al.*, 2021). No obstante, es importante seguir monitorizando su presencia dado el grave riesgo que supone para sanidad animal y la salud pública.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Influencia de la edad sobre la prevalencia de cada agente

En este estudio también se investigó la posible influencia de la edad de los animales sobre la prevalencia de los diferentes enteropatógenos. No obstante, para una adecuada interpretación de los datos es preciso tener en cuenta que el 76,4% de las muestras procedía de terneros en sus dos primeras semanas de vida. Esto es lógico si se considera que la mayor incidencia de la NCD se observa en los primeros quince días de vida, disminuyendo posteriormente con la edad (Bartels *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2013). Como consecuencia del reducido número de muestras de animales en su tercera (12,6%) y, especialmente, en su cuarta semana de vida (11%), las prevalencias de los enteropatógenos analizados tienen un cierto sesgo en relación con la edad y, por tanto, los resultados son menos robustos que si se hubiese incluido el mismo número de individuos en todas las categorías.

En la Figura 7 se muestra la distribución de cada uno de los agentes estudiados al considerar la edad del animal. Aunque todos los agentes se identificaron en las cuatro primeras semanas de vida, se pudieron observar marcadas diferencias. Así, la mayoría de los enteropatógenos estudiados se detectaron especialmente en terneros de entre cinco y 15 días. Por el contrario, la mayor parte de las muestras positivas a ETEC correspondieron a animales menores de una semana, y las de *Eimeria* spp. a aquellos de más de 20 días. Cabe destacar el amplio rango de edad mostrado por los terneros infectados con *G. duodenalis*, pues el 50% de las muestras positivas correspondieron a animales de entre 10 y 28 días (Figura 7).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

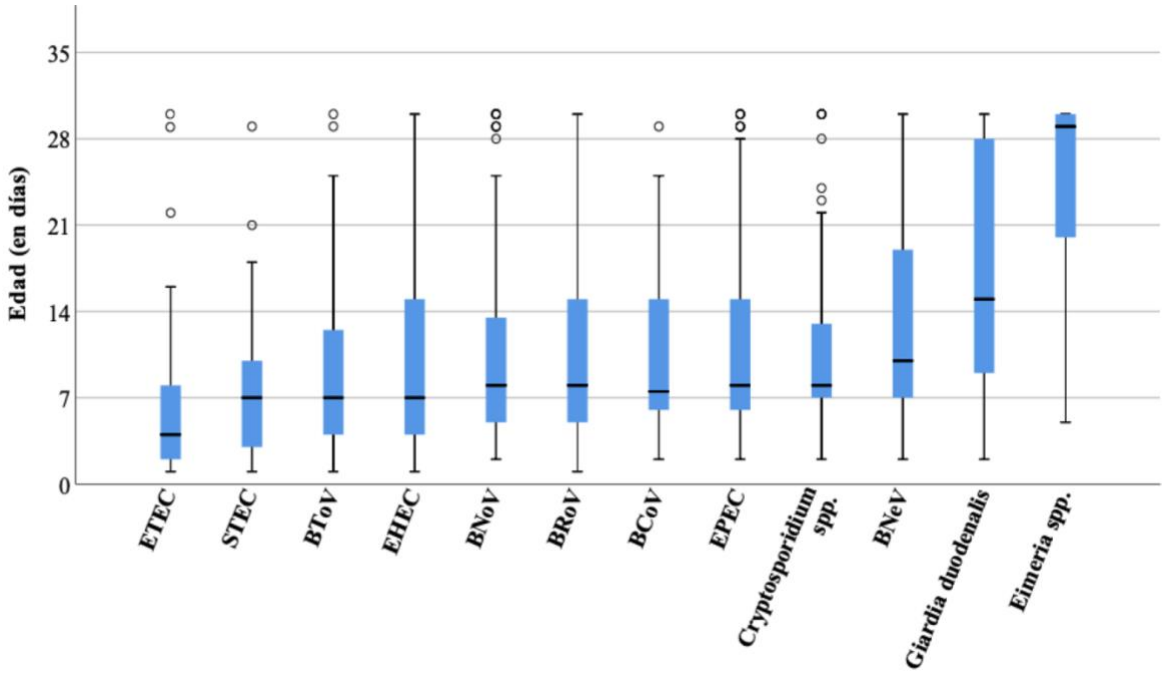


Figura 7. Diagramas de caja que representan la distribución por edades de las muestras positivas a cada enteropatógeno. Las líneas horizontales inferior y superior de la caja representan el 25% (primer cuartil, Q1) y 75% (tercer cuartil, Q3) respectivamente. La línea horizontal del interior de la caja indica el segundo cuartil (Q2), es decir, la mediana (50%). La línea inferior y superior de cada caja se extiende desde Q1/Q3 al valor mínimo/máximo dentro de 1,5 * rango Q1-Q3. Los datos más allá del final de las líneas son valores atípicos y están expresados mediante un punto. BRoV: rotavirus A bovino; BNoV: norovirus bovino; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EPEC: *E. coli* enteropatógena; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; BNeV: nebovirus bovino; BCoV: coronavirus bovino; BToV: torovirus bovino; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga.

Al analizar la evolución de la prevalencia de los diferentes enteropatógenos estudiados al considerar la edad (Figura 8) también se aprecian mayores porcentajes de infección en determinados rangos de edad, coincidiendo en muchos casos con los resultados observados en la Figura 7. Así, la presencia de ETEC, STEC y BToV es especialmente frecuente en los primeros días de vida. La mayoría de los positivos a *C. parvum* y BNoV aparecen durante la segunda semana de vida, mientras que BRoV presenta una elevada prevalencia a partir de esa segunda semana, si bien alcanza su pico en la cuarta. Finalmente, el porcentaje de terneros con diarrea positivos a EPEC, nebovirus, *G. duodenalis* y *Eimeria* spp. se incrementa de forma considerable a partir de los 21 días de vida. Todos estos resultados pueden resultar muy útiles en la práctica clínica, pues facilitan el establecimiento de una sospecha etiológica inicial.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

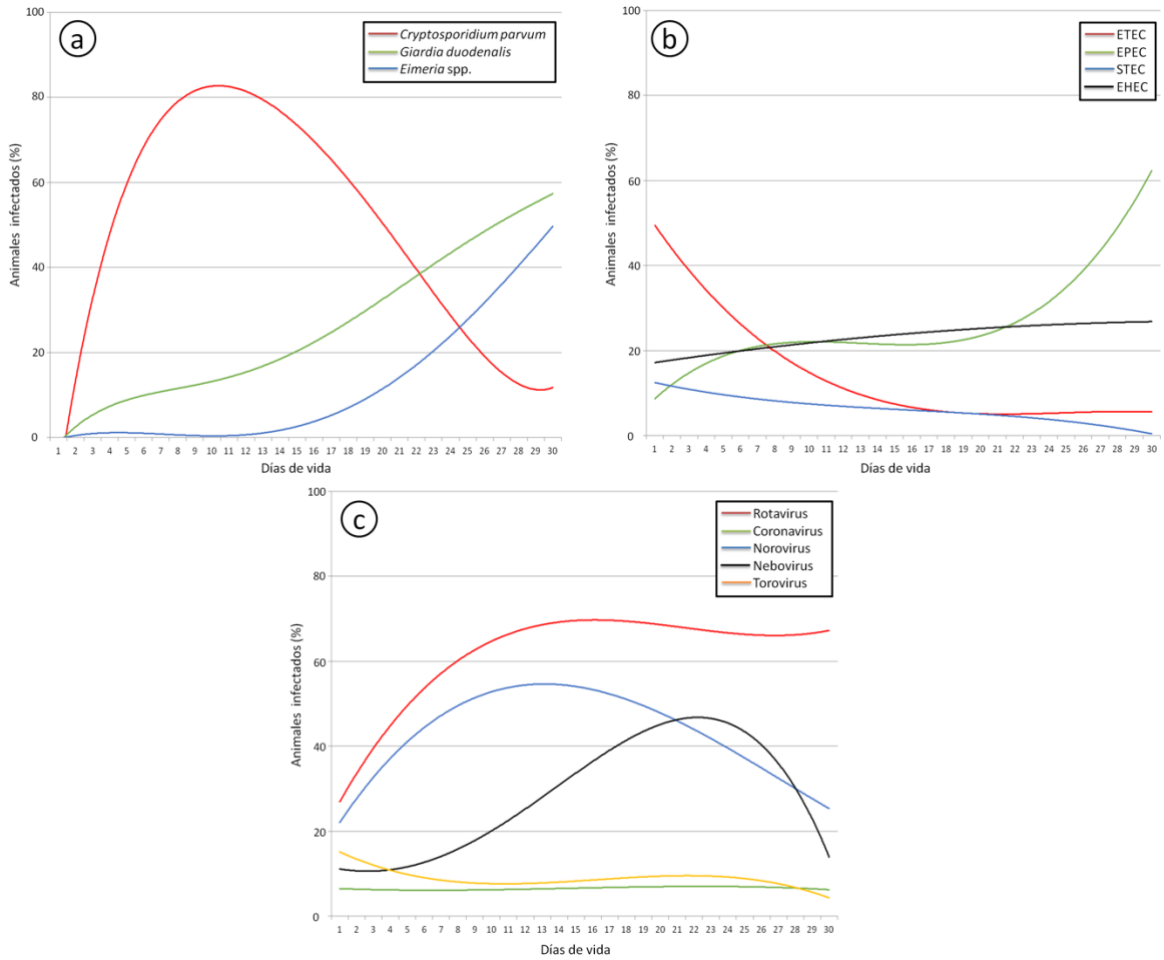


Figura 8. Líneas de tendencia que representan la prevalencia de los diferentes enteropatógenos en función de la edad del animal. a) Parasitarios; b) Bacterianos; c) Víricos.

El análisis de todos los patógenos en su conjunto permite establecer que los tres patógenos que son especialmente prevalentes en la primera semana de vida son los patotipos de *E. coli* ETEC y STEC, junto con BToV. Así, la prevalencia de ETEC fue significativamente superior durante la primera semana de vida, y disminuyó lenta y progresivamente con la edad (Tabla 21). Estos resultados coinciden con estudios previos (Akam *et al.*, 2004; Wieler *et al.*, 2007; Güler *et al.*, 2008; Younis *et al.*, 2009; Shams *et al.*, 2012; Shahrani *et al.*, 2014; Ngeleka *et al.*, 2019) y son coherentes con la patogenia de la infección. Los terneros neonatos muestran una mayor susceptibilidad a la infección por ETEC debido a su mayor pH intestinal derivado de una menor producción de acidez a nivel gástrico; posteriormente, la producción de ácidos gástricos aumenta de manera paulatina y dejan de expresarse los receptores de las adhesinas de ETEC en el intestino delgado del

USC DE COMPOSTELA

ternero, de forma que la probabilidad de infección con este patotipo disminuye gradualmente desde las primeras 12 horas de vida a las dos semanas de edad (Runnels *et al.*, 1980; Gyles y Fairbrother, 2010). Esto explicaría por qué las diferencias en las prevalencias observadas a partir de la segunda semana de vida no fueron significativas (p> 0,05).

Tabla 21. Prevalencia de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en función de la edad del ternero.

Edad	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
0-7 días	70/198 (35,4%)	*	*				
8-14 días	14/123 (11,4%)	0,19 (0,07-0,57)	**0,003**	*	*		
15-21 días	5/53 (9,4%)	0,096 (0,02-0,47)	**0,004**	0,5 (0,1-2,49)	0,397	*	*
> 21 días	4/46 (8,7%)	0,079 (0,01-0,56)	**0,011**	0,41 (0,05-3,18)	0,395	0,83 (0,1-6,98)	0,86

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

De igual forma, la máxima prevalencia de BToV se observó en los primeros 7 días de edad (11,1%), y posteriormente se mantuvo en valores en torno al 8% (p>0,05). Otras investigaciones ya habían descrito, en terneros diarreicos, un pico de incidencia de este enteropatógeno en su primera semana (Hoet *et al.*, 2003a; Kirisawa *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2019a), y sugiere que la susceptibilidad de los terneros a mostrar diarrea tras una infección con BToV es máxima durante los primeros días de vida para después reducirse con la edad. Los resultados obtenidos por Kirisawa *et al.* (2007) en terneros asintomáticos refuerzan esta hipótesis, pues el porcentaje de terneros sanos infectados con BToV fue inexistente durante la primera semana de vida, pero se incrementó progresivamente y alcanzó valores similares a los de los animales con diarrea en la cuarta semana. En el caso de STEC, el porcentaje de infección fue también ligeramente más elevado en la primera semana de vida y similar a los observados en la segunda y tercera semana (8-9%), disminuyendo hasta el 2% en la cuarta; sin embargo, estas bajas prevalencias no permitieron detectar diferencias estadísticamente significativas (p> 0,05).

Por el contrario, la prevalencia de otros enteropatógenos alcanza su valor más elevado en la segunda semana de vida. Así, la prevalencia de BNoV fue de un 42% en la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

primera semana y continuó ascendiendo para alcanzar su pico en la segunda, en la que más de la mitad (54,5%) de los animales estaban infectados. En la tercera comenzó a disminuir (49%) y ya en la cuarta se detectó en el 34,8% de las muestras. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ningún caso. El pico de prevalencia de BNoV en torno a la segunda semana coincide con lo descrito por Cho *et al.* (2013) y Castells *et al.* (2020a), aunque en ambos trabajos se observó un descenso muy abrupto en la tercera semana, dando lugar a diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia en los primeros 14 días de vida y el resto del primer mes en el segundo caso (Castells *et al.*, 2020a). Del mismo modo, las infecciones por *Cryptosporidium* spp. fueron significativamente más frecuentes en la segunda semana de edad (Tabla 22), período tras el cual se observó un descenso significativo en la prevalencia. Estos resultados coinciden con estudios previos (De La Fuente *et al.*, 1999; Gillhuber *et al.*, 2014; Soilán, 2014; Díaz *et al.*, 2018b), y están relacionados con la especie involucrada en la inmensa mayoría de las muestras de terneros con diarrea, que es *C. parvum* (Thompson *et al.*, 2007; Quílez *et al.*, 2008b; Díaz *et al.*, 2010, 2018b; Santin, 2020; Jang *et al.*, 2021). Esta especie es muy frecuente en terneros menores de tres semanas y especialmente en aquellos entre los 8 y los 21 días de edad (Soilán, 2014; Santin, 2020).

Tabla 22. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en función de la edad del ternero.

Edad	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
0-7 días	71/198 (41,4%)	*	*				
8-14 días	102/123 (81,3%)	6,37 (3,34-12,16)	**<0,001**	*	*		
15-21 días	34/53 (66%)	2,52 (1,14-5,56)	**0,02**	0,4 (0,17-0,95)	**0,04**	*	*
> 21 días	10/46 (21,7%)	0,46 (0,17-1,23)	0,12	0,07 (0,03-0,21)	**<0,001**	0,18 (0,06-0,53)	**0,002**

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

Por su parte, no se observaron grandes diferencias en las prevalencias de BCoV a lo largo de las cuatro primeras semanas de vida, aunque los porcentajes de infección fueron ligeramente superiores en la primera (9,6%) y tercera (13,2%) semanas de edad, con respecto a la segunda (7%) y a la cuarta (6,5%). Por todo ello, las diferencias observadas no fueron

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

significativas en ningún caso. Un patrón bimodal similar fue descrito por Castells *et al.* (2019), Ammar *et al.* (2014) e Izzo *et al.*, (2011), quienes observaron picos de prevalencia en la primera y cuarta semanas de edad, tras un acusado descenso en la segunda y en la tercera. Además, nuestros resultados coinciden con otras investigaciones que sitúan el porcentaje más elevado de infección en los terneros entre 15 y 30 días de vida (Stipp *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2022). No obstante, en otros estudios la prevalencia más alta correspondió a individuos en su primera y segunda semanas de vida (Bartels *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2019a; Ryu *et al.*, 2020b). La disparidad entre los resultados obtenidos en los distintos trabajos realizados podría tener relación con las diferencias en la inmunidad maternal de los terneros muestreados. Así, los picos de prevalencia en la primera y segunda semanas podrían deberse a un temprano descenso de dicha inmunidad, probablemente debido a un mal encalostrado, ya que se ha demostrado que muchas de las infecciones con BCoV tienen su origen en fallos en la transferencia pasiva de inmunoglobinas (Durham *et al.*, 1979). Por su parte, el repunte de la prevalencia en la tercera y cuarta semana de edad se asociaría a una disminución esperable de la inmunidad calostral a partir de la tercera semana, cuando el animal todavía no es capaz de desarrollar su propia respuesta inmunitaria frente al patógeno (Hulbert y Moisá, 2016).

Los resultados de EHEC son similares a los descritos para BCoV pues, si bien se identificó a lo largo de todo el primer mes de vida, fue significativamente más frecuente en la primera y tercera semanas de edad (Tabla 23). Este patrón difiere de los señalados previamente en terneros con NCD. Así, algunos estudios detectaron mayores prevalencias durante los primeros 14 días, que después fueron disminuyendo (Kang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008); por el contrario, otros autores constataron un aumento del porcentaje de terneros positivos en la tercera semana de vida, alcanzando un pico en la cuarta (Engelen *et al.*, 2021), aunque esto podría deberse a la inclusión de terneros diarreicos y sanos en ese estudio, siendo el porcentaje de infección superior en los animales asintomáticos. En la misma línea, Orden *et al.* (1998) describieron un aumento significativo de la tasa de infección en terneros diarreicos en su cuarta semana con respecto a la primera, si bien en su caso sólo un 55,8% de las cepas verotoxigénicas analizadas contaban con los factores de virulencia correspondientes a EHEC, mientras que el resto correspondían a cepas STEC. Por lo tanto, se necesitan más estudios que permitan dilucidar con exactitud la influencia de la edad de los animales en las infecciones con EHEC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Tabla 23. Prevalencia de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) en función de la edad del ternero.

Edad	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
0-7 días	44/198 (22,2%)	*	*				
8-14 días	13/123 (10,6%)	0,34 (0,13-0,86)	**0,02**	*	*		
15-21 días	16/53 (32,1%)	1,6 (0,54-4,72)	0,39	4,77 (1,34-16,95)	**0,015**	*	*
> 21 días	12/46 (26,1%)	1,43 (0,39-5,31)	0,59	4,27 (0,92-19,87)	0,06	0,9 (0,21-3,83)	0,925

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

Finalmente, el porcentaje de terneros positivos a cinco de los patógenos estudiados (BRoV, BNeV, *G. duodenalis*, *Eimeria* spp., EPEC) se incrementó con la edad. Comenzado por BRoV, el porcentaje de animales positivos a este agente fue del 49,5% en la primera semana de edad y aumentó ligeramente para mantenerse en torno al 60% durante la segunda (59,4%), tercera (60,4%) y cuarta (60,9%), alcanzado su pico en esta última. Este ascenso en la segunda semana de edad se ha descrito previamente (Nourmohammadzadeh *et al.*, 2012; Gomes Rocha *et al.*, 2017; Fritzen *et al.*, 2019), resultando significativo en algunos casos (Alfieri *et al.*, 2006; Bartels *et al.*, 2010), y podría tener su origen en un temprano descenso en la inmunidad maternal, probablemente debido a deficiencias en el encalostrado, mientras que el animal no es capaz de desarrollar su propia respuesta inmunitaria frente al patógeno hasta más allá de la cuarta semana (Alfieri *et al.*, 2006; Hulbert y Moisá, 2016), de forma que entre los siete y los treinta días de vida el ternero es más susceptible a la infección.

Por su parte, la prevalencia de BNeV se incrementó significativamente hasta alcanzar el máximo porcentaje en la tercera semana de edad; la tasa de positivos disminuyó ligeramente en la cuarta semana, pero de forma no significativa (Tabla 24). Este patrón coincide con lo observado por Tråvén *et al.* (2022) en terneros diarreicos y sanos, y podría deberse a que el período de incubación de BNeV sea más prolongado que el de otros virus como BNoV, BRoV o BCoV, mientras que su período de excreción también parece extenderse durante un período de tiempo más largo. No obstante, Cho *et al.* (2013) detectaron el pico de prevalencia de BNeV en la segunda semana de edad, por lo que se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

necesitan más estudios que permitan dilucidar si la edad del ternero influye significativamente sobre la prevalencia de BNeV y su comportamiento.

Tabla 24. Prevalencia del nebovirus bovino (BNeV) en función de la edad del ternero.

Edad	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
0-7 días	28/198 (14,1%)	*	*				
8-14 días	26/123 (21,1%)	1,29 (0,54-3,04)	0,57	*	*		
15-21 días	26/53 (49,1%)	5,19 (1,84-14,6)	**0,002**	4,04 (1,44-11,27)	**0,008**	*	*
> 21 días	14/46 (30,4%)	2,7 (0,77-9,51)	0,12	2,1 (0,57-7,67)	0,26	0,52 (0,15-1,88)	0,32

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

En el caso de *G. duodenalis* se constató que el porcentaje de animales que eliminaron quistes del protozoo se incrementó significativamente con la edad (Tabla 25). Este patrón coincide con el observado en la mayoría de estudios previos (Davoudi *et al.*, 2011; Gillhuber *et al.*, 2014; Lichtmannsperger *et al.*, 2019). Las menores prevalencias observadas en los terneros más jóvenes pueden estar relacionadas con el período de prepatencia, que es de 4-8 días en estos animales (Taminelli *et al.*, 1989; Xiao y Herd, 1994). Es importante señalar que aquellas investigaciones que incluyen animales de mayor edad muestran que estos terneros son los que presentan las prevalencias más elevadas. Así, Gillhuber *et al.* (2014) demostraron que la probabilidad de que un ternero con NCD fuese positivo a *G. duodenalis* era ocho veces superior a los 30 días de vida que a los 12, si bien el pico de prevalencia se observó en los animales de 61-90 días. En la misma línea, Lee *et al.* (2019b), en un estudio en el que incluyeron animales diarreicos y sanos de hasta 60 días de vida, detectaron una probabilidad de infección con *G. duodenalis* cuatro veces mayor en los individuos entre 30 y 41 días de vida que en los de uno a diez días; sin embargo, en este caso el pico de prevalencia se produjo a una edad ligeramente más temprana que en el estudio mencionado anteriormente, entre los 41 y los 50 días de vida.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 25. Prevalencia de *G. duodenalis* en función de la edad del ternero.

Edad	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
0-7 días	13/198 (6,6%)	*	*				
8-14 días	17/123 (13,8%)	2,78 (0,97-7,94)	0,06	*	*		
15-21 días	20/53 (37,7%)	11,61 (3,43-39,29)	**<0,001**	4,18 (1,4-12,45)	**0,01**	*	*
> 21 días	24/46 (52,17%)	17,28 (4,44-67,26)	**<0,001**	6,22 (1,69-22,86)	0,006	1,49 (0,43-5,11)	0,528

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

El análisis de la evolución de la prevalencia de *Eimeria* spp. en función de la edad del ternero muestra un comportamiento similar al observado para *G. duodenalis*, aunque en este caso el porcentaje de terneros que eliminaron ooquistes del protozoo se incrementó de forma muy significativa en la cuarta semana de vida, donde este parásito se detectó en más de la mitad de los animales muestreados (Tabla 26). Dado que en nuestro estudio solo se incluyeron individuos diarreicos, el pronunciado incremento de la frecuencia de este agente en terneros mayores de 21 días de vida podría estar relacionado con la aparición de las principales especies patógenas, *E. bovis* y *E. zuernii*, cuyos períodos de prepatencia oscilan entre 15 y 21 días (Taylor *et al.*, 2016) y cuya prevalencia suele alcanzar su valor máximo entre el segundo y el tercer mes de edad (Gillhuber *et al.*, 2014).

Tabla 26. Prevalencia de *Eimeria* spp. en función de la edad del ternero.

Edad	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
0-7 días	4/198 (2%)	*	*				
8-14 días	2/123 (1,6%)	0,81 (0,07-9,66)	0,869	*	*		
15-21 días	6/53 (11,3%)	3,22 (0,32-32,65)	0,322	3,96 (0,29-53,6)	0,3	*	*
> 21 días	23/46 (50%)	117,28 (9,23-1490,84)	**<0,001**	144,41 (7,74-2694,5)	**<0,001**	36,45 (2,76-482,26)	**0,006**

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, EPEC se detectó en un porcentaje más o menos constante de animales a lo largo de las tres primeras semanas de vida (19,2% en la primera semana; 22% en la segunda; 17% en la tercera), alcanzando el 30,4% en la cuarta semana de edad. Sin embargo, no se constataron diferencias estadísticamente significativas. Esta tendencia, que coincide con la observada por Orden *et al.* (1998), podría estar relacionada con que la infección por EPEC se ha detectado en un elevado porcentaje de animales sanos, que actuarían como portadores asintomáticos (Kolenda *et al.*, 2015). Por tanto, a medida que el animal crece, aumenta el tiempo durante el cual está expuesto a otros animales excretores de EPEC, por lo que existe una mayor probabilidad de que se infecte y comience a excretar el microorganismo (Habets *et al.*, 2020).

Influencia de la consistencia fecal en la prevalencia de cada patógeno

En este estudio también se analizó la existencia de una posible relación entre la prevalencia de cada enteropatógeno y la consistencia de las muestras fecales. En este punto es preciso mencionar que la consistencia fecal no está directamente relacionada con la gravedad de los signos clínicos; sin embargo, este elemento, junto con la edad del animal, podría resultar de gran utilidad para establecer una sospecha etiológica inicial.

En el análisis de este factor se debe considerar el procedimiento seguido para la recogida de muestras. Primeramente, en una explotación donde hay varios animales con diarrea es más sencillo detectar a los terneros que eliminan heces líquidas; por otro lado, también se debe tener en cuenta que es probable que los veterinarios clínicos percibiesen que los animales con heces acuosas estaban más afectados, lo que explicaría que el 59,8% de las muestras recibidas tuvieran esta consistencia. Por este motivo, se debe tener en cuenta que las muestras de casos de diarrea con otra consistencia pueden estar menos representadas.

Al analizar los resultados obtenidos, se comprobó que la presencia de tres patógenos de origen bacteriano, vírico y parasitario (ETEC, BNoV y *Cryptosporidium* spp.) estaba significativamente asociada a la eliminación de heces líquidas. Así, en el caso de ETEC se detectó que el porcentaje de muestras positivas se incrementó al disminuir la consistencia de las heces, constatándose diferencias significativas únicamente entre las heces pastosas y las acuosas (Tabla 27). Estos resultados coinciden con los obtenidos en un reciente meta-análisis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que incluyó 206 estudios, donde se constató la existencia de una fuerte asociación entre la presencia de los factores de virulencia que constituyen este patotipo (F5 y STa) y la aparición de diarrea (Kolenda *et al.*, 2015). La patogenia de las cepas ETEC explica su asociación con la eliminación de heces acuosas; así, mientras la fimbria F5 permite la colonización de la mucosa intestinal, la toxina STa estimula la secreción de agua y reduce su absorción en el intestino, dando lugar a una diarrea secretora con gran cantidad de líquido (Foster y Smith, 2009).

Tabla 27. Prevalencia de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en función de la consistencia de las heces.

Consistencia	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
Pastosa	13/88 (14,77%)	*	*		
Pastosa-acuosa	16/81 (19,75%)	2,42 (0,58-10,08)	0,225	*	*
Acuosa	64/251 (25,5%)	3,73 (1,14-12,21)	**0,03**	1,54 (0,54-4,43)	0,422

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

Del mismo modo, el porcentaje de muestras positivas a BNoV se incrementó significativamente al disminuir la consistencia fecal; así, la probabilidad de ser positivo a BNoV fue entre 2,3 y 3,1 veces más elevada en las heces pastosas-acuosas y líquidas que en las pastosas (Tabla 28). Estos resultados sugieren que BNoV está asociado con la aparición de diarrea en terneros; sin embargo, la información disponible todavía no ha permitido demostrar completamente si este agente actúa como agente primario en la NCD (Gomez y Weese, 2017). Aunque se han publicado estudios que indican que BNoV provoca diarrea en terneros en condiciones experimentales (Otto *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2014), los trabajos realizados en condiciones de campo muestran resultados contradictorios. Así, mientras algunas investigaciones señalan una mayor prevalencia en terneros asintomáticos que en diarreicos (Jor *et al.*, 2010; Ryu *et al.*, 2020b; Tråvén *et al.*, 2022), otras detectaron un mayor porcentaje de infección en terneros con diarrea (van der Poel *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2013; Castells *et al.*, 2020a). Sin embargo, sólo en el estudio de Cho *et al.* (2013) se constataron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de consistencia líquida y las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

heces formadas, mientras que no se hallaron diferencias entre las muestras acuosas y las semisólidas, lo que coincide con nuestros resultados.

Tabla 28. Prevalencia de norovirus bovino (BNoV) en función de la consistencia de las heces.

Consistencia	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
Pastosa	21/88 (23,9%)	*	*		
Pastosa-acuosa	37/81 (45,7%)	2,34 (1,01-5,43)	**0,05**	*	*
Acuosa	132/251 (52,6%)	3,14 (1,53-6,45)	**0,002**	1,34 (0,7-2,57)	0,374

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

La prevalencia de *Cryptosporidium* spp. también se incrementó con la cantidad de agua que contenían las heces, de forma que los animales que eliminaban heces con consistencia acuosa presentaron una probabilidad de estar parasitados con el protozoo casi dos veces superior que los que excretaron heces pastosas (Tabla 29). Estos resultados podrían estar relacionados con la elevada prevalencia de *C. parvum* (98,1% de las muestras positivas a *Cryptosporidium* spp.), que es una especie muy patógena para el ganado vacuno (Santin, 2020). La existencia de una relación entre la infección con *C. parvum* en terneros menores de un mes de vida y la excreción de heces diarreicas está bien documentada (O'Handley *et al.*, 1999; Trotz-Williams *et al.*, 2005; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006), aunque en algunos trabajos no se pudo constatar una relación significativa (Fayer *et al.*, 1998a; Geurden *et al.*, 2007; Silverlås *et al.*, 2010). Aun teniendo en cuenta estas investigaciones, un análisis minucioso de los datos disponibles hasta el momento proporciona evidencias suficientes de que este parásito está asociado con la aparición de NCD, especialmente en aquellos individuos que presentan una mayor intensidad de eliminación de ooquistes (Santin, 2020; Adkins, 2022).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 29. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en función de la consistencia de las heces.

Consistencia	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
Pastosa	39/88 (44,3%)	*	*		
Pastosa-acuosa	39/81 (48,1%)	1,28 (0,61-2,68)	0,518	*	*
Acuosa	149/251 (59,4%)	1,89 (1,03-3,47)	**0,041**	1,48 (0,82-2,68)	0,197

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

También se observó que tres agentes víricos (BRoV, BCoV y BToV) fueron especialmente prevalentes en aquellos animales que eliminaban heces líquidas o pastosas-acuosas, aunque las diferencias no fueron significativas en ningún caso. El primero fue BRoV, que se identificó en un 58,2% de las muestras acuosas y en un 61,7% de las pastosas-acuosas, frente al 34,1% obtenido en terneros que eliminaban heces de consistencia pastosa (p>0,05). La ausencia de diferencias estadísticamente significativas se debe, probablemente, a la elevada prevalencia de este agente en el conjunto de las muestras y a la inclusión en el estudio de terneros procedentes de granjas donde se emplea la vacunación, de forma que, aunque padezcan la infección, sus signos clínicos serían menos intensos (Parreño *et al.*, 2004; Kaplon *et al.*, 2013). Nuestros resultados coinciden con los observados por Bartels *et al.* (2010), Fritzen *et al.* (2019), Al Mawly *et al.* (2015) y Cho *et al.* (2013), donde la presencia de BRoV predominó en animales que eliminaban heces con consistencia pastosa-acuosa y acuosa, aunque la relación solo fue estadísticamente significativa en los dos últimos estudios. A pesar de la ausencia de diferencias significativas en el presente estudio, los datos obtenidos en otras investigaciones sugieren que BRoV actúa como un agente primario de NCD pues su prevalencia en individuos diarreicos fue significativamente mayor que en terneros sanos (Alfieri *et al.*, 2006; Bertoni *et al.*, 2020; Castells *et al.*, 2020b; Caffarena *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022).

El patrón observado para BCoV fue similar al hallado para BRoV, pues su prevalencia fue superior en los animales con diarrea pastosa-acuosa (11,1%) y acuosa (10%) que en los que eliminaban heces con consistencia pastosa (3,4%). La ausencia de una relación significativa entre la consistencia fecal y la presencia de BCoV se ha descrito

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

previamente en bovinos neonatos con diarrea (Lanz Uhde *et al.*, 2008; Bartels *et al.*, 2010; Al Mawly *et al.*, 2015), lo que sugiere que este agente podría actuar como un patógeno oportunista, agravando las infecciones provocadas por otros enteropatógenos concomitantes. De hecho, en este trabajo tan sólo se detectó como único enteropatógeno en un animal; además, Bartels *et al.* (2010) identificaron una mayor prevalencia de este agente en aquellos terneros que habían sufrido episodios de NCD tratados con antibióticos previamente al muestreo, lo que podría ser indicativo de la existencia de una infección previa con enteropatógenos bacterianos que actuarían como agentes primarios. Aunque algunos estudios señalan una asociación entre la presencia de BCoV y la aparición de diarrea (Stipp *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2017; Ryu *et al.*, 2020b), sólo Ryu *et al.* (2020b) tuvieron en cuenta la presencia de otros patógenos en las muestras fecales analizadas. Por lo tanto, se necesitan más datos que permitan establecer el papel de BCoV en la NCD y si es capaz de actuar como un agente primario de NCD en presencia de otros enteropatógenos.

Finalmente, tampoco se detectó una relación entre la infección con BToV y la consistencia fecal, siendo su prevalencia similar en las tres categorías (consistencia pastosa: 6,8%; pastosa-acuosa: 12,3%; acuosa: 9,6%). Aunque se ha descrito que BToV puede actuar como un patógeno entérico *per se* en terneros (Hoet *et al.*, 2003b) y en el ganado vacuno adulto (Aita *et al.*, 2012), su papel en la NCD todavía no se ha determinado con exactitud. La mayoría de los estudios que incluyen terneros sanos y con diarrea muestran que la prevalencia de BToV fue superior en los últimos, pero cabe señalar que su presencia también se detectó en un porcentaje no desdeñable de individuos asintomáticos (Koopmans *et al.*, 1991; Kirisawa *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2020b; Shi *et al.*, 2020). Estos resultados, junto con el hecho de que todas las muestras positivas a BToV contenían otros enteropatógenos, sugieren que, tal y como se ha descrito previamente (Duckmanton *et al.*, 1998a; Hoet *et al.*, 2003a; Park *et al.*, 2008), el papel de este agente en la NCD se limita a incrementar la intensidad de los signos clínicos provocados por la infección con otros enteropatógenos.

Es importante destacar que los restantes agentes parasitarios, *G. duodenalis* y *Eimeria* spp., fueron especialmente prevalentes en los animales que eliminaban heces de consistencia pastosa o pastosa-acuosa, aunque las diferencias solo fueron significativas en el caso del primer patógeno. Así, el porcentaje de muestras donde se identificaron quistes de *G. duodenalis* fue entre 1,6 y 2 veces más elevado en las de mayor consistencia que en las

acuosas, aunque solo se observaron diferencias significativas entre las de consistencia pastosa-acuosa y acuosa (Tabla 30). Estos datos son coherentes con lo descrito por Geurden *et al.* (2010), quienes relacionaron las infecciones con este protozoo con la excreción de heces de pastosas a acuosas, acompañadas de signos clínicos crónicos e intermitentes. Además, se ha encontrado una prevalencia significativamente mayor de este parásito en animales con diarrea (O'Handley *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2016), y un meta-análisis reciente señaló que los terneros diarreicos tienen una probabilidad 2,6 veces mayor de estar infectados con *G. duodenalis* que los animales sanos (Taghipour *et al.*, 2022). Sin embargo, hay estudios en los que no se ha encontrado una relación entre la infección con este parásito y la consistencia de las heces (Gow y Waldner, 2006; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Minetti *et al.*, 2014), y en algunos incluso tampoco se han observado diferencias en el rendimiento productivo de los animales infectados y no infectados (Ralston *et al.*, 2003). Por lo tanto, su elevada frecuencia en animales diarreicos podría ser consecuencia de su ubicuidad, teniendo un papel concomitante y agravando la diarrea causada por las infecciones con otros patógenos o por factores nutricionales o medioambientales (Olson *et al.*, 2004). Sin embargo, otras investigaciones han mostrado que, tras tratar con fenbendazol a individuos diarreicos infectados por *G. duodenalis*, la diarrea remite, sugiriendo una implicación primaria de este patógeno (O'Handley *et al.*, 2000; Geurden *et al.*, 2006b). En consecuencia, son necesarios más estudios que permitan dilucidar por completo si *G. duodenalis* actúa como un patógeno primario en el complejo de la NCD o si únicamente exacerba la diarrea causada por otros enteropatógenos.

Tabla 30. Prevalencia de *G. duodenalis* en función de la consistencia de las heces.

Consistencia	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
Pastosa	19/88 (21,6%)	*	*		
Pastosa-acuosa	22/81 (27,2%)	1,23 (0,44-3,62)	0,71	*	*
Acuosa	33/251 (13,1%)	0,44 (0,16-1,21)	0,11	0,36 (0,14-0,9)	**0,03**

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

El porcentaje de infección con *Eimeria* spp. no se alteró significativamente con la consistencia de las heces, si bien su presencia fue más frecuente en las muestras pastosas

(12,5%) y pastosas-acuosas (11,1%) que en las acuosas (5,6%). Estos resultados podrían deberse a que las infecciones detectadas en las tres primeras semanas estaban provocadas por especies de baja o moderada patogenicidad, de forma que la diarrea detectada en esos animales se debía otros enteropatógenos que actuaban como agentes primarios. Sin embargo, a partir de los 21 días de vida, la aparición de las especies más patógenas contribuiría a una mayor gravedad de los signos clínicos, incluyendo la eliminación de heces líquidas con presencia de sangre, que se manifestaría especialmente hacia el segundo mes de edad (Mitchell *et al.*, 2012; Delling y Daugschies, 2022).

De todos los enteropatógenos estudiados, solo EHEC fue significativamente más prevalente en las heces de consistencia pastosa (Tabla 31), lo que podría ser indicativo de una baja patogenicidad en terneros. Aunque se ha comprobado que EHEC puede causar diarrea en terneros (Moxley y Smith, 2010), la ausencia de receptores para la toxina Stx en el endotelio vascular de los bóvidos impide que la infección con este patotipo y/o con STEC, pueda dar lugar a enfermedad sistémica (Moxley y Smith, 2010; Kolenda *et al.*, 2015), pero sus mecanismos de inmunomodulación y colonización intestinal le permiten sobrevivir y multiplicarse en el intestino (Menge *et al.*, 1999; Moxley y Smith, 2010; Etcheverría y Padola, 2013). Por lo tanto, teniendo en cuenta que en nuestro estudio el pico de prevalencia de EHEC se alcanzó entre los 15 y los 30 días de vida, es probable que la presencia de este patotipo no esté relacionada con la aparición de NCD en la mayoría de los animales infectados. Esta hipótesis se vería apoyada por diversos trabajos donde no se encontraron grandes diferencias en la prevalencia de EHEC entre terneros diarreicos y sanos en la tercera y cuarta semana de vida (Lee *et al.*, 2008; Kolenda *et al.*, 2015), y en algunos incluso se detectó una mayor prevalencia en individuos sanos que en diarreicos (Blanco *et al.*, 1993b, 1996; Engelen *et al.*, 2021).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 31. Prevalencia de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) en función de la consistencia de las heces.

Consistencia	Prevalencia	OR (IC95%)	*p*	OR (IC95%)	*p*
Pastosa	29/88 (32,96%)	*	*		
Pastosa-acuosa	16/81 (19,75%)	0,36 (0,13-1,04)	0,06	*	*
Acuosa	40/251 (15,94%)	0,3 (0,13-0,69)	**0,005**	0,82 (0,32-2,14)	0,68

Las diferencias significativas se señalan en negrita. Los asteriscos (*) indican la categoría de referencia.

De forma similar, la literatura previa sugiere que EPEC y STEC no actúan como patotipos diarreagénicos en el ganado bovino, habiéndose detectado prevalencias elevadas de ambos en animales sanos (Kolenda *et al.*, 2015). En nuestro caso, no hemos encontrado ninguna relación estadísticamente significativa entre EPEC y STEC y la consistencia de las heces, detectándose una prevalencia similar en todas las categorías (en torno al 20% para EPEC y entre el 2 y el 10% para STEC), por lo que estos resultados refuerzan la hipótesis de que estos patotipos no están asociados con la NCD. Finalmente, la prevalencia de BNeV fue similar (p>0,05) en todas las categorías (pastosa: 17%; pastosa-acuosa: 21%; acuosa: 24%). Estos resultados coinciden con lo señalado por Cho *et al.* (2013), quienes no observaron diferencias significativas en el porcentaje de terneros con diarrea positivos a BNeV que eliminaban heces con consistencia acuosa y pastosa-acuosa. En este sentido, Tråvén *et al.* (2022) sugirieron que este agente no actúa como agente primario para la aparición de la NCD, lo que coincide con lo observado en nuestro estudio, pues las diferencias en la prevalencia entre categorías fueron escasas, y siempre se detectó formando parte de infecciones mixtas con otros enteropatógenos, salvo en una muestra. Sin embargo, es preciso mencionar que Cho *et al.* (2013) y Guo *et al.* (2019) detectaron la existencia de una relación significativa entre la infección por BNeV y la aparición de NCD, y Di Martino *et al.* (2011) sólo identificaron este virus en terneros con diarrea en un estudio donde también se incluyeron ejemplares sanos.

La aparición de un caso de diarrea neonatal en una granja bovina es un desafío para el veterinario, pues el proceso es plurietiológico y multicausal; de hecho, la sintomatología clínica es muy similar, independientemente del enteropatógeno implicado en el brote. Por

USC
DE COMPOSTELA

todo ello, y como se señaló anteriormente, el análisis de la posible influencia de la edad y de la consistencia fecal sobre la prevalencia de los diferentes enteropatógenos puede ser muy útil para el veterinario clínico que se enfrente a un brote de NCD en una explotación de ganado vacuno, pues puede facilitar el establecimiento de una primera sospecha etiológica. Así, nuestros resultados revelan que la presencia de ETEC es muy probable en terneros menores de 7 días con una diarrea muy acuosa, mientras que se debe sospechar de *Cryptosporidium* spp. y BNoV en animales de 8-21 días que eliminan heces líquidas. Además, hay una elevada probabilidad de que los animales estén infectados con *G. duodenalis* y *Eimeria* spp. si las heces son pastosas-acuosas, siendo especialmente frecuente el primero en terneros de 3-4 semanas de vida, y el segundo en los de 4 semanas. Por último, se debería sospechar de EHEC en terneros de más de 15 días que eliminen heces pastosas. Obviamente, esta sospecha debe complementarse con otros datos clínicos y epidemiológicos que se obtengan tras el examen clínico reglado del animal y una adecuada anamnesis y, finalmente, confirmarla mediante análisis en el laboratorio.

3.3.2. Análisis integrado de los enteropatógenos

Aunque los datos de prevalencia obtenidos en el apartado 3.3.1. para cada uno de los enteropatógenos en terneros con NCD son de gran interés desde un punto de vista clínico y epidemiológico, se debe considerar que muchos de estos agentes pueden también encontrarse en animales clínicamente sanos. En este caso, el análisis de las co-infecciones puede ser muy útil, pues las infecciones mixtas no son tan frecuentes en los animales asintomáticos, considerándose que la mayoría de los brotes de NCD son el resultado de infecciones mixtas (Cho y Yoon, 2014; García-Meniño *et al.*, 2015; Brunauer *et al.*, 2021). Por tanto, un análisis integrado de los datos obtenidos aportará información sobre las asociaciones, tanto de índole sinérgica como antagónica, entre los diferentes enteropatógenos, lo que sin duda permitirá comprender mejor los mecanismos patogénicos de este proceso. Cabe mencionar que éste es un análisis transversal de un momento concreto, dado que en nuestro caso solo se tomó una muestra de cada animal; de este modo, la realización de un seguimiento longitudinal permitiría completar este conocimiento con la evolución de las interacciones detectadas entre los diferentes agentes implicados en la NCD.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nuestros resultados muestran que tan sólo el 15% de los terneros con NCD fueron positivos a un único patógeno, mientras que en el 82,1% de los casos se identificaron infecciones mixtas. El porcentaje de infecciones mixtas obtenido en este estudio es notablemente superior a los descritos en trabajos previos realizados en España (15,7-42,5%) (De La Fuente *et al.*, 1998; García-Meniño *et al.*, 2015; Benito *et al.*, 2020) y en Europa (19,7-32,6%) (Lanz Uhde *et al.*, 2008; Bartels *et al.*, 2010; Gillhuber *et al.*, 2014), lo que probablemente se deba a que los análisis realizados tan solo incluyen cuatro o cinco patógenos. No obstante, la prevalencia de las co-infecciones en nuestro estudio también es notablemente superior a las obtenidas en trabajos previos en que se analizaron un mayor número de agentes. Así, Cho *et al.* (2013), en un estudio realizado en Estados Unidos, detectaron un 55% de infecciones mixtas tras examinar la presencia de 11 enteropatógenos en terneros diarreicos de hasta 90 días de vida, mientras que Lee *et al.* (2019a), en Corea del Sur, identificaron un 42% de co-infecciones al analizar la prevalencia de 14 agentes en individuos diarreicos de hasta 13 semanas de vida. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que la inmensa mayoría de los brotes de NCD en el noroeste de España son el resultado de la interacción de varios enteropatógenos, lo que refuerza la idea de que es necesario ampliar los paneles diagnósticos de rutina que se emplean en los laboratorios. Además, es preciso tener en cuenta que en este trabajó no se analizó la presencia de otros agentes que se ha sugerido que podrían estar implicados en la NCD, como el astrovirus bovino o el enterovirus bovino (Gomez y Weese, 2017), por lo que el porcentaje de infecciones mixtas podría ser todavía mayor.

Infecciones simples

Al analizar la importancia de los diferentes agentes causales que se detectaron en las infecciones simples destacaron los patotipos de *E. coli* que, en conjunto, representaron el 54% de todas ellas. ETEC fue el más frecuente, responsable del 21% de las infecciones provocadas por un solo agente, seguido por EHEC, con un 15,9% de prevalencia, mientras que EPEC y STEC se detectaron en un 9,5% y 7,9% de las infecciones simples, respectivamente (Figura 9). El claro predominio de ETEC y EHEC en las infecciones simples está probablemente relacionado con la aparición de ambos patotipos en edades muy tempranas; así, se debe considerar que la gran mayoría (69,8%) de todas las infecciones simples correspondieron a animales menores de siete días. Por otro lado, debido a que la

USC UNIVERSIDADE

mayoría del resto de los patógenos presentan períodos de incubación o prepatencia más prolongados, no se puede excluir la posibilidad de que algunos de estos terneros presentasen infecciones mixtas, imposibles de detectar en el momento de la toma de muestras. Otros agentes también representaron un importante porcentaje de todas las infecciones simples, como *C. parvum* (15,9%), BRoV (14,3%) y BNoV (9,5%); este importante porcentaje probablemente está relacionado con su elevada prevalencia en el conjunto del estudio, pues son los tres agentes más comunes, y sugiere que podrían actuar como patógenos primarios. Finalmente, el resto de enteropatógenos supuso un porcentaje muy reducido de todas las infecciones simples (menos del 2%), indicando que su aparición en casos de NCD es principalmente en co-infección con otros enteropatógenos, lo que podría ser indicativo de que su papel en la NCD sea secundario, estando asociado a la presencia de otros agentes primarios.

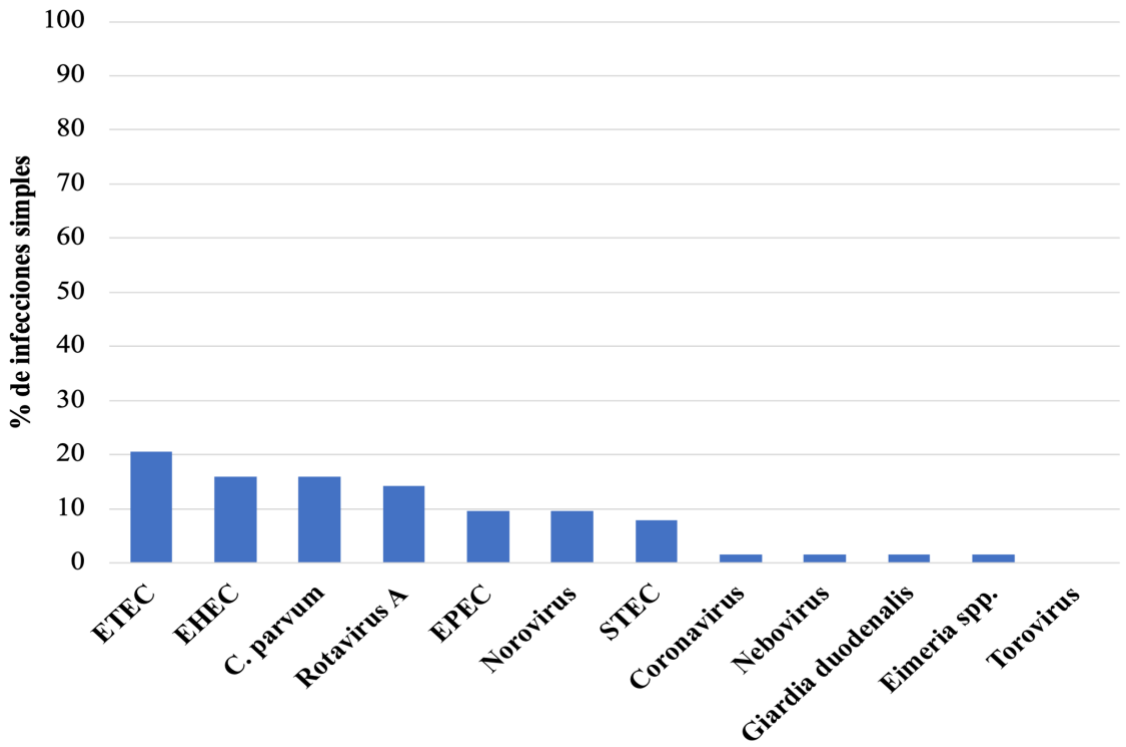


Figura 9. Prevalencia de los enteropatógenos incluidos en el estudio en las infecciones simples. ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; EPEC: *E. coli* enteropatógena; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Infecciones mixtas

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las muestras (82,1%) fueron positivas a varios enteropatógenos. Al considerar la edad de los animales, se apreció que las co-infecciones fueron especialmente frecuentes en los terneros en su tercera (94,3%) y cuarta (95,7%) semanas de edad con respecto a la primera y la segunda semana (73,2% y 86,2%, respectivamente). Se identificaron 172 combinaciones de patógenos, detectándose infecciones de hasta siete patógenos diferentes. Las asociaciones integradas por dos, tres o cuatro patógenos fueron las más frecuentes y representaron el 82% de todas las infecciones mixtas (Figura 10). La elevada frecuencia de las infecciones dobles coincide con lo observado en numerosos estudios previos (15,7%-42,4%) (De La Fuente *et al.*, 1998; Lanz Uhde *et al.*, 2008; Izzo *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2013; Gillhuber *et al.*, 2014; García-Meniño *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2019a; Benito *et al.*, 2020). Sin embargo, la prevalencia de las infecciones triples y cuádruples en este trabajo fue notablemente superior a la descrita anteriormente, incluso en aquellos estudios en que se analiza un mayor número de patógenos. Así, Cho *et al.* (2013), tras analizar la presencia de 11 enteropatógenos, detectaron un 16% de infecciones integradas por tres agentes y un 5,5% constituidas por cuatro. De la misma forma, en un estudio realizado por Lee *et al.* (2019a) en el que se incluyeron 14 enteropatógenos, las infecciones triples tan sólo representaron el 5,5% de los casos y las cuádruples el 3,7%. No obstante, de forma similar a nuestro trabajo, tanto Cho *et al.* (2013) como Lee *et al.* (2019a) detectaron un pequeño porcentaje de infecciones constituidas por más de cuatro agentes (7% y 0,6%, respectivamente), sin bien en ninguno de esos estudios se detectaron siete agentes en una misma muestra. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la mayoría de los análisis que se realizan en los laboratorios sólo incluyen la identificación de cuatro enteropatógenos, nuestros resultados señalan que, con frecuencia, se realizan diagnósticos etiológicos incompletos, lo que resulta en la aplicación de medidas de control que no son completamente eficaces.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

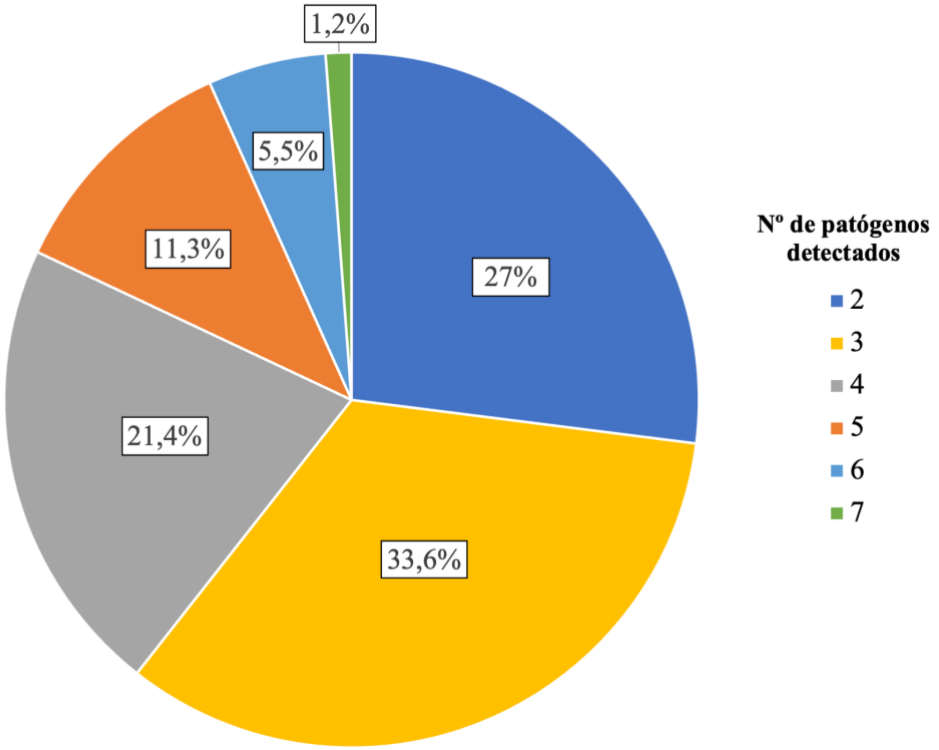


Figura 10. Prevalencia de las infecciones mixtas al considerar el número de patógenos identificados.

Al analizar el porcentaje de positivos a cada enteropatógeno al considerar únicamente las infecciones mixtas, se apreció que todos los agentes aparecen en combinación con otros en más de un 85% de los casos. No obstante, esto es especialmente reseñable en el caso de BToV, que se detectó exclusivamente en co-infecciones, y de BNeV y *G. duodenalis*, que formaban parte de infecciones mixtas en un 98,9% y un 98,6% de los casos (Figura 11). La prevalencia de cada patógeno en las infecciones mixtas se refleja en la Figura 12 y, como era de esperar, está relacionada con la prevalencia individual de cada uno de los agentes y con las combinaciones más frecuentemente detectadas (Figura 13).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

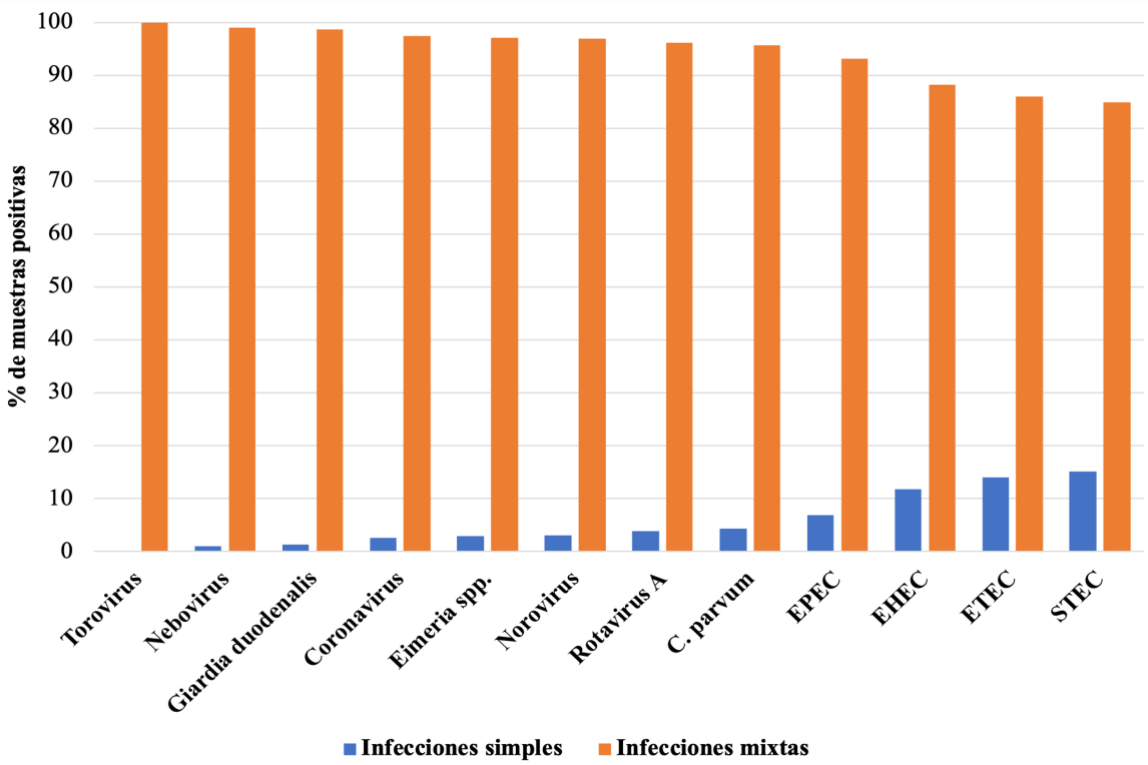


Figura 11. Porcentaje de muestras positivas a cada enteropatógeno que corresponden a infecciones simples y mixtas. *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum;* EPEC*: E. coli* enteropatógena*;* ETEC*: E. coli* enterotoxigénica*;* EHEC*: E. coli* enterohemorrágica*;* STEC*: E. coli* productora de toxinas Shiga.

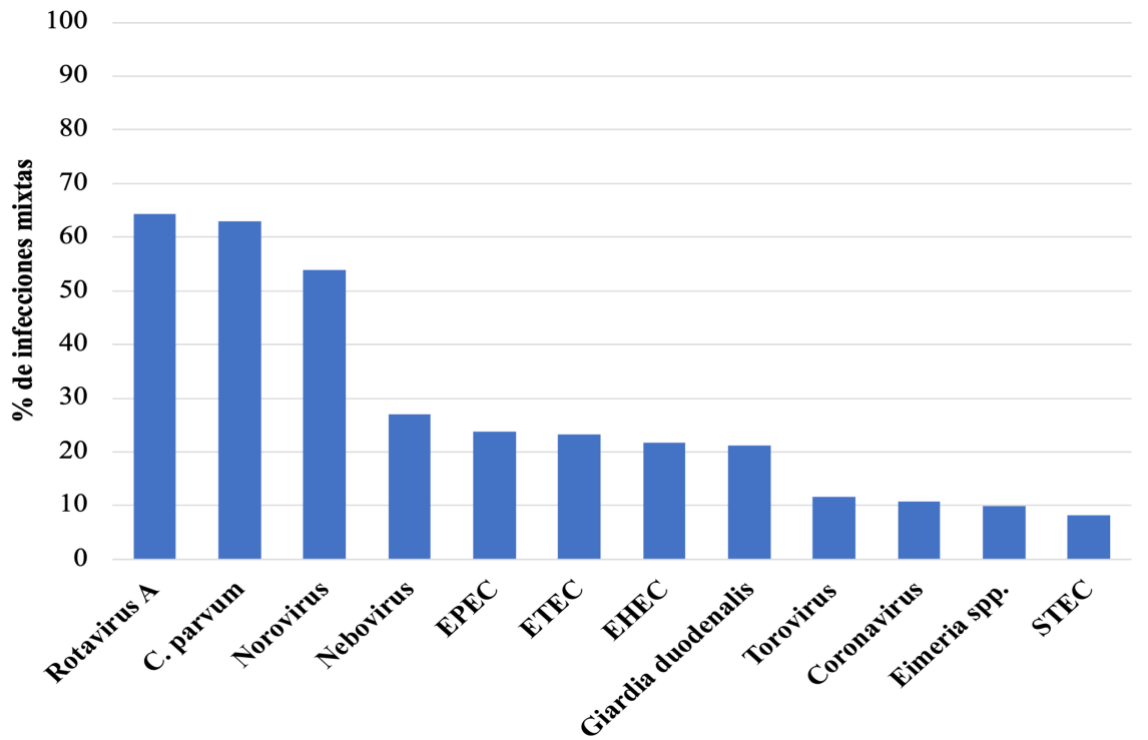


Figura 12. Porcentaje de muestras positivas a cada enteropatógeno al considerar únicamente las infecciones mixtas. *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; EPEC: *E. coli* enteropatógena; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga.

En la Figura 13, donde se representan las infecciones mixtas más frecuentes en terneros con NCD menores de un mes, se puede apreciar que las co-infecciones integradas únicamente por uno o varios virus y *C. parvum* fueron las más abundantes, constituyendo un 20,9% de todas las infecciones mixtas. Estos resultados coinciden con lo observado en estudios previos (De La Fuente *et al.*, 1999; García *et al.*, 2000; Lanz Uhde *et al.*, 2008; Göhring *et al.*, 2014; Conrady *et al.*, 2021; Delling y Daugschies, 2022) y podrían tener su origen en que, generalmente, la acción patógena de los agentes víricos suele traducirse en un mayor o menor grado de inmunosupresión que puede ser aprovechado por *C. parvum* (Cho *et al.*, 2013).

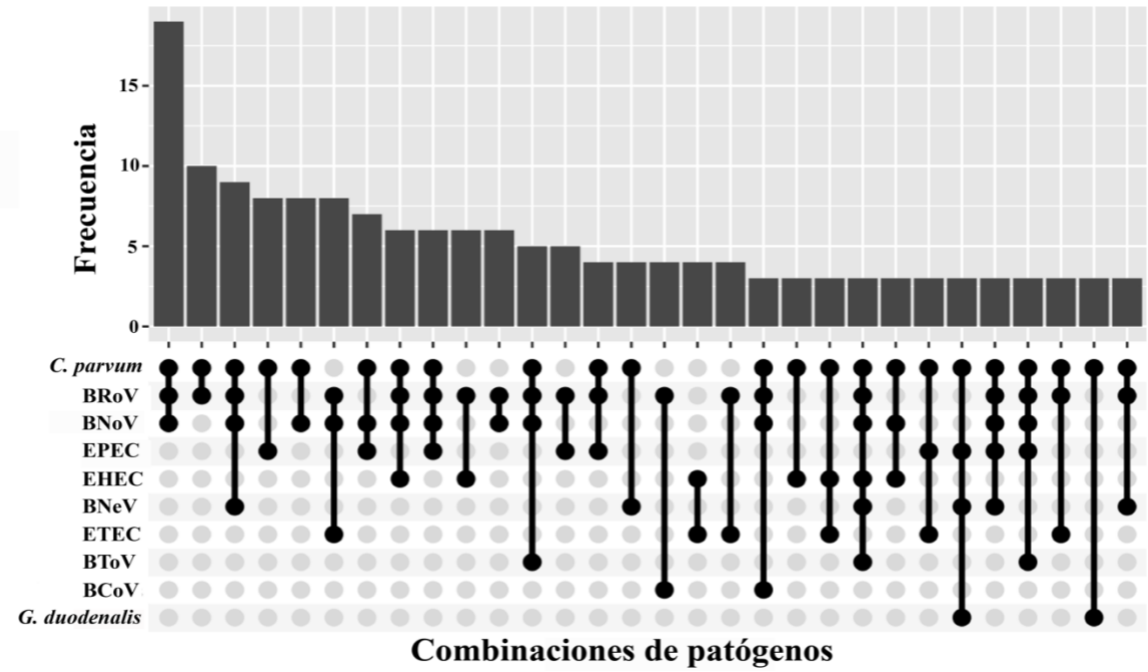


Figura 13. Treinta combinaciones de patógenos más frecuentes en el conjunto de las infecciones mixtas. *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; BRoV: rotavirus A bovino; BNoV: norovirus bovino; EPEC: *E. coli* enteropatógena; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; BNeV: nebovirus bovino; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; BToV: torovirus bovino; BCoV: coronavirus bovino; *G. duodenalis*: *Giardia duodenalis.*

Cuando se procedió a analizar la existencia de interacciones ente los enteropatógenos incluidos en el estudio y su sentido, se identificaron 21 interacciones significativas (Tabla 32). No obstante, al estudiar estas asociaciones mediante un análisis de redes se observaron muchas interconexiones sin un claro patrón de relación entre ellas. Dentro de estas interacciones destaca la relación significativamente negativa de ETEC con BNeV, *C.*

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

parvum y *Eimeria* spp. Estos datos explicarían la escasa prevalencia de la co-infección con *C. parvum* y ETEC observada en investigaciones previas realizadas en terneros diarreicos neonatos (0-4,8%) (De La Fuente *et al.*, 1998; Lanz Uhde *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2013; Gillhuber *et al.*, 2014; Göhring *et al.*, 2014; Brunauer *et al.*, 2021; Conrady *et al.*, 2021). Es muy probable que el origen de estas diferencias esté relacionado con el momento en que estos agentes son más frecuentes, ya que, como se ha descrito previamente, la edad influye de manera estadísticamente significativa en su prevalencia. Así, ETEC aparece fundamentalmente en los primeros días de vida, mientras que *C. parvum* es significativamente más frecuente en la segunda y la tercera semana, BNeV en la tercera y *Eimeria* spp. en la cuarta (Foster y Smith, 2009; Gillhuber *et al.*, 2014; Santin, 2020; Tråvén *et al.*, 2022).

Continuando con los demás patotipos de *E. coli*, resulta destacable la interacción antagónica entre ellos; nuestros datos revelan que es significativamente improbable que EPEC, EHEC y STEC se detecten juntos en terneros diarreicos. Este hecho podría deberse a la producción de bacteriocinas por parte de estos patotipos. Las bacteriocinas son péptidos que sintetizan algunas bacterias y que actúan como antimicrobianos naturales, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos (Hrala *et al.*, 2021). Existen numerosas cepas de *E. coli* capaces de producir bacteriocinas, que pueden ser de dos tipos: colicinas y microcinas (Cascales *et al.*, 2007; Duquesne *et al.*, 2007; Bosák *et al.*, 2021). El espectro de acción de algunas de ellas alcanza una amplia diversidad de enterobacterias mientras que otras tienen como objetivo determinadas cepas de *E. coli* y otras especies relacionadas filogenéticamente con las que compiten (Bosák *et al.*, 2021). En este sentido, se ha comprobado que algunas bacteriocinas obtenidas de *E. coli* de la microbiota fecal del ganado vacuno son capaces de inhibir el crecimiento de algunas cepas de EHEC (Cameron *et al.*, 2019; Mushtaq *et al.*, 2021). Aunque no se dispone de estudios sobre la producción de bacteriocinas por patotipos patógenos de *E. coli* en bóvidos, en porcino se ha detectado que esta característica está presente en más del 60% de las cepas de STEC y ETEC procedentes de animales con diarrea (Abraham *et al.*, 2014; Bosák *et al.*, 2019). Además, en esta misma especie, se ha observado que las cepas de ETEC y STEC patógenas son más susceptibles a la acción de las bacteriocinas que las cepas comensales de *E. coli* (Hrala *et al.*, 2021). Por lo tanto, es posible que cada uno de los patotipos diarreagénicos de *E. coli* analizados en este estudio produzcan bacteriocinas que inhiban el crecimiento de los demás, lo que explicaría las interacciones

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

significativamente negativas detectadas entre ellos que, además, como veremos posteriormente, se manifiestan en todas las semanas de edad. No obstante, se necesitan nuevos estudios sobre esta materia que permitan confirmar esta hipótesis.

Por otra parte, EPEC, EHEC y STEC forman asociaciones estadísticamente significativas con otros agentes de naturaleza vírica (BNeV y BToV) y parasitaria (*C. parvum, G. duodenalis* y *Eimeria* spp.), lo que puede deberse a dos motivos. Por un lado, la infección con enteropatógenos víricos, como se ha mencionado previamente, puede provocar una inmunosupresión que predispondría al ternero a infecciones secundarias con estos patotipos, sobre todo teniendo en cuenta su elevado grado de ubicuidad (La Ragione *et al.*, 2009; Kolenda *et al.*, 2015). Por otro, la existencia de una infección con un agente primario que provoque lesiones en el íleon y en el intestino grueso facilitaría la colonización y el aumento de la excreción fecal de estos patotipos. Este hecho se ha descrito en corderos, donde la inoculación de una cepa de EHEC a animales previamente infectados con *C. parvum* dio lugar a mayores niveles de excreción de la bacteria que la inoculación del mismo aislado a individuos sin infecciones previas (La Ragione *et al.*, 2006). Por lo tanto, esta hipótesis explicaría la interacción positiva de EPEC con *C. parvum*, ya que ambos agentes pueden causar lesiones en el íleon (Nataro y Kaper, 1998; O'Handley y Olson, 2006); y de EHEC con *Eimeria* spp., pues ambos actúan sobre el intestino grueso (Kaper *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2016).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 32. Interacciones significativas observadas entre los patógenos implicados en la NCD en terneros menores de un mes de vida del noroeste de España. Los resultados significativos se señalan en negrita.

Enteropatógenos implicados[1]		Frecuencia observada	Probabilidad de concurrencia	Frecuencia esperable	*p*-valor de que no se detecten juntos	*p*-valor de que se detecten juntos
ETEC	BNeV	14	0,050	20,8	**0,034**	0,983
ETEC	*C. parvum*	33	0,111	46,5	**0,001**	0,999
ETEC	*Eimeria* spp.	3	0,016	7,7	**0,028**	0,993
EPEC	STEC	0	0,016	6,9	**<0,001**	1
EPEC	EHEC	0	0,042	17,8	**<0,001**	1
EPEC	*C. parvum*	52	0,105	44	0,979	**0,036**
EPEC	*G. duodenalis*	24	0,037	15,5	0,997	**0,007**
STEC	EHEC	0	0,016	6,7	**<0,001**	1
STEC	BNeV	12	0,018	7,4	0,983	**0,041**
EHEC	BToV	13	0,019	8,1	0,984	**0,039**
EHEC	*Eimeria* spp.	13	0,017	7,1	0,996	**0,012**
BRoV	BToV	31	0,017	7,1	0,999	**0,002**
BRoV	BNoV	136	0,251	105,6	1	**<0,001**
BRoV	BNeV	61	0,123	51,7	0,989	**0,019**
BToV	BNoV	27	0,044	18,3	0,999	**0,003**
BNoV	BNeV	54	0,102	43	0,997	**0,007**
BNoV	*C. parvum*	119	0,229	96	1	**<0,001**
BNeV	*C. parvum*	55	0,112	47	0,977	**0,039**
BNeV	*G. duodenalis*	29	0,039	16,6	0,999	**<0,001**
C. parvum	*Eimeria* spp.	5	0,042	17,5	**<0,001**	1

Tabla 32. Continuación.

Enteropatógenos implicados[1]		Frecuencia observada	Probabilidad de concurrencia	Frecuencia esperable	*p*-valor de que no se detecten juntos	*p*-valor de que se detecten juntos
G. duodenalis	*Eimeria* spp.	19	0,015	6,2	1	**<0,001**

[1] ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; BNeV: nebovirus bovino; *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga; EPEC: *E. coli* enteropatógena; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; BToV: torovirus bovino; BRoV: rotavirus A bovino; BNoV: norovirus bovino; *G. duodenalis: Giardia duodenalis.*

En lo que respecta a BRoV, muestra una relación estadísticamente significativa con BToV, BNoV y BNeV. No obstante, es preciso señalar que la aparición de BToV en conjunto con BRoV siempre se produce en presencia de BNoV. Por su parte, BNoV, también está muy asociado a *C. parvum*. Así, BRoV, BNoV y *C. parvum* constituyen la infección mixta más frecuentemente detectada en este estudio, y junto con BNeV forman la tercera combinación más abundante. Estos resultados indican que los calicivirus actúan como la piedra angular de buena parte de las co-infecciones detectadas en este estudio, lo que se ve apoyado por su escasa prevalencia como patógenos individuales (3,1% de las muestras positivas a BNoV; 1,1% de las positivas a BNeV). Su papel en las infecciones mixtas podría ser el de provocar una inmunosupresión que favoreciese la infección por otros agentes, como han sugerido previamente Cho *et al.* (2013). Esta hipótesis se vería apoyada por el hecho de que BNeV y BNoV no se encontraron en co-infección por sí solos en ningún caso; por el contrario, en presencia de otros agentes, la presencia de BNeV está fuertemente asociada a la de BNoV. No obstante, este efecto no se produce a la inversa, lo que probablemente se deba a que la prevalencia de BNoV es notablemente más elevada. Así, un 57,5% de los animales infectados con BNeV también lo estaban con BNoV y la presencia de ambos agentes se identificó en un 12,9% de las muestras, lo que constituye un porcentaje mayor que los obtenidos en estudios previos (0,4%-5,1%) (Kaplon *et al.*, 2011; Pourasgari *et al.*, 2018; Tråvén *et al.*, 2022), si bien el tamaño muestral de los mismos es más reducido que el nuestro.

En contraste, no hemos detectado una relación significativa entre BRoV y *C. parvum*. Esta combinación fue, por sí sola, la segunda más frecuente en nuestro estudio y ambos patógenos aparecen implicados en la primera y la tercera asociación más abundantes, estando presentes en conjunto en un 30% de las 420 muestras analizadas. La elevada frecuencia de esta co-infección va en la línea de lo señalado por los trabajos previos, que detectaron prevalencias de entre un 9,41% y un 24,8% (De La Fuente *et al.*, 1998; Lanz Uhde *et al.*, 2008; Izzo *et al.*, 2011; Gillhuber *et al.*, 2014; Göhring *et al.*, 2014; Brunauer *et al.*, 2021; Conrady *et al.*, 2021; Renaud *et al.*, 2021). No obstante, Brunauer *et al.*, (2021) señalaron que los animales previamente infectados con BRoV tienen una menor probabilidad de infectarse posteriormente con *C. parvum*, ya que las alteraciones celulares provocadas por el primero podrían afectar a la capacidad de adhesión del segundo. Sin embargo, Tzipori *et al.* (1981) constataron que, en corderos, una infección por *C. parvum* no

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

repercutía sobre posteriores infecciones por BRoV, lo que podría deberse a que *C. parvum* ejerce su acción patógena sobre los enterocitos de las vellosidades del tramo final del yeyuno y del íleon, mientras que el tramo intestinal que podría verse afectado por la infección con BRoV es más amplio (O'Handley y Olson, 2006; Desselberger, 2014). Teniendo en cuenta que, en la mayoría de los casos, la infección con BRoV posterior a la infección con *C. parvum* se produciría en animales en su cuarta semana de edad, que representan tan sólo el 11% de las muestras de este estudio, la ausencia de interacción entre ambos patógenos podría ser indicativa de que su detección conjunta tan frecuente es simplemente producto de su elevada prevalencia individual.

Un análisis exhaustivo de la literatura publicada permite demostrar la ausencia de estudios previos que analicen la evolución de las co-infecciones en función de la edad del animal. Puesto que la presencia individual de algunos enteropatógenos está relacionada de forma significativa con este factor, como se ha demostrado anteriormente, es esperable que también influya sobre sus diferentes combinaciones (Figuras 14, 17, 19 y 21). Obviamente, estos datos serán de gran utilidad para el veterinario clínico que se enfrente a un brote de NCD en una explotación de ganado vacuno.

Comenzando por la primera semana, las infecciones dobles (31%) y triples (32,4%) supusieron un 63,4% del total de infecciones mixtas. Se detectaron cuatro agentes en un 21,4% de las co-infecciones de este período, mientras que la proporción de las integradas por cinco agentes fue de un 9,7%. Las infecciones mixtas con seis o siete agentes fueron anecdóticas y sólo se identificaron en el 4,8% y 0,7% de los casos, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 14, las combinaciones más frecuentes están integradas por ETEC y uno o varios virus, o por *Cryptosporidium* spp. y otros virus entéricos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

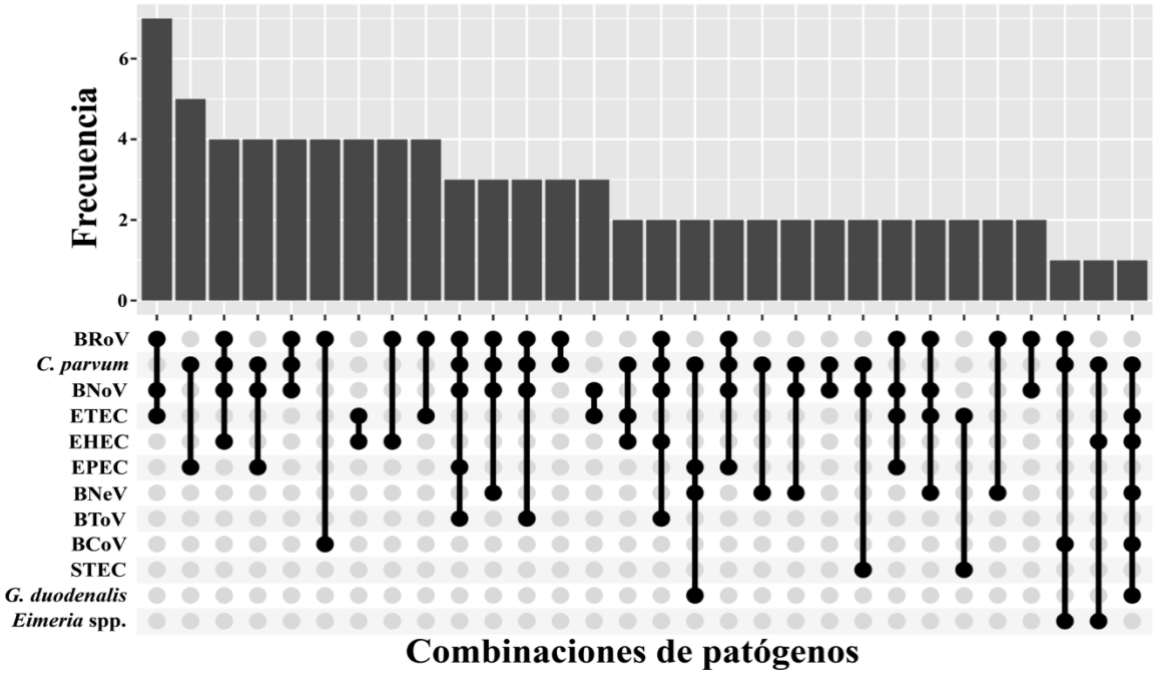


Figura 14. Treinta combinaciones de patógenos más frecuentes en la primera semana de edad. BRoV: rotavirus A bovino; *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; BNoV: norovirus bovino; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; EPEC: *E. coli* enteropatógena; BNeV: nebovirus bovino; BToV: torovirus bovino; BCoV: coronavirus bovino; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga; *G. duodenalis*: *Giardia duodenalis.*

Sin embargo, el análisis de co-ocurrencias de la primera semana (Figura 15) permitió comprobar que la mayoría de las interacciones positivas están constituidas por BRoV y otros agentes víricos (BToV, BNoV y BCoV) que, como se ha señalado previamente, tendrían un efecto inmunosupresor (Cho *et al.*, 2013). También se constató la presencia de una interacción positiva entre *C. parvum* y *G. duodenalis*, así como de cada uno de estos protozoos con BNeV y EPEC. La interacción de BNeV con *C. parvum* y *G. duodenalis* podría tener dos causas: por un lado, el posible papel inmunosupresor de BNeV, que facilitaría el desarrollo de ambos protozoos y, por otro, la patogenia de la infección con cada uno de estos agentes. Tanto BNeV como *G. duodenalis* provocan lesiones de mayor entidad en tramos proximales del intestino delgado (Adam, 2021; Castells y Colina, 2021), por lo que una infección primaria con el calicivirus favorecería el desarrollo posterior del protozoo. Por su parte, *C. parvum* afecta fundamentalmente al íleon (O'Handley y Olson, 2006), de forma que la infección con este agente reduciría la reabsorción de agua que compensase las pérdidas debidas a las lesiones del tramo proximal (provocadas por BNeV y/o *G.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

duodenalis), lo que favorecería la diarrea (Naylor, 2009). Esta misma hipótesis podría ser también el origen de la interacción del EPEC con *C. parvum y G. duodenalis*, ya que este patotipo bacteriano causa lesiones en el íleon y en el intestino grueso (Nataro y Kaper, 1998), lo que favorecería la acción patógena de *C. parvum* e impediría la reabsorción de agua compensatoria tras las pérdidas ocasionadas por las lesiones debidas a la infección con *G. duodenalis*.

Además, el análisis permitió detectar varias interacciones negativas, destacando la de ETEC y *C. parvum*. Esto se debe, muy probablemente, al momento en que estos patógenos son más frecuentes: así, ETEC es especialmente frecuente en los primeros 4 días de vida (Foster y Smith, 2009), mientras que *Cryptosporidium* spp. presenta un período de prepatencia de 2-3 días y su prevalencia empieza a incrementarse de forma notable a partir de los 5-6 días de vida (Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Soilán, 2014). Por ello, las infecciones mixtas entre estos dos patógenos son poco frecuentes. También se observó una interacción negativa entre EPEC y otros patotipos de *E. coli* como EHEC y STEC, que podría tener su origen en la ya comentada posible producción de bacteriocinas por parte de cada uno de estos patotipos que inhiban el crecimiento de los demás.

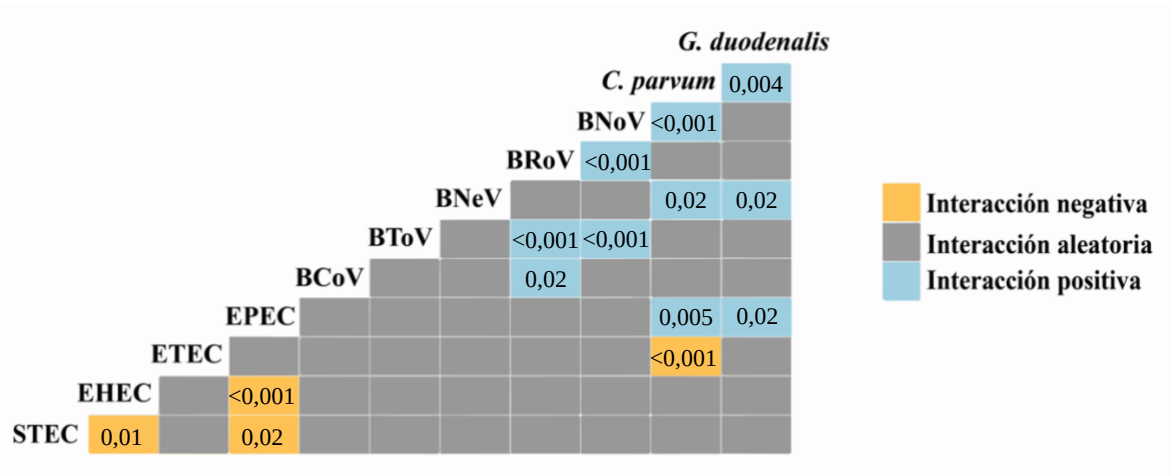


Figura 15. Interacciones significativas positivas y negativas detectadas en la primera semana de edad. *G. duodenalis*: *Giardia duodenalis*; *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; BNoV: norovirus bovino; BRoV: rotavirus A bovino; BNeV: nebovirus bovino; BToV: torovirus bovino; BCoV: coronavirus bovino; EPEC: *E. coli* enteropatógena; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga. En el interior de los cuadrados que representan las interacciones significativas se indica el *p*-valor de que ambos agentes se detecten o no juntos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otra parte, se estudiaron las interacciones entre patógenos observadas en la primera semana de vida mediante un análisis de redes y se comprobó que estaban relacionadas entre sí. Así, se observan tres comunidades principales: una en la que se integran la mayoría de los agentes víricos, otra que incluye a *C. parvum* y sus asociaciones y una tercera que integra a los patotipos de *E. coli* que no aparecen tan tempranamente como ETEC (Figura 16). Aunque la red creada muestra resultados similares a los obtenidos mediante el análisis de co-ocurrencias, es destacable que *C. parvum* actúa como nexo de unión entre las tres comunidades, lo que podría sugerir que este protozoo ejerce, fundamentalmente, un papel oportunista durante este período.

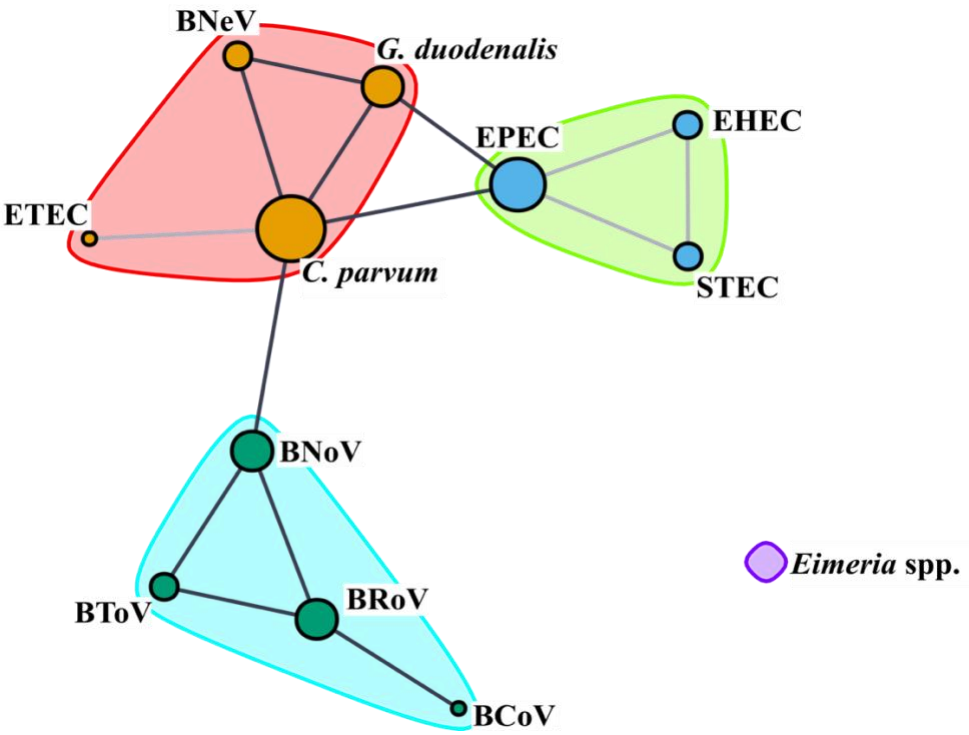


Figura 16. Red formada por las interacciones entre los patógenos detectadas en la primera semana de edad. Las líneas de color gris oscuro representan las asociaciones positivas significativas y las de color gris claro las negativas. El tamaño de cada círculo representa la capacidad de cada agente para poner en contacto otros enteropatógenos entre sí. *G. duodenalis*: *Giardia duodenalis*; *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum;* BNoV: norovirus bovino; BRoV: rotavirus A bovino; BNeV: nebovirus bovino; BToV: torovirus bovino; BCoV: coronavirus bovino; EPEC: *E. coli* enteropatógena; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A partir de la segunda semana de edad las interacciones significativas fueron esporádicas (Figuras 18, 20 y 22) y dejaron de estar relacionadas entre sí, por lo que no se incluyeron los análisis de redes. Comenzando con la segunda semana, durante este período se observó un incremento del número de patógenos que aparecen conjuntamente; así, las infecciones integradas por tres patógenos fueron notablemente más frecuentes (35,9%) que las dobles (26,4%). La proporción de las cuádruples y de las constituidas por cinco agentes aumentó ligeramente con respecto a la primera semana (21,7% y 10,4%, respectivamente); mientras que la presencia de seis o siete agentes se mantuvo en el 4,7% y 0,9% del total de infecciones mixtas, respectivamente. Al analizar las treinta combinaciones más frecuentes (Figura 17), destaca el predominio absoluto de *C. parvum* en este período, pues aparece en todas ellas excepto en cuatro animales donde se detectaron BRoV y BNoV y en dos terneros con una infección por BRoV y EPEC. Aquellas co-infecciones que incluyeron a BRoV y/o BNoV junto con otros enteropatógenos fueron también muy frecuentes en este período.

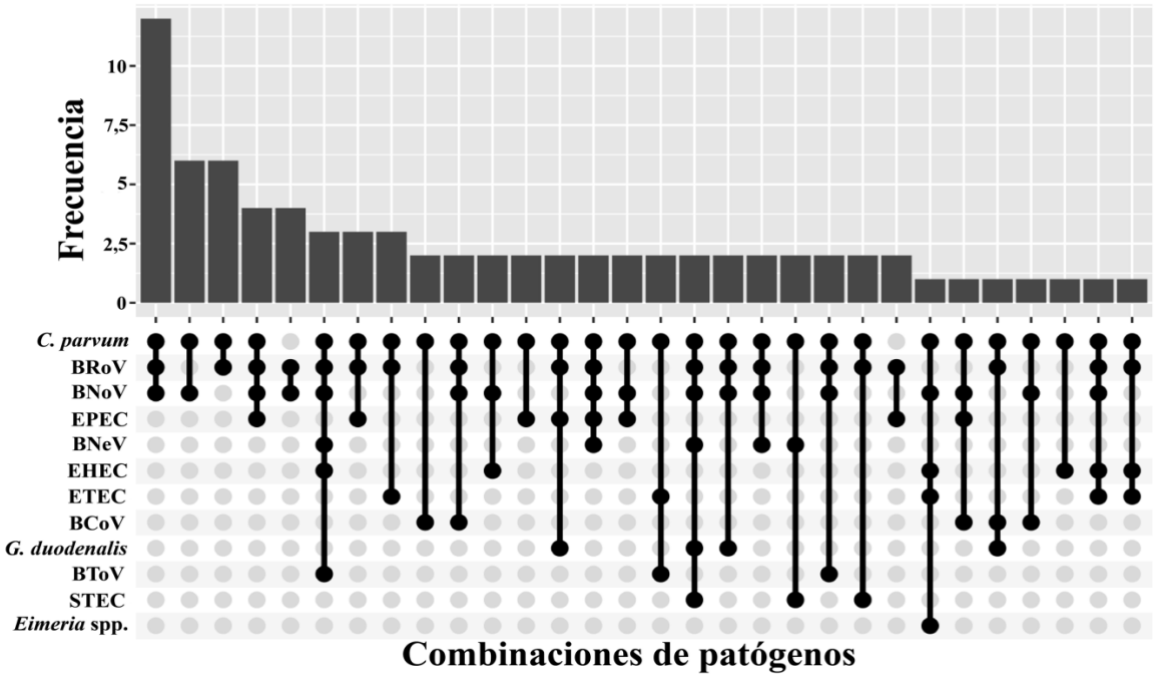


Figura 17. Treinta combinaciones de patógenos más frecuentes en la segunda semana de edad. *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; BRoV: rotavirus A bovino; BNoV: norovirus bovino; EPEC: *E. coli* enteropatógena; BNeV: nebovirus bovino; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; BCoV: coronavirus bovino; *G. duodenalis*: *Giardia duodenalis*; BToV: torovirus bovino; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga.

Los resultados del análisis de co-ocurrencias de la segunda semana (Figura 18) demuestran que *C. parvum*, que en la primera semana de vida estaba asociado positiva o

negativamente con un buen número de agentes, no muestra ninguna interacción significativa con otros enteropatógenos entre los 7 y los 14 días de edad. Esta observación podría estar relacionada con la predominancia de este protozoo durante este período, sugiriendo que actuaría como agente causal de la diarrea independientemente del resto de patógenos involucrados en la infección. También destaca la interacción positiva observada entre BRoV y BNoV, lo que puede deberse a que la prevalencia de ambos virus se incrementa notablemente durante este período (Alfieri *et al.*, 2006; Bartels *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2013; Castells *et al.*, 2020a).

De forma similar a lo observado en la primera semana, en la segunda semana BNeV también interacciona significativamente y de forma positiva con otros agentes bacterianos, víricos y parasitarios; así, se repite la asociación con *G. duodenalis* observada en terneros menores de 7 días, y además se observa una interacción positiva con BToV y STEC. La relación de BNeV con estos agentes podría ser el resultado, por un lado, de su posible acción inmunosupresora que favoreciese el desarrollo secundario de otros patógenos y, por otro, de la patogenia de cada uno de ellos. Como se ha mencionado previamente, tanto BNeV como *G. duodenalis* ejercen su acción patógena principalmente en el intestino delgado proximal (Adam, 2021; Castells y Colina, 2021), por lo que una infección primaria con el virus facilitaría la proliferación del protozoo. Por su parte, BToV afecta al intestino delgado distal, al ciego y al colon (Fagerland *et al.*, 1986) y STEC al colon (Menge, 2020). Por lo tanto, la malabsorción y maladigestión que se producen por la acción de BNeV y/o *G. duodenalis* no podrían verse compensadas con un incremento de la absorción en los tramos intestinales posteriores, lo que agravaría la diarrea (Naylor, 2009). Finalmente, se detectó una interacción negativa entre EHEC y EPEC, al igual que en la primera semana de vida y en el resto del estudio, que podría tener su origen en la producción de bacteriocinas desarrollada previamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

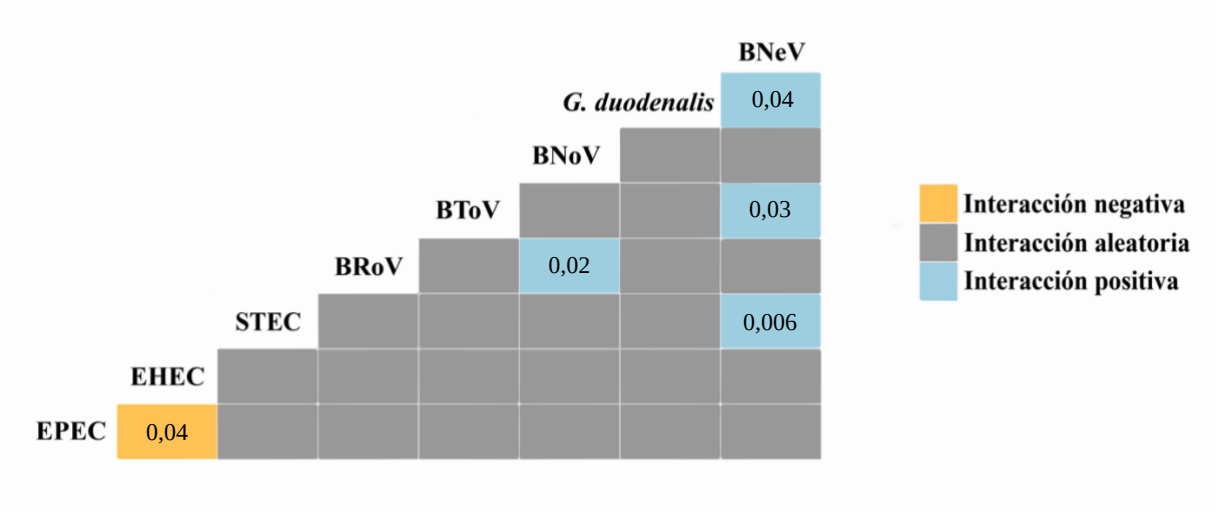


Figura 18. Interacciones significativas positivas y negativas detectadas en la segunda semana de edad. BNeV: nebovirus bovino; *G. duodenalis*: *Giardia duodenalis*; BNoV: norovirus bovino; BToV: torovirus bovino; BRoV: rotavirus A bovino; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; EPEC: *E. coli* enteropatógena. En el interior de los cuadrados que representan las interacciones significativas se indica el *p*-valor de que ambos agentes se detecten o no juntos.

En la tercera semana de vida, se observó un incremento en el número de enteropatógenos que integraban las co-infecciones, siendo las infecciones triples (26%) y cuádruples (26%) las más frecuentes, seguidas de las dobles (22%). El porcentaje de infecciones integradas por cinco agentes se mantuvo en el 10%, mientras que la proporción de infecciones constituidas por seis o siete agentes aumentó notablemente con respecto a las dos primeras semanas (12% y 4%, respectivamente). En cuanto a las combinaciones más frecuentes, como se observa en la Figura 19, en este período destacaron las co-infecciones integradas por *C. parvum* y los tres virus entéricos más prevalentes (BRoV, BNoV y BNeV), aunque también se incrementó notablemente la participación de EHEC y *G. duodenalis*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

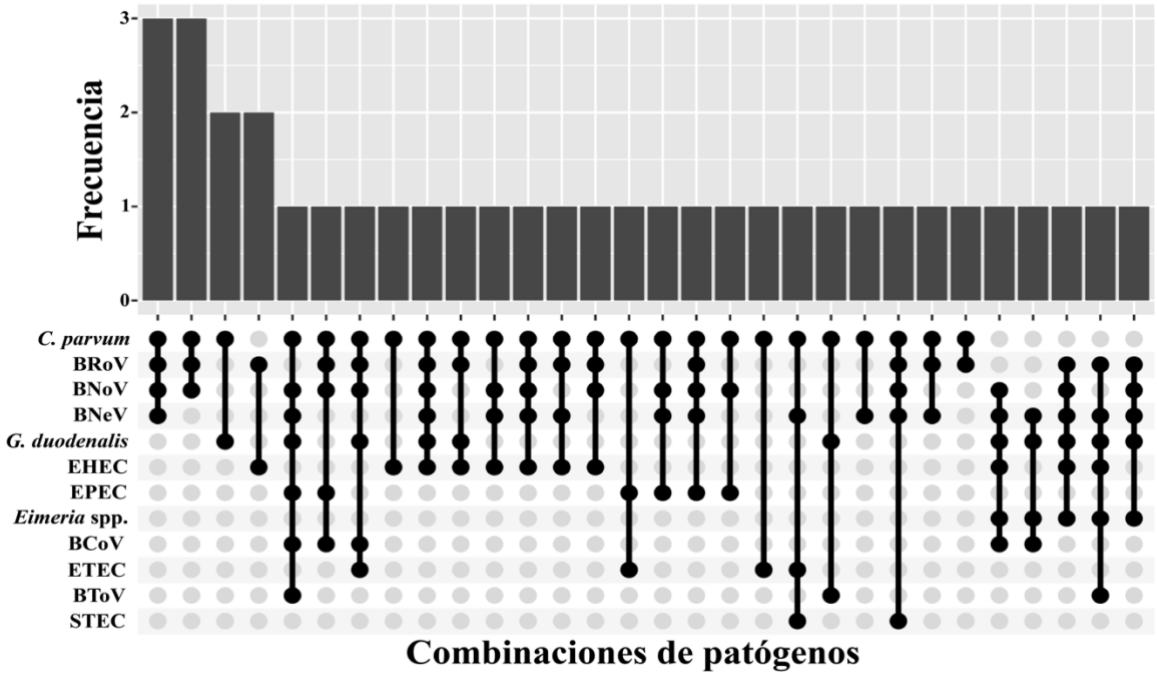


Figura 19. Treinta combinaciones de patógenos más frecuentes en la tercera semana de edad. *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; BRoV: rotavirus A bovino; BNoV: norovirus bovino; BNeV: nebovirus bovino; *G. duodenalis*: *Giardia duodenalis;* EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; EPEC: *E. coli* enteropatógena; BCoV: coronavirus bovino; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; BToV: torovirus bovino; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga.

El análisis de co-ocurrencias de la tercera semana volvió a identificar como significativa la interacción negativa entre EHEC y EPEC (Figura 20). Además, se constató que, al igual que en las dos primeras semanas, *G. duodenalis* interacciona de manera significativa y positiva con otros enteropatógenos, en este caso con BToV y *Eimeria* spp. Estos resultados son muy interesantes y podrían sugerir que la participación de *G. duodenalis* en la NCD es, durante las primeras tres semanas de vida del ternero, secundaria a la presencia de otro enteropatógeno, necesitando una cierta bajada de la inmunidad del hospedador que facilite su desarrollo y proliferación. Esta hipótesis se vería reforzada por la ausencia de infecciones simples con *G. duodenalis* durante los primeros 21 días de vida y coincidiría con lo descrito por Mukherjee *et al.* (2014) en humanos. En dicho trabajo se observó una relación estadísticamente significativa entre la infección con este protozoo y otros patógenos diarreagénicos que afectaban a individuos en el mismo rango de edad, lo que sugiere un papel oportunista de *G. duodenalis* que se vería apoyado por su elevada prevalencia sostenida en el tiempo. Además, en ese mismo estudio, se indica que la infección con *G. duodenalis* podría dar lugar a una mayor susceptibilidad a posteriores infecciones con otros

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

enteropatógenos, lo que explicaría la interacción positiva con *Eimeria* spp., cuya prevalencia aumenta de forma más tardía. En este sentido, diversas investigaciones indican que todos los terneros se infectan con *Eimeria* spp. en algún momento de su vida, pero la aparición de signos clínicos y la excreción de un elevado número de ooquistes se asocia a una disminución en la inmunidad del hospedador (Bürger, 1983; Cornelissen *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1998; Daugschies y Najdrowski, 2005), que podría verse favorecida por una infección previa con *G. duodenalis*. De todos modos, se necesitan nuevas evidencias para poder comprender las interacciones entre este protozoo y otros enteropatógenos y su papel en la NCD.

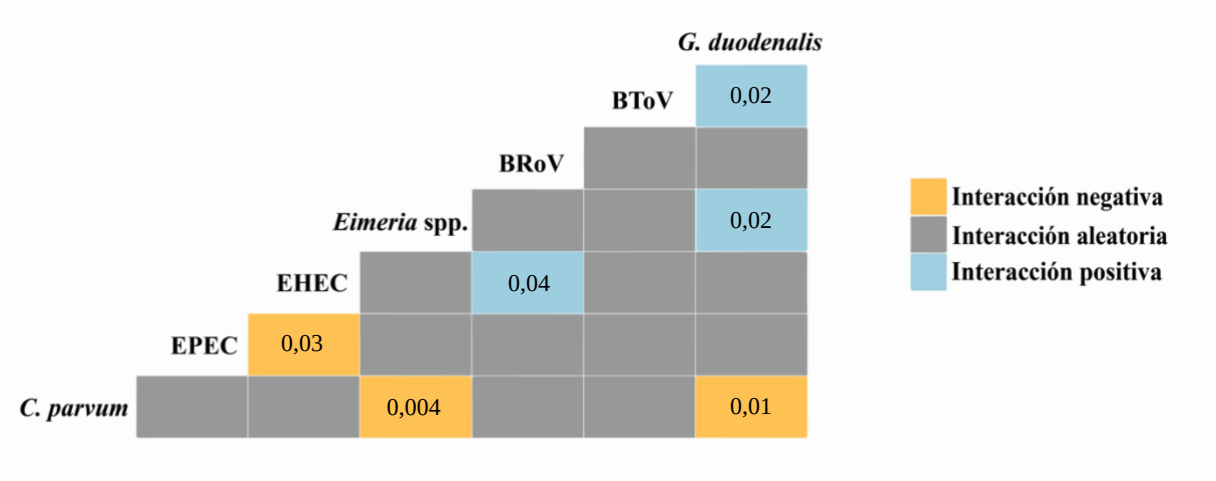


Figura 20. Interacciones significativas positivas y negativas detectadas en la tercera semana de edad. *G. duodenalis*: *Giardia duodenalis*; BToV: torovirus bovino; BRoV: rotavirus A bovino; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; EPEC: *E. coli* enteropatógena; *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum.* En el interior de los cuadrados que representan las interacciones significativas se indica el *p*-valor de que ambos agentes se detecten o no juntos.

Por otra parte, en la tercera semana también se detectó una asociación negativa entre la presencia de *C. parvum* y la de los otros dos protozoos, *G. duodenalis* y *Eimeria* spp. La interacción negativa entre *C. parvum* y *G. duodenalis* podría tener su origen en que, a partir de la tercera semana de edad, la prevalencia de *C. parvum*, aunque continúa siendo muy elevada, comienza a descender (66% frente al 81,3% en la segunda semana), mientras la de *G. duodenalis* se incrementa notablemente (33,7% frente a 13,8% en la segunda semana), lo que se traduce en que los terneros, aunque puedan haber estado infectados de forma concurrente por ambos parásitos, en algunos casos podrían comenzar a dejar de excretar *C. parvum;* como consecuencia, la probabilidad de detectar ambos protozoos en la misma

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

muestra disminuye. Esta evolución en función de la edad explica por qué las infecciones concurrentes con *C. parvum* y *G. duodenalis* son poco frecuentes, como se ha sugerido previamente (Mendonça *et al.*, 2007; Delling y Daugschies, 2022); de hecho, en nuestro estudio ambos patógenos sólo se detectaron juntos en el 10,1% de las co-infecciones y, de ese pequeño porcentaje, el 68,6% correspondía a animales en sus primeros 14 días de vida, cuando, como hemos visto, la evolución de la prevalencia de ambos patógenos es ascendente. Por su parte, la interacción negativa entre *C. parvum* y *Eimeria* spp. podría estar relacionada con que la infección con el primero se ha asociado a una menor capacidad de proliferación del segundo; así, tras infectar una línea celular de macrófagos de pollo con *C. parvum* y *E. acervulina*, la multiplicación intracelular de *E. acervulina* fue significativamente inferior en presencia de *C. parvum*, mientras que este efecto no se produjo a la inversa (Taha *et al.*, 2023). Otro elemento que puede explicar esta interacción negativa está relacionado con la patogenia de ambos protozoos: las infecciones con *C. parvum* suelen ser más frecuentes en la segunda semana de edad (Santín *et al.*, 2004) y su período de patencia suele durar entre una semana y 12 días (Fayer *et al.*, 1998a; Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Santín *et al.*, 2008). Como consecuencia, es probable que las infecciones por *C. parvum* detectadas en la tercera semana se traduzcan en intensas lesiones del epitelio del yeyuno distal e íleon (Adams *et al.*, 1994), limitando los enterocitos disponibles para la *multiplicación* asexual de *E. bovis* y *E. zuernii*, que tiene lugar en esos mismos tramos intestinales (Bangoura y Daugschies, 2018), dificultando o impidiendo su desarrollo. En este sentido, se ha descrito que tras una infección con elevadas dosis de *Eimeria* spp. la fecundidad del protozoo se reduce por la disminución del número y de la esperanza de vida de los enterocitos disponibles, en lo que se conoce como *crowding effect* (Johnston *et al.*, 2001). Por lo tanto, es posible que una infección previa con *C. parvum* tuviese un efecto parecido, hipótesis que se vería apoyada por un estudio realizado en ratones que indica que una infección primaria con un nematodo (*Heligmosomoides polygyrus*), que afecta al duodeno, disminuye significativamente los niveles de excreción de ooquistes de *E. hungaryensis*, que se replica en esa misma porción intestinal (Clerc *et al.*, 2019). No obstante, es necesario realizar estudios que permitan conocer si el desarrollo de *C. parvum* puede ejercer este efecto sobre la multiplicación de *E. bovis* y *E. zuernii* en el intestino del ternero.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la cuarta semana de vida, las infecciones triples fueron las más frecuentes (40,9%), seguidas de las dobles (20,5%) y las quíntuples (20,5%). Las cuádruples supusieron el 15,9%, mientras que las integradas por seis patógenos tan sólo representaron el 3% de las co-infecciones de este período. Los agentes más prevalentes en las combinaciones más frecuentes en este período fueron los protozoos *Eimeria* spp. y *G. duodenalis*, junto con BRoV (Figura 21).

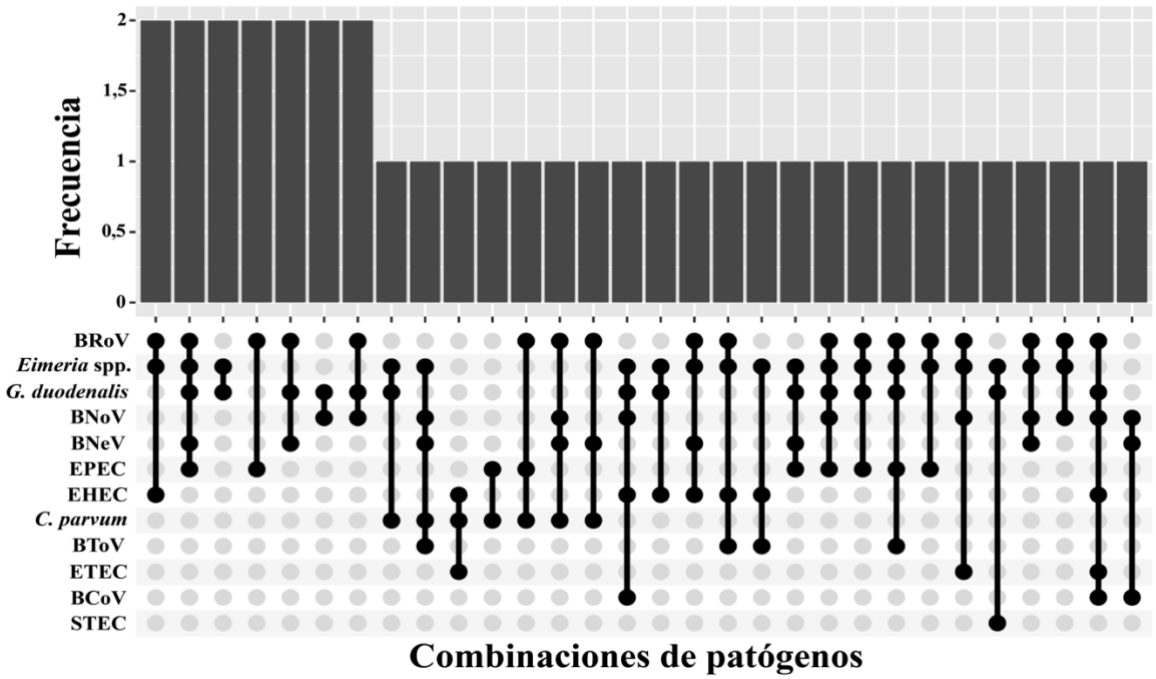


Figura 21. Treinta combinaciones de patógenos más frecuentes en la cuarta semana de edad. BRoV: rotavirus A bovino; *G. duodenalis*: *Giardia duodenalis*; BNoV: norovirus bovino; BNeV: nebovirus bovino; EPEC: *E. coli* enteropatógena; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; BToV: torovirus bovino; ETEC: *E. coli* enterotoxigénica; BCoV: coronavirus bovino; STEC: *E. coli* productora de toxinas Shiga.

El análisis de co-ocurrencias de la cuarta semana (Figura 22) vuelve a mostrar una interacción negativa y significativa entre EHEC y EPEC, es decir, en terneros con NCD menores de un mes, la presencia de uno de estos patotipos de *E. coli* se asocia con la ausencia del otro, independientemente de la edad del animal. Además, se apreció una interacción positiva entre BNoV y BCoV, que tendría su origen en que durante este período se detectó BNoV en todas las muestras positivas a BCoV, que tan sólo ascendieron a tres. Por lo tanto, es posible que este resultado sea simplemente producto de la reducida prevalencia de BCoV, sobre todo si tenemos en cuenta que no se identificaron formando una co-infección por sí

solos y que BNoV también se detecta formando otras combinaciones con otros agentes, lo que podría deberse a su posible efecto inmunosupresor (Cho *et al.*, 2013).

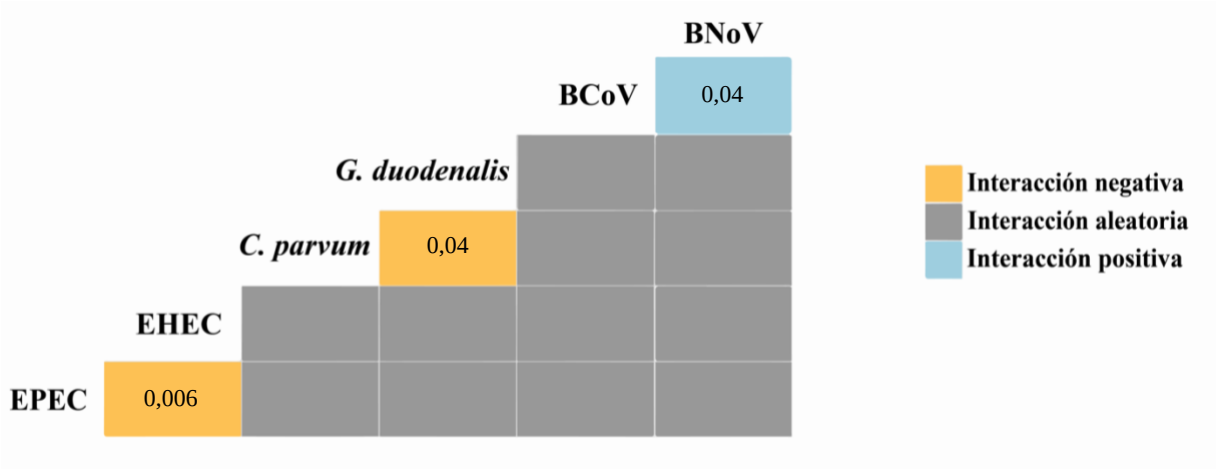


Figura 22. Interacciones significativas positivas y negativas detectadas en la cuarta semana de edad. BNoV: norovirus bovino; BCoV: coronavirus bovino; *G. duodenalis*: *Giardia duodenalis*; *C. parvum*: *Cryptosporidium parvum*; EHEC: *E. coli* enterohemorrágica; EPEC: *E. coli* enteropatógena. En el interior de los cuadrados que representan las interacciones significativas se indica el *p*-valor de que ambos agentes se detecten o no juntos.

Por otra parte, la interacción negativa entre *G. duodenalis* y *C. parvum*, ya observada en la tercera semana de vida, se mantiene durante la cuarta, lo que se explica porque la divergencia en la evolución de las prevalencias que se inicia en la tercera semana de edad se profundiza: el porcentaje de animales infectados con *C. parvum* desciende de forma muy notable (21,7%, frente al 66% en la tercera semana), mientras que *G. duodenalis* (52,2%) alcanza su pico de prevalencia. Finalmente, llama poderosamente la atención la ausencia de interacción entre *G. duodenalis* y *Eimeria* spp. en la cuarta semana de vida del ternero, sobre todo si tenemos en cuenta que se detectaron juntos en el 27,3% de las co-infecciones de este período y constituyeron por sí solos la tercera combinación más frecuente (Figura 21). No obstante, estos resultados pueden deberse a que es en esta semana cuando los dos patógenos alcanzan su pico de prevalencia; así, el porcentaje de muestras positivas a estos protozoos fue igual o superior al 50% en ambos casos (*G. duodenalis* 52,2% y *Eimeria* spp. 50%), por lo que su detección conjunta tan frecuente sería producto de su elevada prevalencia individual.

USC DE COMPOSTELA

En conclusión, este estudio aporta información novedosa acerca de la prevalencia de los principales enteropatógenos implicados en la NCD en terneros menores de un mes de vida del noroeste de España. Se ha comprobado la existencia de una relación entre la edad del animal, la consistencia de las heces y la presencia de algunos de estos agentes, lo que puede ser muy útil de cara al diagnóstico etiológico preliminar. Sin embargo, los datos más novedosos son los resultados del estudio de las co-infecciones; así, se ha confirmado que la mayoría de los casos de NCD son el resultado de infecciones mixtas y que algunos de los patógenos implicados en ellas interaccionan entre sí, tanto de forma positiva como negativa. También se constató que el número de patógenos que integran las infecciones mixtas se incrementa con la edad, alcanzando un máximo en la tercera semana de vida. Además, algunas de estas asociaciones sólo tienen lugar en períodos determinados del primer mes de vida, que no siempre están ligados a los picos de prevalencia de los patógenos. Los resultados obtenidos en este estudio permitirán mejorar las estrategias de control y, en caso de que se confirme la presencia de algún enteropatógeno, poder aplicar las medidas de prevención más adecuadas en el momento preciso para evitar el desarrollo de otros agentes que actúen de forma sinérgica y puedan incrementar la gravedad del cuadro clínico.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. ESTUDIO II:

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y POTENCIAL ZOONÓSICO DE AISLADOS DE *Cryptosporidium* spp. Y *Giardia duodenalis* PROCEDENTES DE TERNEROS CON DIARREA DEL NOROESTE DE ESPAÑA.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En la etiología de la diarrea neonatal del ternero están implicados numerosos agentes de etiología bacteriana, vírica y parasitaria, algunos de los cuales pueden representar un peligro para la salud pública por su potencial zoonósico (Cho y Yoon, 2014). Comenzando por los agentes bacterianos, ***Salmonella* spp.** se reconoce como un importante agente zoonósico, fundamentalmente los serovares *S.* Typhimurium y *S.* Dublin, siendo numerosos los casos de salmonelosis humana que son el resultado del contacto de las personas con terneros infectados y sus heces (Holschbach y Peek, 2018). En lo que respecta a ***E. coli***, el ganado bovino se considera el principal reservorio de dos patotipos zoonósicos de importancia como son EHEC y STEC (Sandhu y Gyles, 2002; Silvestro *et al.*, 2004; Moxley y Smith, 2010; Angappan *et al.*, 2021). De forma similar, los terneros diarreicos también podrían constituir un importante reservorio para las infecciones humanas con EPEC pues se ha sugerido que estos animales podrían ser la fuente de infección de determinados serotipos de EPEC para las personas (Girard *et al.*, 2009; Kolenda *et al.*, 2015; Eldesoukey *et al.*, 2022). Por el contrario, actualmente no se dispone de datos que confirmen que las cepas ETEC bovinas actúen como enteropatógenos causantes de diarrea en personas. Esta última situación es similar a la observada para los agentes víricos, aunque se ha sugerido que algunas cepas de rotavirus que afectan al ganado bovino han podido evolucionar generando nuevas cepas con capacidad para provocar diarrea en las personas (Martella *et al.*, 2010). Es también cuestionable el papel del norovirus bovino en personas ya que, aunque no se ha detectado en heces, sí se han hallado anticuerpos frente a él, especialmente en veterinarios de vacuno, lo que reforzaría la hipótesis de una posible transmisión inter-especie (Widdowson *et al.*, 2005; Villabruna *et al.*, 2019). En cuanto a los enteropatógenos parasitarios, la importancia zoonósica de algunas especies de ***Cryptosporidium*** y de algunos genotipos de ***G. duodenalis*** está bien demostrada (Chalmers *et al.*, 2019; Taghipour *et al.*, 2022), mientras que la repercusión de *Eimeria* spp. en la salud pública es nula debido a su elevada especificidad de hospedador.

Aunque varios de los enteropatógenos asociados con la aparición de NCD poseen potencial zoonósico, no todos representan un riesgo similar para la salud pública. Por ejemplo, estudios recientes señalan que la prevalencia de *Salmonella* spp. en terneros

USC DE COMPOSTELA

diarreicos, y en el conjunto del ganado bovino, es muy baja (De La Fuente *et al.*, 1999; Ågren *et al.*, 2016; Cummings *et al.*, 2018; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2022); en este sentido, los resultados del Estudio I muestran que esta bacteria estaba ausente en terneros neonatos con diarrea del noroeste de España. Todas estas investigaciones demuestran que, actualmente, la salmonelosis humana asociada a un contacto estrecho con el ganado bovino es poco frecuente (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2022). Aunque el impacto sobre la salud pública de algunos patotipos de *E. coli* frecuentes en bovinos es innegable, en las muestras positivas detectadas en el Estudio I no se consiguió aislar un número representativo de cepas de EPEC, EHEC y STEC, lo que impidió realizar un estudio robusto del potencial zoonósico. Por todo ello, este estudio se centrará en analizar el potencial zoonósico de dos agentes parasitarios frecuentes tanto en terneros neonatales con diarrea como en personas: *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*.

El género *Cryptosporidium* incluye a varias especies de protozoos parásitos que infectan, principalmente, a las células epiteliales gástricas o intestinales de numerosos vertebrados (Fayer, 2008). El empleo de técnicas moleculares ha mejorado notablemente el conocimiento taxonómico de este género, permitiendo la descripción de nuevas especies cada año (Xiao, 2010; Ryan *et al.*, 2021a). Así, una reciente revisión señala que este género incluye 44 especies consideradas válidas y más de 120 genotipos, siendo probable que muchos de ellos acaben por obtener el estatus de especie (Ryan *et al.*, 2021a). En el ser humano se han identificado al menos 19 especies y 4 genotipos, la gran mayoría zoonóticos, si bien algunos de ellos pueden considerarse hallazgos ocasionales (Ryan *et al.*, 2021b) (Tabla 33). Aunque en el ganado vacuno se han detectado 13 de estas especies, muchas de ellas son esporádicas. De hecho, la información disponible hasta el momento demuestra que las especies más frecuentes en los bovinos son *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium ryanae* y *Cryptosporidium parvum* (Santin, 2020). Las tres primeras son especies poco patógenas que presentan una elevada especificidad de hospedador, por lo que su identificación en otros hospedadores es poco común, aunque se han señalado casos de infecciones por *C. andersoni* y *C. bovis* en personas (Ryan *et al.*, 2021b). Por el contrario, *C. parvum* es una de las causas más comunes de NCD en terneros menores de un mes debido a su gran potencial patógeno (Quílez *et al.*, 2008b; Díaz *et al.*, 2010; Santin, 2020; Adkins, 2022), y además se considera la segunda especie más frecuentemente identificada en casos de criptosporidiosis humana, tras *C. hominis* (Ryan *et*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

al., 2021b). En los últimos años se han desarrollado herramientas moleculares que permiten analizar la variabilidad intra-específica de *C. parvum*, siendo el gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa el más estudiado (Xiao, 2010). El estudio de este gen ha permitido identificar más de 20 familias de subtipos de *C. parvum* (Ryan *et al.*, 2021b). De entre las que se han detectado en humanos (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIf, IIg, IIh, IIi, IIl, IIm, IIn, IIo), los terneros diarreicos ejercen un papel muy relevante en la transmisión zoonósica de subtipos de las familias IIa y, en menor medida, IId (Ryan *et al.*, 2021b; Yang *et al.*, 2021). En Europa tiene especial importancia el subtipo IIaA15G2R1, que predomina tanto en humanos como en bovinos (Ryan *et al.*, 2021b).

Tabla 33. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* spp. identificados en humanos en orden de frecuencia con mención a su presencia o ausencia en el ganado vacuno. Adaptado de Ryan *et al.* (2021b).

Especie/genotipo	Reservorio principal	Frecuencia en humanos	Detección en bovinos
C. hominis	Primates no humanos, asnos	Especie más frecuente	Sí (Smith *et al.*, 2005)
C. parvum	Rumiantes, fauna silvestre	Segunda especie más frecuente	Sí (Upton y Current, 1985)
C. meleagridis	Aves	Tercera especie más frecuente	Sí (Mendonça *et al.*, 2007)
C. felis	Gatos	Comúnmente detectada	Sí (Bornay-Llinares *et al.*, 1999)
C. canis	Perros	Comúnmente detectada	No
C. ubiquitum	Rumiantes, roedores, carnívoros, primates no humanos	Comúnmente detectada	Sí (Fayer *et al.*, 2010)
C. cuniculus	Conejos	Identificada en numerosas ocasiones	No
C. viatorum	Roedores	Identificada en varias ocasiones	No
Genotipo I de las ardillas	Roedores	Identificado en varias ocasiones	No
C. muris	Roedores	Identificada en varias ocasiones	Sí (Bornay-Llinares *et al.*, 1999)
C. andersoni	Ganado vacuno	Identificada en varias ocasiones	Sí (Lindsay *et al.*, 2000)
C. suis	Cerdos, jabalíes	Identificada en cinco ocasiones	Sí (Geurden *et al.*, 2007)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 33. Continuación.

Especie/genotipo	Reservorio principal	Frecuencia en humanos	Detección en bovinos
Genotipo equino	Équidos	Identificada en cinco ocasiones	No
C. erinacei	Erizos, équidos	Identificada en cinco ocasiones	No
Genotipo de la mofeta	Mofetas	Identificada en cinco ocasiones	No
C. bovis	Ganado vacuno	Identificada en cuatro ocasiones	Sí (Fayer *et al.*, 2005)
C. tyzzeri	Roedores	Identificada en tres ocasiones	Sí (Wang *et al.*, 2017a)
C. occultus	Roedores	Identificada en tres ocasiones	Sí (Langkjær *et al.*, 2007)
C. ditrichi	Roedores (fundamentalmente ratones)	Identificada en dos ocasiones	No
Genotipo del visón	Visones	Identificada en dos ocasiones	No
C. fayeri	Marsupiales	Identificada en dos ocasiones	No
C. xiaoi	Ovejas, cabras	Identificada en una ocasión	Sí (Mirhashemi *et al.*, 2016)
C. scrofarum	Cerdos, jabalíes	Identificada en una ocasión	Sí (Wang *et al.*, 2017a)

Por su parte, *G. duodenalis* es un protozoo flagelado parásito que puede infectar a una amplia variedad de mamíferos, incluidos los humanos (Ryan y Zahedi, 2019). Se considera un complejo de especies en el que se incluyen ocho genotipos (A-H) con diferente especificidad de hospedador (Taghipour *et al.*, 2022). Las infecciones por *G. duodenalis* en el ser humano están provocadas, en la gran mayoría de los casos, por los genotipos A y B, que también se han detectado frecuentemente en otras especies de animales, entre las que se encuentra el ganado vacuno, por lo que se consideran zoonósicos (Feng y Xiao, 2011). Sin embargo, recientemente también se han identificado en personas otros genotipos considerados más específicos de hospedador. Este es el caso del genotipo E, específico de ungulados y el más común en ganado vacuno, que se ha detectado en al menos 57 personas de varios países (Cai *et al.*, 2021). De la misma forma, los genotipos C, D y F, típicos de

cánidos y felinos y esporádicos en el ganado vacuno, también se han hallado en personas (Cai *et al.*, 2021; Taghipour *et al.*, 2022). En los bovinos, *G. duodenalis* es un parásito frecuente en animales menores de seis meses de edad (Ruest *et al.*, 1995; Castro-Hermida *et al.*, 2006) por lo que, teniendo en cuenta todo lo comentado anteriormente, los terneros podrían constituir una potencial fuente de infección para el ser humano. Esta hipótesis ya se ha sugerido previamente (Abeywardena *et al.*, 2015; Taghipour *et al.*, 2022), y se ve reforzada por la detección de mayores prevalencias de este protozoo en personas en contacto directo con ganado vacuno en comparación con otros grupos poblacionales (Wegayehu *et al.*, 2013; Asher *et al.*, 2016).

Dado que el ganado vacuno y, en particular, los terneros con diarrea pueden desempeñar un importante papel en la trasmisión de ambos protozoos al ser humano, resulta de especial relevancia realizar estudios moleculares que permitan identificar la presencia de especies, genotipos o subtipos zoonósicos y determinar su prevalencia. En España se han realizado numerosas investigaciones epidemiológicas sobre estos dos protozoos, aunque la mayoría de los trabajos hacen referencia a individuos asintomáticos o, si incluyen animales con diarrea, no proporcionan resultados concretos para este grupo. Aquellos estudios que sólo incluyeron terneros diarreicos en su primer mes de vida muestran que *Cryptosporidium* spp. es un patógeno muy frecuente, con prevalencias que rondan o superan el 50 % (Quílez *et al.*, 1996, 2008b; De La Fuente *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2010; Benito *et al.*, 2020), mientras que la infección por *G. duodenalis* es mucho menos abundante y cercana al 10% (Quílez *et al.*, 1996). Sin embargo, los datos moleculares que aportan información sobre el potencial zoonótico son muy limitados: tan sólo Quílez *et al.* (2008) y Díaz *et al.* (2010) identificaron los subtipos de *C. parvum* implicados y señalaron su importancia. Por el contrario, no se dispone de información concreta sobre los genotipos de *G. duodenalis* presentes en terneros neonatos con diarrea en nuestro país. Por lo tanto, teniendo en cuenta que los diferentes subtipos de *C. parvum* y genotipos de *G. duodenalis* pueden presentar diferencias en cuanto a su patogenicidad y potencial zoonósico, resulta esencial disponer de información actualizada acerca de su presencia e importancia en terneros diarreicos para comprender su relevancia para la salud pública (Thomson *et al.*, 2017).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En base a estos antecedentes, los objetivos planteados en este estudio son:

1º. Identificar los subtipos de *C. parvum* presentes en terneros diarreicos menores de un mes del noroeste de España, conocer su distribución por granjas e investigar su potencial zoonósico.
2º. Identificar los genotipos de *G. duodenalis* presentes en terneros menores de un mes con diarrea del noroeste de España, conocer su distribución por granjas y determinar su potencial zoonósico.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp.

Para la realización de este Estudio se seleccionaron aquellas muestras que, en el Estudio I, resultaron positivas a *Cryptosporidium* spp. mediante la técnica de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales (IFAT), a fin de realizar su caracterización molecular. En primer lugar, tal y como se describe en el Estudio I, se realizó el análisis genotípico para identificar las especies de *Cryptosporidium* presentes. Una vez finalizado este procedimiento, se procedió a determinar el subtipo de los aislados identificados como *C. parvum* mediante una PCR anidada que amplifica un fragmento de entre 800 y 850 pb del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa (*gp60*), empleando los cebadores y el protocolo descrito por Alves *et al.* (2003). En su primera etapa, se añadió 1 µl de ADN de cada muestra a 49 µl de una mezcla compuesta por 0,2 µM de los cebadores GP601F y GP601R (Tabla 34), 200 µM de cada dNTP (dNTPs NZYMix, NZYTech Lda., Lisboa, Portugal), 5 unidades de Taq polimerasa, tampón de Taq polimerasa 1X y 3 mM de $MgCl_2$ (Supreme NZYTaq II DNA polymerase, NZYTech Lda., Lisboa, Portugal). El protocolo de amplificación se resume en la Tabla 35.

Tabla 34. **Cebadores empleados en la amplificación del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa.**

Cebador	Secuencia (5'-3')
GP601F	ATA GTC TCC GCT GTA TTC
GP601R	GGA AGG AAC GAT GTA TCT
GP602F	TCC GCT GTA TTC TCA GCC
GP602R	GCA GAG GAA CCA GCA TC

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 35. Protocolo de amplificación del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa.

Número de ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	**Desnaturalización inicial**	95ºC	3 minutos
40 ciclos	**Desnaturalización**	95ºC	45 segundos
	Hibridación	52ºC	45 segundos
	Extensión	72ºC	60 segundos
1 ciclo	**Extensión final**	72ºC	7 minutos

Para realizar la segunda reacción de la PCR anidada se partió de 1 µl del producto de la primera PCR, que se añadió a 49 µl de una mezcla idéntica a la anterior salvo por los cebadores, que se sustituyeron por los GP602F y GP602R (Tabla 34). El protocolo de amplificación empleado fue el mismo que en la primera PCR. A continuación, se realizó una electroforesis, empleando el mismo protocolo ya descrito en el Estudio I para la PCR del gen SSU ARNr, y los resultados se visualizaron en un analizador de imagen GelDoc Go Imaging System (Bio-Rad, Hércules, California, EE.UU.).

Para la identificación de los subtipos presentes, la secuencia de nucleótidos de los productos de la segunda PCR se determinó en la Unidad de Secuenciación y Análisis de fragmentos de la Universidad de Santiago de Compostela, del mismo modo descrito anteriormente. Con el programa Chromas Pro v.1.7.5. (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia) se obtuvieron las secuencias consenso, que posteriormente se alinearon con BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.3. (Ibis Biosciences, Carlsbad, California, EE.UU.). Finalmente, las secuencias consenso se compararon con las depositadas en GenBank. Para identificar el subtipo presente se partió de la base de que el fragmento del gen *gp60* amplificado posee en su extremo 5' una región microsatélite consistente en repeticiones de TCA, TCG y TCT; así, los subtipos se nombraron en función del número de repeticiones de los trinucleótidos, las mutaciones existentes en la región no repetitiva y, en el caso de la familia IIa, el número de copias de la secuencia ACATCA existentes al final de la zona repetitiva (Sulaiman *et al.*, 2005).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.2. Caracterización molecular de *Giardia duodenalis*

Todas las muestras del Estudio I que resultaron positivas a *G. duodenalis* mediante IFAT se seleccionaron para su caracterización molecular. Así, en primer lugar, se procedió a la extracción del ADN de *G. duodenalis* a partir de 200 µl de la concentración de quistes (sedimento de la concentración difásica con agua destilada y acetato de etilo) empleando el mismo kit y el mismo protocolo descrito para *Cryptosporidium* spp. A continuación, se amplificaron mediante PCR los genes que codifican para la β-giardina (*bg*), glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y triosa-fosfato isomerasa (*tpi*) empleando los cebadores y protocolos descritos por Lalle *et al.* (2005), Read *et al.* (2004) y Sulaiman *et al.* (2003), respectivamente. En todos los casos se emplearon los reactivos y aparatos empleados para la caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp., incluyéndose controles positivos y negativos en todos los ensayos.

Para la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la *bg* se empleó una PCR anidada. La primera reacción permitió amplificar un fragmento de 753 pb del gen diana (Cacciò *et al.*, 2002), mientras que en la segunda etapa se amplificó un fragmento de 511 pb (Lalle *et al.*, 2005); en la Tabla 36 se señala la secuencia de los cebadores empleados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 36. Cebadores empleados en la amplificación parcial de los genes que codifican para la β-giardina, glutamato deshidrogenasa y triosa-fosfato isomerasa (Cacciò *et al.*, 2002; Sulaiman *et al.*, 2003; Read *et al.*, 2004; Lalle *et al.*, 2005).

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')
β-giardina (*bg*)	G7	AAGCCCGACGACCT CACCCGCAGTGC
	G759	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC
	2005F	GAAC GAACGAGATCGAGGTCCG
	2005R	CTCGACGAGCTTCGTGTT
Glutamato deshidrogenasa (*gdh*)	GDHeF (sentido externo)	TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT
	GDHiR (antisentido)	GTT RTC CTT GCA CAT CTC C
	GDHiF (sentido interno)	CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG
Triosa-fosfato isomerasa (*tpi*)	AL3543	AAATIATGCCTGCTCGTCG
	AL3546	CAAACCTTITCCGCAAACC
	AL3544	CCCTTCATCGGIGGTAACTT
	AL3545	GTGGCCACCACICCCGTGCC

Para ambas reacciones, se partió de 1-5 µl de ADN (ADN patrón para la primera reacción y producto de la primera PCR para la segunda) que se añadió a una mezcla compuesta por 10 pmol de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de Taq polimerasa, tampón de Taq polimerasa 1X y 1,5 mM de $MgCl_2$, en un volumen total de 50 µl. El protocolo empleado en ambas reacciones se resume en la Tabla 37.

Tabla 37. Protocolo de amplificación del gen que codifica para la β-giardina.

Número de ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	**Desnaturalización inicial**	95ºC	15 minutos
40 ciclos	**Desnaturalización**	95ºC	30 segundos
	Hibridación	65ºC (primera reacción)	30 segundos
		55ºC (segunda reacción)	
	Extensión	72ºC	60 segundos
1 ciclo	**Extensión final**	72ºC	7 minutos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para la amplificación parcial del gen que codifica para la *gdh*, se empleó una PCR semi-anidada que permite obtener un fragmento de 432 pb (Read *et al.*, 2004). Los cebadores empleados se describen en la Tabla 36.

La primera reacción se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía 1 µl de ADN patrón, 12,5 pmol de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, 0,1 unidades de Taq polimerasa, tampón de Taq polimerasa 1x y 1,5 mM de $MgCl_2$. Los reactivos y volúmenes empleados en la segunda reacción fueron idénticos a los utilizados en la primera y se partió de 1 µl de producto de PCR de la primera amplificación. El protocolo térmico utilizado en ambos casos se describe en la Tabla 38.

Tabla 38. Protocolo de amplificación del gen que codifica para la glutamato deshidrogenasa.

Número de ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	**Desnaturalización inicial**	94ºC	3 minutos
35 ciclos	**Desnaturalización**	94ºC	45 segundos
	Hibridación	55ºC	45 segundos
	Extensión	72ºC	60 segundos
1 ciclo	**Extensión Final**	72ºC	7 minutos

El gen que codifica para la *tpi* de *G. duodenalis* se amplificó parcialmente (530 pb) empleando una PCR anidada según el protocolo descrito por Sulaiman *et al.* (2003) y los cebadores señalados en la Tabla 36. En la primera reacción se partió de 0,25-2 µl de ADN patrón, mientras que en la segunda se emplearon 2,5 µl de producto de la primera PCR. Para ambas reacciones el ADN se añadió a una mezcla compuesta por tampón de PCR 1x, $MgCl_2$ 3 mM, 200 µM de cada dNTP, 200 nM de cada cebador y 5 U de Taq polimerasa, en un total de 100 µl. Las muestras se sometieron a un protocolo térmico incluido en la Tabla 39.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 39. Protocolo de amplificación del gen que codifica para la triosa-fosfato isomerasa.

Número de ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	**Desnaturalización inicial**	94ºC	5 minutos
35 ciclos	**Desnaturalización**	94ºC	45 segundos
	Hibridación	50ºC	45 segundos
	Extensión	72ºC	60 segundos
1 ciclo	**Extensión Final**	72ºC	10 minutos

En todos los casos, tras la amplificación se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x, tal y como se describió en la sección del Estudio I dedicada al protocolo de amplificación de la secuencia del gen que amplifica para la subunidad 18s del ARNr de *Cryptosporidium spp*. Del mismo modo, los resultados se visualizaron en un analizador de imagen GelDoc Go Imaging System (Bio-Rad, Hércules, California, EE.UU.).

Para la identificación de los genotipos presentes, se enviaron los productos de la PCR a la Unidad de secuenciación y análisis de fragmentos de la USC, donde se realizó la purificación del ADN y su secuenciación. Las secuencias obtenidas se limpiaron, se ensamblaron y las secuencias consenso se alinearon con los programas descritos en la sección anterior. Finalmente, las secuencias consenso se compararon con las depositadas en GenBank.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp.

En este estudio se emplearon los aislados identificados como *C. parvum* en el Estudio I y se realizó un análisis subtípico, estudiando la secuencia de un fragmento del gen que codifica para la *gp60*. De los 210 aislados de *C. parvum* analizados se lograron secuenciar 203 (96,7%), mientras que cuatro secuencias fueron ilegibles y en tres muestras no se obtuvo amplificación. La identificación específica de las muestras no secuenciadas se confirmó mediante análisis de la secuencia del gen que amplifica para la subunidad 18s del ARNr. La secuencia de seis aislados resultó idéntica a la secuencia de *C. parvum* con número de acceso MT071829.1 obtenida en cerdos de China (Qi *et al.*, 2020), mientras que el otro aislado mostró una transición de un nucleótido (C x T) con respecto a la secuencia MT648442.1 de *C. parvum* obtenido en un avestruz en China (Zhang y Zhang, no publicado); esta nueva secuencia se depositó en el GenBank con el número de acceso OR157865.

El análisis de las secuencias obtenidas para la *gp60* permitió identificar 11 subtipos diferentes, todos ellos pertenecientes a la familia alélica IIa (Tabla 40). La mayoría de las secuencias obtenidas fueron idénticas a las de diferentes aislados de referencia de animales o humanos depositados en el GenBank. Sin embargo, entre los 155 aislados del subtipo IIaA15G2R1, 10 mostraron diferentes mutaciones (Tabla 40, Figura 23) con respecto a la secuencia de referencia MT010357.1 obtenida en terneros de Uruguay (Caffarena *et al.*, no publicado), aunque ninguna de ellas afectó a la secuencia microsatélite. La mayoría de los aislados con mutaciones presentaron una única transición de un nucleótido (Figura 23). Así, las secuencias de los aislados PD-286, PD-418 y PD-419, procedentes de dos explotaciones diferentes, fueron idénticas entre ellas y mostraron un único polimorfismo (T por C) en la posición 109 que no supuso ningún cambio en el aminoácido codificado. El mismo resultado se observó en el aislado PD-106, que presentó una transición de una A a una G en la posición 243. También se detectó una transición de una adenina a una guanina en las secuencias de los aislados PD-148 (posición 141) y PD- 213 (posición 122) que resultó en la traducción de

USC DE COMPOSTELA

una isoleucina en vez de una valina y de una serina en vez de una glicina, respectivamente. Finalmente, el aislado PD-150 mostró una mutación (A x G) en la posición 3 que también generó una modificación en la codificación del aminoácido (de glicina a ácido aspártico). En un aislado (PD-24) se identificó una única transversión de un nucleótido (T por G) en la posición 111, lo que supuso un cambio en el aminoácido codificado, de glicina a fenilalanina. El aislado PD-189 mostró dos mutaciones (Figura 23): una transición (G x A en la posición 122) que supuso un cambio de serina a glicina y una transversión (T x A en la posición 215) que no generó cambios en el aminoácido codificado. Por su parte, el aislado PD-388 presentó una inserción de una timina en la posición 153 y una única transición (A en vez de G) en la posición 571 (Figura 23) que se tradujo en un cambio en el aminoácido codificado (de cisteína a tirosina).

Tabla 40. Subtipos de *C. parvum* identificados mediante la secuenciación del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa.

Subtipo	Nº de aislados (% de muestras positivas a *C. parvum*)	Secuencia de referencia (nº de aislados)	Homología
IIaA15G2R1	155 (77.1%)	MT010357.1(145) MT010357.1 (8) MT010357.1 (2)	100% 99,9% (1 mutación) 99,7% (2 mutaciones)
IIaA16G3R1	24 (11.9%)	JQ362492.1 (24)	100%
IIaA16G1R1	3 (1.5%)	MT010358.1 (3)	100%
IIaA17G3R1	3 (1.5%)	GU214359.1 (3)	100%
IIaA13G2R1	2 (1.0%)	MN815775.1 (2)	100%
IIaA17R1	2 (1.0%)	LT556066.1 (2)	99,9% (1 mutación)
IIaA18G3R1	2 (1.0%)	MG516786.1 (2)	100%
IIaA14G1R1	1 (0.5%)	MK034687.1 (1)	100%
IIaA14G2R1	1 (0.5%)	KF128738.1 (1)	100%
IIaA17G2R1	1 (0.5%)	MT010359.1 (1)	100%
IIaA17G4R1	1 (0.5%)	MF142039.1 (1)	100%

Asimismo, al comparar las secuencias de los dos aislados del subtipo IIaA17R1 (PD-15 y PD-16) con las depositadas en el GenBank se observó que presentaban una mutación de un único nucleótido en la región no microsatélite del gen. Las secuencias de ambos aislados fueron idénticas entre sí, presentando una homología del 99,9% con la secuencia de referencia LT556066.1 obtenida en muestras fecales de personas de Rumanía (Neagoe *et al.*,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

no publicado); ambas secuencias mostraron una transición de un nucleótido (A por G) en la posición 201, lo que supuso un cambio en el aminoácido codificado, de treonina a alanina.

Todas aquellas secuencias de los subtipos IIaA15G2R1 y IIaA17R1 de *C. parvum* identificadas en el presente estudio que no fueron idénticas a otras secuencias de referencia se depositaron en el GenBank con los números de acceso OR177062-OR177069.

La familia alélica IIa es la predominante en ganado vacuno en España (Quílez *et al.*, 2008b; Díaz *et al.*, 2010) y en el resto del mundo, a excepción de China, donde la IId es la más frecuente (Xiao y Feng, 2017). Nuestros resultados muestran una mayor diversidad genética intraespecífica que la señalada en otras investigaciones realizadas previamente en España, en las que tan sólo se detectaron dos (Díaz *et al.*, 2010) y siete (Quílez *et al.*, 2008b) subtipos *gp60*. No obstante, esta menor variabilidad puede deberse al análisis de un menor número de muestras positivas (entre 30 y 149). Esta hipótesis se vería reforzada por la mayor diversidad genética descrita en estudios realizados en otros países europeos que incluyeron un mayor número de animales. Así, en una investigación efectuada en Irlanda del Norte se detectaron 16 subtipos en 216 muestras positivas a *C. parvum* (Thompson *et al.*, 2007), mientras que en Alemania se identificaron 12 subtipos en 268 muestras identificadas como *C. parvum* (Göhring *et al.*, 2022), lo que muestra una diversidad genética similar a la observada en nuestro trabajo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

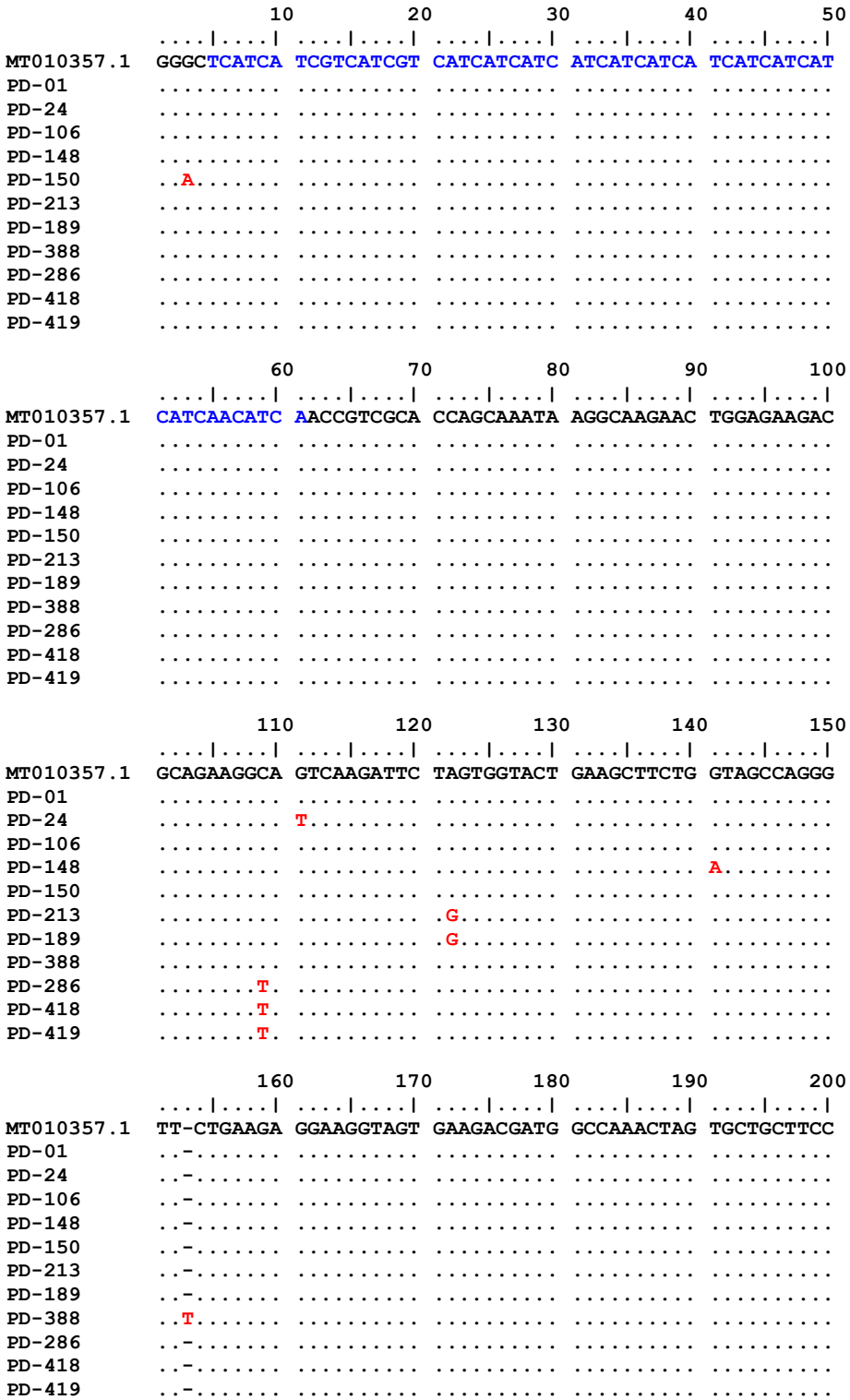


Figura 23. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa de diversos aislados representativos del subtipo IIaA15G2R1 de *C. parvum* identificados en terneros. Los puntos indican nucleótidos idénticos a los del aislado de referencia MT010357.1 y los guiones señalan deleciones. Las mutaciones de nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo y la región microsatélite en azul.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

```
                210        220        230        240        250
            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MT010357.1  CAACCCACTA CTCCAGCTCA AAGTGAAGGC GCAACTACCG AAACCATAGA
PD-01       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-24       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-106      .......... .......... .......... .......... ..G.......
PD-148      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-150      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-213      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-189      .......... ....T..... .......... .......... ..........
PD-388      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-286      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-418      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-419      .......... .......... .......... .......... ..........

                260        270        280        290        300
            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MT010357.1  AGCTACTCCA AAAGAAGAAT GCGGCACTTC ATTTGTAATG TGGTTCGGAG
PD-01       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-24       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-106      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-148      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-150      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-213      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-189      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-388      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-286      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-418      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-419      .......... .......... .......... .......... ..........

                310        320        330        340        350
            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MT010357.1  AAGGTACCCC AGCTGCGACA TTGAAGTGTG GTGCCTACAC TATCGTCTAT
PD-01       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-24       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-106      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-148      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-150      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-213      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-189      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-388      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-286      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-418      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-419      .......... .......... .......... .......... ..........

                360        370        380        390        400
            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MT010357.1  GCACCTATAA AAGACCAAAC AGATCCCGCA CCAAGATATA TCTCTGGTGA
PD-01       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-24       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-106      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-148      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-150      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-213      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-189      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-388      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-286      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-418      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-419      .......... .......... .......... .......... ..........
```

Figura 23. (continuación)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

```
                  410         420         430         440         450
             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MT010357.1   AGTTACATCT GTAACCTTTG AAAAGAGTGA TAATACAGTT AAAATCAAGG
PD-01        .......... .......... .......... .......... ..........
PD-24        .......... .......... .......... .......... ..........
PD-106       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-148       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-150       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-213       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-189       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-388       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-286       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-418       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-419       .......... .......... .......... .......... ..........

                  460         470         480         490         500
             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MT010357.1   TTAACGGTCA GGATTTCAGC ACTCTCTCTG CTAATTCAAG TAGTCCAACT
PD-01        .......... .......... .......... .......... ..........
PD-24        .......... .......... .......... .......... ..........
PD-106       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-148       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-150       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-213       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-189       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-388       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-286       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-418       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-419       .......... .......... .......... .......... ..........

                  510         520         530         540         550
             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MT010357.1   GAAAATGGCG GATCTGCGGG TCAGGCTTCA TCAAGATCAA GAAGATCACT
PD-01        .......... .......... .......... .......... ..........
PD-24        .......... .......... .......... .......... ..........
PD-106       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-148       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-150       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-213       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-189       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-388       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-286       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-418       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-419       .......... .......... .......... .......... ..........

                  560         570         580         590         600
             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MT010357.1   CTCAGAGGAA ACCAGTGAAG CTGCTGCAAC CGTCGATTTG TTTGCCTTTA
PD-01        .......... .......... .......... .......... ..........
PD-24        .......... .......... .......... .......... ..........
PD-106       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-148       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-150       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-213       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-189       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-388       .......... .......... ..A....... .......... ..........
PD-286       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-418       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-419       .......... .......... .......... .......... ..........
```

Figura 23. (continuación)

```
                 610        620        630        640        650
            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MT010357.1  CCCTTGATGG TGGTAAAAGA ATTGAAGTGG CTGTACCAAA CGTCGAAGAT
PD-01       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-24       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-106      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-148      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-150      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-213      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-189      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-388      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-286      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-418      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-419      .......... .......... .......... .......... ..........

                 660        670        680        690        700
            ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
MT010357.1  GCATCTAAAA GAGACAAGTA CAGTTTGGTT GCAGACGATA AACCTTTCTA
PD-01       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-24       .......... .......... .......... .......... ..........
PD-106      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-148      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-150      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-213      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-189      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-388      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-286      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-418      .......... .......... .......... .......... ..........
PD-419      .......... .......... .......... .......... ..........

                 710        720
            ....|....| ....|....| ....|..
MT010357.1  TACCGGCGCA AACAGCGGCA CTACCAA
PD-01       .......... .......... .......
PD-24       .......... .......... .......
PD-106      .......... .......... .......
PD-148      .......... .......... .......
PD-150      .......... .......... .......
PD-213      .......... .......... .......
PD-189      .......... .......... .......
PD-388      .......... .......... .......
PD-286      .......... .......... .......
PD-418      .......... .......... .......
PD-419      .......... .......... .......
```

Figura 23. (continuación)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otra parte, en este estudio no se detectaron subtipos de otras familias alélicas; algunas investigaciones realizadas en diversos países europeos han identificado esporádicamente subtipos pertenecientes a la familia IId en ganado vacuno y, todavía con menor frecuencia, a las familias IIb, IIj y III (Misic y Abe, 2007; Chen *et al.*, 2023). En terneros neonatos con diarrea del norte de España, Quílez *et al.* (2008b) detectaron el subtipo IIdA23G1 en tan sólo dos aislados de los 140 analizados, lo que es indicativo de su escasa frecuencia. La ausencia de subtipos de la familia IId en el presente trabajo podría estar asociada con la zona geográfica, pues en el área en que se llevó a cabo el estudio varias investigaciones han señalado una absoluta predominancia de los subtipos de la familia IIa independientemente del hospedador, incluyendo al ganado vacuno (Díaz *et al.*, 2010, 2021), pequeños rumiantes (Díaz *et al.*, 2010, 2015, 2018a, 2021; García-Presedo *et al.*, 2013), jabalíes (García-Presedo *et al.*, 2013) y al ser humano (Abal-Fabeiro *et al.*, 2015). Por el contrario, en otras zonas del territorio nacional, como la incluida en el trabajo realizado por Quílez *et al.* (2008b), los subtipos de la familia IId son los predominantes en pequeños rumiantes (Quílez *et al.*, 2008a), coincidiendo con estudios previos que señalan que los subtipos IIa infectan preferentemente a bóvidos y los IId a pequeños rumiantes (Xiao, 2010). Por lo tanto, la discrepancia entre los resultados de nuestro estudio y los obtenidos en áreas relativamente próximas podría tener su origen en las características diferenciales de la cabaña ganadera gallega, en la que predomina el ganado vacuno, y en los sistemas de manejo empleados, siendo frecuente encontrar bóvidos, ovinos y caprinos compartiendo pastos e instalaciones, lo que favorecería la circulación de los subtipos de la familia IIa. En efecto, con respecto a esto último, se ha sugerido que el contacto estrecho entre individuos de distintas especies puede favorecer que compartan especies y subtipos de *Cryptosporidium* spp. (Koinari *et al.*, 2014).

En lo que se refiere a los subtipos detectados, se observó un claro predominio del IIaA15G2R1 (Tabla 40), cuya presencia se ha identificado en bóvidos en todo el mundo (Ryan *et al.*, 2021b). Este resultado coincide con investigaciones previas efectuadas en España (Quílez *et al.*, 2008b; Díaz *et al.*, 2010) y otros países europeos (Follet *et al.*, 2011; Kváč *et al.*, 2011; Rieux *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2018b; Holzhausen *et al.*, 2019; Lichtmannsperger *et al.*, 2019; Göhring *et al.*, 2022). Sin embargo, esta situación difiere en otras partes del mundo, donde otros subtipos de la familia IIa fueron más frecuentes. Así, en Australia los subtipos más comúnmente detectados en terneros fueron el IIaA18G3R1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

(O'Brien *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2012) y el IIaA17G2R1 (Ng *et al.*, 2011), mientras que en América del Sur predominaron el IIaA20G1R1 (Del Coco *et al.*, 2014; Lombardelli *et al.*, 2019) y el IIaA21G1R1 (Tomazic *et al.*, 2013). La predominancia del subtipo IIaA15G2R1 reviste una gran relevancia desde el punto de vista de la salud pública, ya que se considera que posee un elevado potencial zoonósico. De hecho, varios estudios demuestran que es el más común en casos de criptosporidiosis humana por *C. parvum* en España (Ramo *et al.*, 2015; Segura *et al.*, 2015; de Lucio *et al.*, 2016; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017) y en otras partes del mundo (Xiao, 2010; McKerr *et al.*, 2015; Berahmat *et al.*, 2017; Chalmers *et al.*, 2019). Por lo tanto, su elevada prevalencia en los terneros incluidos en este trabajo sugiere que el ganado vacuno podría actuar como reservorio del mismo y, por tanto, ser el responsable de muchos brotes detectados en personas. En esta línea, los estudios que compararon los subtipos de *C. parvum* identificados en muestras fecales de personas y bóvidos de una misma zona muestran un elevado porcentaje de coincidencia entre aislados humanos y bovinos (Ng *et al.*, 2008, 2012), sugiriendo que el ganado vacuno constituye un importante reservorio de subtipos zoonósicos de *C. parvum.*

El segundo subtipo más frecuente fue el IIaA16G3R1 (Tabla 40), que tiene una amplia distribución, siendo uno de los más prevalentes en terneros diarreicos a nivel mundial (Chen *et al.*, 2023) y habiéndose identificado de forma reiterada en estudios realizados en Europa (Thompson *et al.*, 2007; Quílez *et al.*, 2008b; Rieux *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2018b; Razakandrainibe *et al.*, 2018; Holzhausen *et al.*, 2019; Göhring *et al.*, 2022). Además, también presenta potencial zoonósico, ya que se ha identificado en personas con criptosporidiosis en Europa (Stensvold *et al.*, 2015) y en otras partes del mundo (Trotz-Williams *et al.*, 2006; Kiani *et al.*, 2017; Hailu *et al.*, 2021), si bien con mucha menor frecuencia.

Los nueve subtipos restantes se identificaron de forma esporádica, no superando en ningún caso los tres aislados positivos (Tabla 40). No obstante, resulta reseñable que en este trabajo se citan por primera vez los subtipos IIaA13G2R1, IIaA14G1R1, IIaA14G2R1, IIaA16G1R1, IIaA17G3R1, IIaA17G4R1 y IIaA17R1 en ganado vacuno en España. Estos subtipos también han demostrado tener potencial zoonósico (O' Leary *et al.*, 2020; Lebbad *et al.*, 2021), lo que apoya firmemente el hecho de que los terneros que padecen NCD, con carácter general, constituyen un importante reservorio de *C. parvum* para el ser humano. De

hecho, en este estudio, aproximadamente uno de cada dos terneros con NCD eliminaba ooquistes de subtipos zoonósicos de *C. parvum*. Sin embargo, resulta llamativo que en este estudio no se haya identificado el subtipo IIaA13G1R1, presente en estudios previos realizados en Galicia tanto en vacuno, como en pequeños rumiantes y animales silvestres (Díaz *et al.*, 2010, 2012, 2015; García-Presedo *et al.*, 2013; Soilán, 2014), si bien en proporciones muy reducidas en todos los casos; esto podría explicar su ausencia en este trabajo. Es preciso señalar que este subtipo parece tener potencial zoonósico, pues se ha detectado en personas inmunodeprimidas en algunas partes del mundo (Iqbal *et al.*, 2012; Hatalová *et al.*, 2019).

Finalmente, al igual que se comentó en el Estudio I con respecto al análisis genotípico de *Cryptosporidium* spp., los resultados del análisis subtípico de *C. parvum* también apuntan a la elevada morbilidad de este protozoo dentro de la explotación; en aquellas granjas donde se dispuso de al menos dos aislados se identificó siempre el mismo subtipo, excepto en dos explotaciones en las que se detectaron dos subtipos: IIaA17G3R1 y IIaA15G2R1 en una de ellas, y IIaA15G2R1 y IIaA16G3R1 en la otra. En este sentido, se ha sugerido que la detección de varios subtipos del protozoo dentro de una misma explotación podría estar asociada a la introducción de animales procedentes de otras granjas (Peng *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2007; Quílez *et al.*, 2008b).

4.3.2. Caracterización molecular de *Giardia duodenalis*

De las 74 muestras en las que se hallaron quistes de *G. duodenalis* mediante IFAT, tan sólo el 9,5% (7/74) fueron positivas a la PCR para alguno de los tres genes analizados. El mayor número de muestras positivas se obtuvo al amplificar el gen *gdh* (5/74), mientras que las PCR para los genes *bg* y *tpi* permitieron obtener 4 y 3 positivos, respectivamente. De las 74 muestras en las que se hallaron quistes de *G. duodenalis* mediante IFAT, tan sólo el 9,5% (7/74) fueron positivas a la PCR para alguno de los tres genes analizados. El mayor número de muestras positivas se obtuvo al amplificar el gen *gdh* (5/74), mientras que las PCR para los genes *bg* y *tpi* permitieron obtener 4 y 3 positivos, respectivamente. Únicamente dos muestras (PD-295 y PD-318) resultaron positivas a las tres PCRs, mientras

que en otra (PD-306) se obtuvieron amplicones del tamaño esperado para los genes que codifican para la *gdh* y la *tpi*. Finalmente, las muestras PD-12 y PD-29 resultaron solo positivas para el gen *bg* y la PD-157 y PD-350 solo para la *gdh.*

De las 5 secuencias obtenidas para el gen *gdh*, 2 fueron idénticas a la secuencia de referencia MK561341, mientras que las otras tres secuencias mostraron una transición de un nucleótido cada una (C por T en la posición 89 en la muestra PD-157, y A por G en la posición 44 y 125 en las muestras PD-350 y PD-306, respectivamente). Ninguna de estas mutaciones repercutió en el aminoácido codificado.

El análisis de las secuencias del gen *tpi* permitió constatar que todos los aislados obtenidos mostraban discrepancias de uno o dos nucleótidos con respecto a la secuencia de referencia AB569406. Así, la secuencia del aislado PD-306 mostró una transición T por C en la posición 510 que supuso la traducción de cisteína en vez de glicina. La muestra PD-318 también mostró una transición de C por T en la posición 543, que también se tradujo en un cambio en el aminoácido codificado, de valina a leucina. Finalmente, el aislado PD-295 mostró una transversión G por T en la posición 83 y una transición A por G en la posición 87; ambas mutaciones repercutieron en el aminoácido codificado: ácido glutámico en vez de ácido aspártico en la primera, e isoleucina en vez de valina en la segunda.

Finalmente, dos de las tres secuencias obtenidas para el gen *bg* fueron idénticas a la secuencia de referencia LC484286. La otra secuencia (PD-12) mostró tres transiciones (T por C en las posiciones 290 y 497 y G por A en la posición 296) que no supusieron ningún cambio en el aminoácido codificado.

Las secuencias de *G. duodenalis* identificadas en el presente estudio que no fueron idénticas a otras secuencias de referencia se depositaron en el GenBank con los números de acceso OR238467-OR238477.

El análisis de las secuencias obtenidas permitió determinar que todos los aislados, independientemente del gen estudiado, pertenecían al genotipo E, que es el más común en ganado vacuno (Taghipour *et al.*, 2022). La dificultad para determinar el genotipo de la mayoría de las muestras incluidas en este estudio puede ser consecuencia del gran polimorfismo del genotipo E; de hecho, casi todas las muestras que amplificaron mostraron

una gran variabilidad en sus secuencias. Además, este polimorfismo en las secuencias del genotipo E se ha observado previamente en diversos trabajos realizados en distintas partes del mundo. En efecto, Wang *et al.* (2017b), en 486 secuencias positivas al genotipo E, detectaron 12 diferentes al amplificar el gen *bg*, y 13 y 17 para los genes *gdh* y *tpi*; mientras que Feng *et al.* (2019), en 287 secuencias pertenecientes al genotipo E, identificaron 15 para el gen *bg*, 10 para el *gdh* y 17 para el *tpi*. De forma similar, Hublin *et al.* (2022) detectaron 24 secuencias distintas para el genotipo E en 314 analizadas, si bien solamente amplificaron el gen *bg*. Esta gran variabilidad podría haber resultado en la presencia de mutaciones en las regiones de ensamblaje de los cebadores que provocasen un fallo en la amplificación de la secuencia y, por lo tanto, explicaría el reducido número de muestras positivas a IFAT que se lograron amplificar en el presente estudio. Aunque, con carácter general, el genotipo E no se considera zoonótico, recientemente se ha identificado de forma ocasional en personas (Abdel-Moein y Saeed, 2016; Fantinatti *et al.*, 2016; Zahedi *et al.*, 2017; Garcia-R *et al.*, 2021; Iwashita *et al.*, 2021; Ogbuigwe *et al.*, 2022), por lo que estos resultados muestran que no se puede excluir que los terneros infectados supongan un riesgo para la salud pública.

Nuestro estudio aporta los primeros datos moleculares acerca de los genotipos de *G. duodenalis* presentes en las heces de terneros diarreicos menores de un mes en Galicia. Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con los obtenidos previamente por Castro-Hermida *et al.* (2011) en terneros asintomáticos de Galicia menores de un mes, donde predominó el genotipo A en 10 de los 12 aislados de *G. duodenalis* genotipados, mientras que la presencia del genotipo E se limitó a los dos restantes. No obstante, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Mendonça *et al.* (2007) en terneros del norte de Portugal, ya que, si bien se identificó el genotipo A en 2 de los 13 aislados genotipados, el genotipo E resultó predominante, estando presente en 11 muestras. No obstante, en este último estudio no se aporta información sobre si los animales incluidos eran diarreicos o sanos. Teniendo en cuenta estos resultados, y considerando el reducido número de aislados genotipados, no podemos descartar por completo la presencia del genotipo zoonósico A en las heces de los animales incluidos en nuestro estudio, sobre todo si tenemos en cuenta que las técnicas empleadas en la actualidad para el genotipado de *G. duodenalis* no son especialmente sensibles (Hublin *et al.*, 2022). Como consecuencia de esto, se podrían obtener resultados incompletos, especialmente en el caso de infecciones mixtas en las que uno de los genotipos sea muy predominante (Hublin *et al.*, 2022).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Cabe destacar que en este estudio, que únicamente incluye animales con diarrea, sólo se ha identificado el genotipo E, lo que podría indicar una mayor patogenicidad del mismo en relación con otros genotipos; la escasa prevalencia de este genotipo en terneros asintomáticos de la misma región (Castro-Hermida *et al.*, 2011) reforzaría esta hipótesis. En la misma línea, Gillhuber *et al.,* (2014) detectaron el genotipo E como único patógeno en diversas muestras de terneros diarreicos, mientras que el A sólo se encontró en infecciones mixtas con *Cryptosporidium* spp. o *Eimeria* spp. En este sentido, Read *et al.* (2002) sugirió que algunos genotipos de *G. duodenalis* podrían presentar una mayor patogenicidad en humanos; así, se observó que las infecciones con el genotipo A presentaban una probabilidad 26 veces mayor de causar diarrea que las provocadas por el genotipo B, y que este último era más prevalente en individuos asintomáticos que el primero. Por lo tanto, es preciso analizar un mayor número de muestras para dilucidar esta cuestión en ganado vacuno, especialmente en terneros diarreicos.

En definitiva, la caracterización de las especies y subtipos de *Cryptosporidium* spp. y los genotipos de *G. duodenalis* implicados en un brote es muy útil para determinar su origen, sus vías de transmisión y diseminación en la explotación, lo que permite aplicar las medidas de control más adecuadas en cada caso. Además, tiene una gran relevancia desde la óptica de la salud pública, ya que permite determinar el riesgo de transmisión zoonósica. En efecto, en nuestro estudio un porcentaje considerable de las muestras positivas presentaban subtipos y genotipos que se han detectado en el ser humano, lo que implica un riesgo para las personas que están en contacto con terneros diarreicos, especialmente ganaderos y veterinarios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. ESTUDIO III:

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÉNICAS AISLADAS DE TERNEROS DIARREICOS DEL NOROESTE DE ESPAÑA.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Debido a las elevadas pérdidas económicas asociadas a la aparición de un brote de NCD, ya señaladas previamente, tras el diagnóstico del proceso el veterinario y el ganadero adoptan una serie de medidas de control y tratamiento, entre las que se encuentra con mucha frecuencia la antibioterapia (Eibl *et al.*, 2021). Sin embargo, su uso ha generado una gran controversia en las últimas décadas. En este sentido, se han esgrimido numerosas razones que desaconsejan la antibioterapia en casos de NCD. En primer lugar, su empleo no debe basarse solo en la sospecha clínica, pues la sintomatología es similar independientemente del enteropatógeno implicado; así, el uso de antibióticos carecería de justificación en el caso de diarreas causadas por agentes de naturaleza vírica o parasitaria (Díaz *et al.*, 2019). Además, en animales con diarrea leve o moderada se ha descrito un incremento en la gravedad del proceso tras la administración de un tratamiento antibiótico, lo que podría deberse a la disminución de la capacidad de la microbiota normal para limitar la colonización intestinal por microorganismos exógenos y el sobrecrecimiento de microorganismos potencialmente patógenos (Wagner *et al.*, 2008; Berge *et al.*, 2009). Por lo tanto, la mayoría de los autores recomiendan limitar la antibioterapia a aquellos casos donde se haya confirmado el origen bacteriano del proceso y el animal muestre signos clínicos sistémicos como fiebre, elevada deshidratación, disminución del reflejo de succión, debilidad, incapacidad para mantenerse en pie o depresión, o la presencia de sangre o mucosidad en las heces (Constable, 2004; Constable *et al.*, 2009; Heller y Chigerwe, 2018).

No obstante, la principal razón por la cual es preciso evitar la antibioterapia en casos de NCD radica en que su uso indiscriminado favorece la selección de bacterias resistentes a antibióticos (Von Baum y Marre, 2005). Este hecho supone un grave problema al reducir de forma muy considerable las opciones terapéuticas para controlar de forma eficaz las infecciones bacterianas en humanos y animales. De hecho, en la Unión Europea, se estima que unas 33.000 muertes anuales son consecuencia de infecciones por bacterias multirresistentes y, por ello, la resistencia a los antibióticos se considera uno de los principales problemas de salud pública que se deben afrontar en los próximos años (Anderson *et al.*, 2019; Organización Mundial de la Salud, 2022). Debido a las graves consecuencias tanto sanitarias como económicas del desarrollo de resistencias, el uso

USC DE COMPOSTELA

racional de los antibióticos es actualmente una preocupación mundial que ha llevado a la implantación de estrategias tanto en el ámbito europeo como internacional (Agencia Europea del Medicamento, 2020; Organización Mundial de la Salud, 2022). Por ejemplo, en la Unión Europea se ha restringido notablemente el empleo de antibióticos en veterinaria, de modo que la administración de algunas familias de estos compuestos en animales de renta está condicionada a los resultados de un antibiograma previo, mientras que otras se han prohibido (Agencia Europea del Medicamento, 2020).

Para comprender la importancia del desarrollo de resistencias a antibióticos asociadas a un determinado agente bacteriano y su evolución en el tiempo es esencial realizar estudios, en regiones concretas, que permitan comprobar si dicho microorganismo muestra resistencia a un amplio rango de compuestos; así, la información obtenida permite optimizar la selección de los compuestos a emplear en la práctica clínica (Von Baum y Marre, 2005; Pereira *et al.*, 2014). La detección de las resistencias asociadas a un agente bacteriano puede realizarse de diversas formas. La primera de ellas consiste en la determinación fenotípica de los patrones de resistencia, mediante la exposición del agente bacteriano a diversos antibióticos de concentración determinada, y la interpretación del patrón fenotípico obtenido, que permite deducir los mecanismos de resistencia subyacentes y predecir la respuesta clínica a un antibiótico, incluso aunque éste no se haya empleado en el análisis (Livermore *et al.*, 2001; Cantón, 2010). Sin embargo, en algunos casos su realización puede ser lenta debido a la duración de las fases de latencia y crecimiento de las bacterias sometidas al análisis; además, puede dar lugar a resultados no concluyentes (Anjum *et al.*, 2017; van Belkum *et al.*, 2020). Para incrementar el rendimiento y reducir el tiempo necesario para obtener resultados, en la actualidad se ha extendido el uso de sistemas automatizados como VITEK-2 (bioMérieux), MicroScan (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd, UK), BD Phoenix (BD Diagnostics) o Sensititre ARIS 2X (Thermo Fisher Scientific) (van Belkum *et al.*, 2020), aunque ninguno de ellos permite conocer con exactitud los mecanismos de resistencia presentes en la cepa bacteriana testada (Anjum, 2015). Por ello, se han desarrollado técnicas moleculares que permiten caracterizar las resistencias antibióticas. Sin embargo, dada la gran diversidad de genes potencialmente implicados en las resistencias, no resulta sencillo identificarlos todos en función de su secuencia nucleotídica, pues continuamente se descubren nuevos genes o variantes alélicas de los ya conocidos (Anjum *et al.*, 2017). Además, es importante tener en cuenta que la presencia de un determinante de

resistencia no siempre implica su expresión y, por tanto, la manifestación fenotípica de la resistencia a nivel de campo (Cantón, 2010). Como consecuencia de todo ello, el empleo de estas técnicas todavía no es excluyente de la determinación fenotípica.

Entre los agentes bacterianos implicados en la NCD y, por lo tanto, frente a los que se emplearía la antibioterapia, se incluyen habitualmente *Salmonella* spp. y varios patotipos de *E. coli*, como el enterotoxigénico (ETEC), enteropatógeno (EPEC), enterohemorrágico (EHEC) y, en menor medida, productor de toxinas Shiga (STEC). Sin embargo, la prevalencia de *Salmonella* spp. en terneros diarreicos y en el conjunto del ganado bovino es, actualmente, muy baja (De La Fuente *et al.*, 1999; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2022), por lo que su relevancia en la NCD es escasa. Por el contrario, *E. coli* continúa siendo una de las causas más comunes de NCD, aunque no todos los patotipos mencionados tienen la misma importancia en el proceso. De hecho, EPEC, EHEC y STEC se han detectado con frecuencia en heces de terneros sanos, por lo que todavía se desconoce si realmente se asocian con la aparición de NCD (Kolenda *et al.*, 2015). Sin embargo, ETEC se ha relacionado inequívocamente con la manifestación clínica del proceso y, de hecho, es el patotipo de *E. coli* involucrado con mayor frecuencia en la aparición de diarrea en los animales de interés ganadero (Nagy y Fekete, 2005). Estas cepas causan una diarrea secretora principalmente en los primeros días de vida, que puede ir acompañada de otros signos clínicos indicativos de enfermedad sistémica (Foster y Smith, 2009; Gyles y Fairbrother, 2010; Heller y Chigerwe, 2018).

Se han realizado diversos estudios para comprobar la evolución de las resistencias de las cepas de *E. coli* procedentes de terneros neonatos con diarrea, detectándose en ellos la presencia de cepas multirresistentes (Orden *et al.*, 2000; Gunn *et al.*, 2003; Donaldson *et al.*, 2006; Güler *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2009; Berge *et al.*, 2010; De Verdier *et al.*, 2012; Shahrani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2017; Umpiérrez *et al.*, 2017; Cengiz y Adigüzel, 2020; Feuerstein *et al.*, 2022; Jia *et al.*, 2022). Sin embargo, los trabajos que se centran en un patotipo determinado son muy escasos; teniendo en cuenta que, como se ha mencionado previamente, ETEC es el principal patotipo diarreagénico, es preciso prestar especial atención a las resistencias asociadas al mismo, lo que permitirá optimizar la selección de los antibióticos a emplear frente a las bacterias más comunes causantes de NCD.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En base a estos antecedentes, este tercer Estudio se centra en conocer la presencia y evolución de las resistencias de ETEC a nivel de campo en terneros diarreicos menores de un mes del noroeste de España, planteándose los siguientes objetivos:

1º. Determinar, empleando un sistema automatizado de caracterización fenotípica, la susceptibilidad a cinco familias antibióticas (beta-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y trimetoprim-sulfonamidas) de las cepas de ETEC aisladas de las heces de terneros diarreicos del noroeste de España.
2º. Determinar la frecuencia de las resistencias frente a los beta-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y trimetoprim-sulfonamidas en estas cepas, así como la presencia de cepas multirresistentes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este Estudio, se seleccionaron aquellas muestras fecales de terneros diarreicos menores de un mes empleadas en el Estudio I en las que se confirmó la presencia de la fimbria F5 y la enterotoxina STa, y que además presentaban valores de Ct inferiores a 25 para ambos genes (41/420; 9,8%). Posteriormente, de cada una de las placas de agar MacConkey en las que se habían sembrado estas muestras, se seleccionaron tres colonias compatibles con *E. coli* por su capacidad de fermentar la lactosa, de forma que se incrementase la posibilidad de identificar al menos una colonia de ETEC por muestra. Dichas colonias se resembraron en placas de agar sangre (VWR Chemicals, Llinars del Vallès, España), se incubaron a 37ºC durante 24 horas y, para confirmar que se trataba de cepas de *E. coli*, se efectuó su identificación bioquímica empleando el sistema API (API 20E, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia). A continuación, empleando los mismos protocolos descritos en el Estudio I, se extrajo el ADN de cada una de las cepas de *E. coli* resembradas y se realizó la qPCR para detectar la producción de la fimbria F5 y la enterotoxina STa y así confirmar que se trataban de cepas de ETEC.

Una vez realizada la confirmación, se seleccionaron todas las cepas de ETEC disponibles; en el caso de que se hubiese confirmado más de una cepa de ETEC en la misma muestra, se escogió una de ellas al azar. Dichas cepas se resembraron en placas de agar sangre, que se incubaron a 37ºC durante 24 horas. Del cultivo puro obtenido para cada una, se seleccionaron dos o tres colonias que se suspendieron en 2 ml de solución salina estéril para alcanzar una turbidez de McFarland de entre 0,55 y 0,62. Esta suspensión se empleó como punto de partida para las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos (AST), que se efectuaron con el sistema automatizado VITEK-2 y la tarjeta AST-GN96 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) para bacterias Gram negativas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta tarjeta es específica para muestras de origen animal y permite analizar la susceptibilidad de bacilos Gram negativos aerobios, incluidos aquellos con relevancia clínica, a 14 antibióticos que representan las cinco familias más empleadas en veterinaria (beta-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y trimetoprim-sulfonamidas). Además, también permite identificar aquellas cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), es decir, aquellas resistentes a todas las penicilinas,

USC DE COMPOSTELA

cefalosporinas y aztreonam. La tarjeta cuenta con varios pocillos con diversas concentraciones de cada antibiótico (Anexo I) en los que se inoculó la suspensión antes mencionada. El sistema realiza una monitorización continua del crecimiento bacteriano en cada pocillo midiendo su turbidez mediante espectrofotometría, lo que permite determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico para cada una de las cepas testadas. Este valor de CMI se corresponde con la concentración más baja (en mg/L) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana. Así, los resultados de la CMI permitieron clasificar los aislados de ETEC como susceptibles (S), intermedios (I) o resistentes (R) a cada antibiótico de acuerdo con los puntos de corte indicados en diferentes estándares internacionales (Tabla 41). Además, en base a la CMI de cada una de las cepas analizadas, se obtuvo la concentración mínima necesaria de cada antibiótico para inhibir el crecimiento del 90% de las cepas (CMI90).

Tabla 41. Antibióticos utilizados en las pruebas de susceptibilidad con los puntos de corte de la concentración mínima inhibitoria y el estándar internacional empleado para cada uno.

Familia de antibióticos	Antibiótico	Puntos de corte de la CMI			Estándar utilizado
		S	I	R	
Beta-lactámicos	Ampicilina	≤ 8		≥ 16	CLSI
	Amoxicilina/Ácido clavulánico	≤ 8		≥ 16	CLSI
	Cefalexina	≤ 4		≥ 8	CLSI
	Cefalotina	≤ 2	4	≥ 8	CLSI
	Ceftiofur	≤ 2	4	≥ 8	CLSI
	Cefoperazona	≤ 16	32	≥ 64	CLSI
	Cefquinoma	≤ 2	4	≥ 8	CA-SFM
Aminoglucósidos	Gentamicina	≤ 2	4	≥ 8	CLSI
	Neomicina	≤ 8	16	≥ 32	CA-SFM
Fluoroquinolonas	Flumequina	≤ 8		≥ 16	CLSI
	Enrofloxacino	≤ 0.5	1	≥ 2	EUCAST
	Marbofloxacino	≤ 1	2	≥ 4	CLSI
Tetraciclinas	Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16	CLSI
Sulfonamidas	Trimetoprim/Sulfametoxazol	≤ 40		≥ 80	CLSI

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que, en granjas del noroeste de España, las resistencias a antibióticos son muy frecuentes en cepas de ETEC aisladas de terneros menores de un mes con diarrea. Así, todas las cepas fueron resistentes a al menos cuatro de los catorce antibióticos testados (Figura 24); además, más de la mitad de los ETEC aislados (51%) resultaron resistentes a diez o más compuestos (Figura 24). Al considerar la familia antibiótica, se constató que todas las cepas fueron resistentes a al menos un compuesto de tres de las cinco familias testadas, pudiendo categorizarse por tanto como cepas multirresistentes (MDR) (Magiorakos *et al.*, 2012). En este sentido, la combinación de resistencias más frecuente, presente en un 43,9% de las cepas, abarcaba 10 antibióticos diferentes: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalexina, cefalotina, neomicina, flumequina, enrofloxacino, marbofloxacino, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol (Tabla 42). Asimismo, se detectó un 5% de cepas productoras de BLEE.

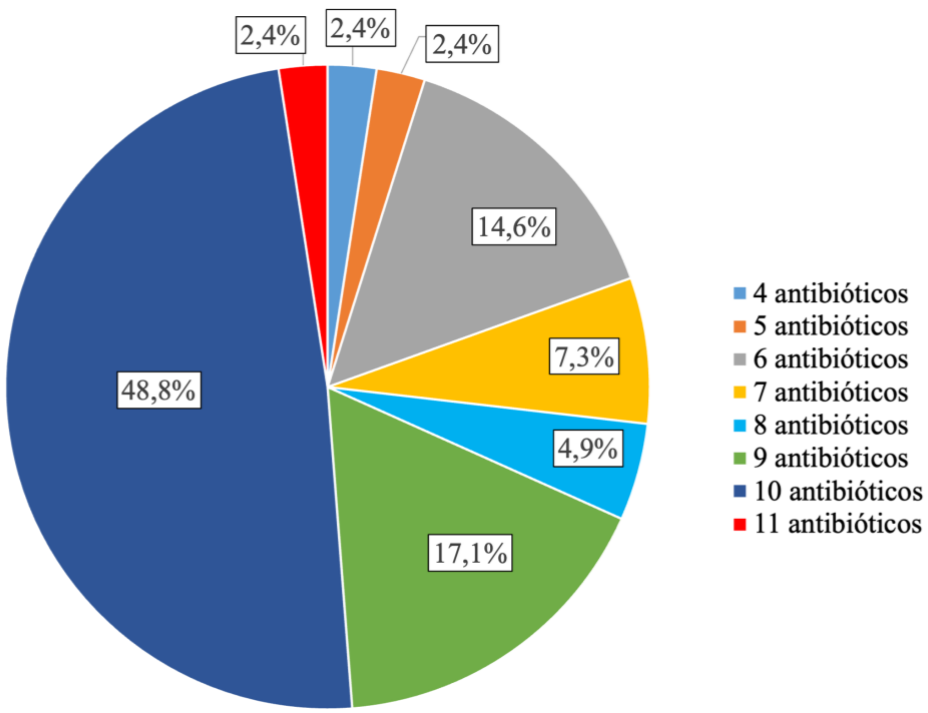


Figura 24. Porcentaje de cepas de *E. coli* enterotóxigénica en función del número de antibióticos frente a los que mostró resistencia.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 42. Combinaciones de resistencias detectadas en más de un aislado de *E. coli* enterotoxigénica y su frecuencia.

Combinación de resistencias	Frecuencia
Ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalexina, cefalotina, neomicina, flumequina, enrofloxacino, marbofloxacino, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol	43,9% (18/41)
Ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalexina, cefalotina, neomicina, flumequina, enrofloxacino, marbofloxacino y trimetoprim/sulfametoxazol	14,6% (6/41)
Ampicilina, cefalexina, cefalotina, flumequina, enrofloxacino y trimetoprim/sulfametoxazol	7,3% (3/41)

Por lo tanto, nuestros resultados muestran una situación muy preocupante y una evolución negativa con respecto a los datos obtenidos previamente en España, donde sólo se detectaron un 6,1% de cepas de ETEC MDR y un 32% de aislados de *E. coli* resistentes a más de ocho compuestos (Orden *et al.*, 2000). Además, si se tienen en cuenta los resultados obtenidos recientemente en otros países europeos, la tendencia es también alarmante. Así, Feuerstein *et al.* (2022), en un estudio realizado en Alemania en el que se incluyeron 7.358 terneros, detectaron un 82,4% de aislados de *E. coli* MDR. Asimismo, en Suecia se han encontrado también porcentajes elevados de aislados de *E. coli* MDR (61%) (De Verdier *et al.*, 2012), si bien ninguna de las cepas incluidas en ese estudio eran ETEC. Las investigaciones realizadas en otras zonas del mundo reflejan una situación muy similar a la detectada en nuestro trabajo e igual de preocupante. En China, Jia *et al.* (2022) estudiaron 35 terneros diarreicos menores de un mes, detectando un 38% de cepas de *E. coli* resistentes a más de diez de los veinte compuestos testados, con un 100% de aislados resistentes a la ampicilina. Además, se han descrito porcentajes elevados de cepas de *E. coli* MDR en otros trabajos realizados en Estados Unidos (32,4%) o en la India (84,6%) (Berge *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2017). El análisis de todos estos resultados en conjunto muestra que la presencia de cepas de *E. coli* MDR y altamente resistentes en las heces de terneros diarreicos es un grave problema a nivel mundial, frente al cual es necesario actuar de forma rápida y contundente.

No obstante, se hallaron diferencias notables en el número de cepas resistentes a cada antibiótico (Figura 25), que se constataron al considerar los resultados de la CMI (Figuras

26 y 27). Así, al tener en cuenta los antibióticos con mayores tasas de susceptibilidad (ceftiofur, cefoperazona, cefquinoma y gentamicina), se observó que la mayoría de las cepas fueron sensibles a la concentración mínima incluida en el estudio. En el caso de aquellos antibióticos frente a los cuales fueron resistentes la mayoría de las cepas, se observaron tres patrones. En primer lugar, en el caso de la amoxicilina/ácido clavulánico, la mayoría de los aislados mostraron un valor de CMI considerado como resistente pero cercano al punto de corte. En segundo lugar, en el caso de las fluoroquinolonas marbofloxacino y enrofloxacino, el valor de CMI de la mayoría de las cepas se correspondió con la máxima concentración de antibiótico utilizada, mientras que un porcentaje reducido se clasificaron como susceptibles o intermedias. Sin embargo, la flumequina, otra fluoroquinolona, mostró un patrón de cepas muy polarizado, con un pequeño número de aislados susceptibles a la mínima concentración empleada mientras que el resto fueron resistentes a la máxima concentración. Esta última distribución también se observó para otros antibióticos como la neomicina, la tetraciclina y el trimetoprim/sulfametoxazol. Por último, en los antibióticos frente a los que todas las cepas mostraron resistencia se observaron dos situaciones: en el caso de la ampicilina, el 100% de los aislados presentaron un valor de CMI igual o superior a la máxima concentración empleada, mientras que en el de la cefalexina y la cefalotina, las cepas de ETEC mostraron varios valores de CMI distribuidos por la categoría de resistentes. Además, la CMI90 fue equivalente a la mayor de las concentraciones utilizadas en 8 de los 14 antibióticos testados (Figuras 26 y 27), lo que indica que la mayoría de las cepas fueron resistentes a la máxima concentración de esos compuestos, mostrando por tanto una gran resistencia a los mismos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

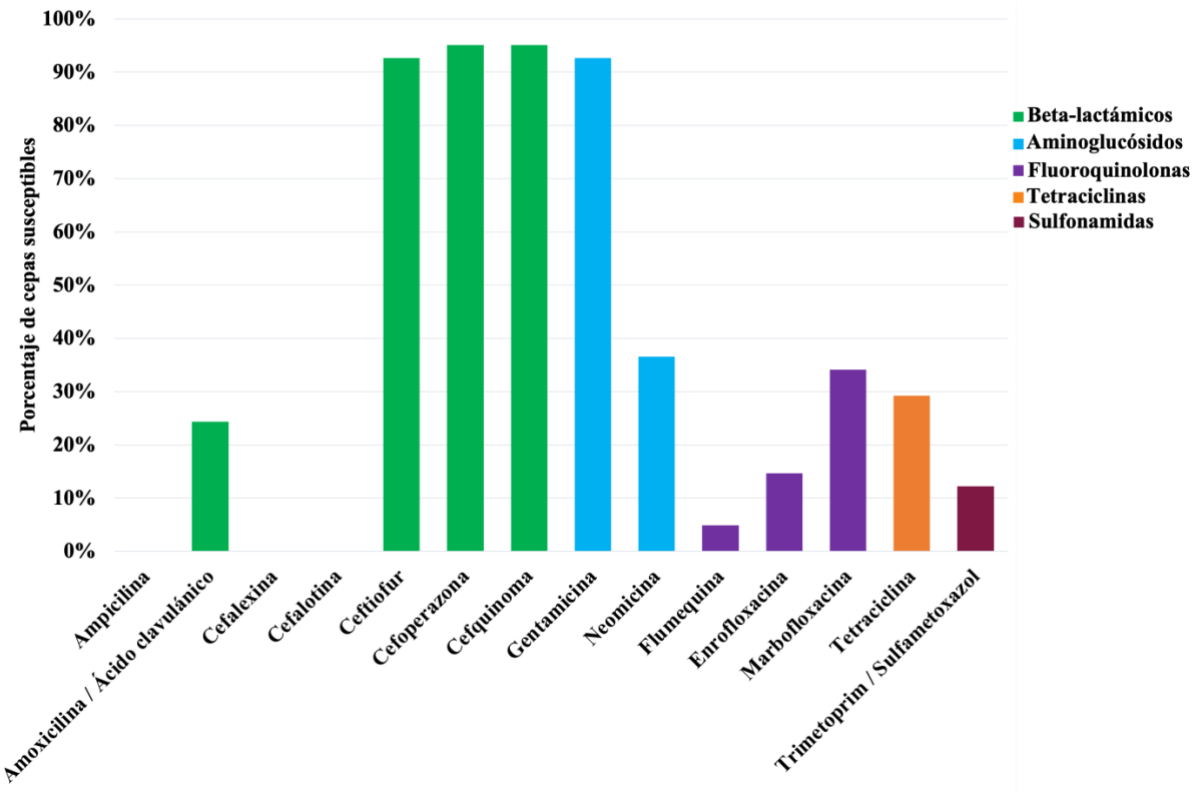


Figura 25. Porcentaje de cepas de *E. coli* enterotoxigénica susceptibles a cada antibiótico testado.

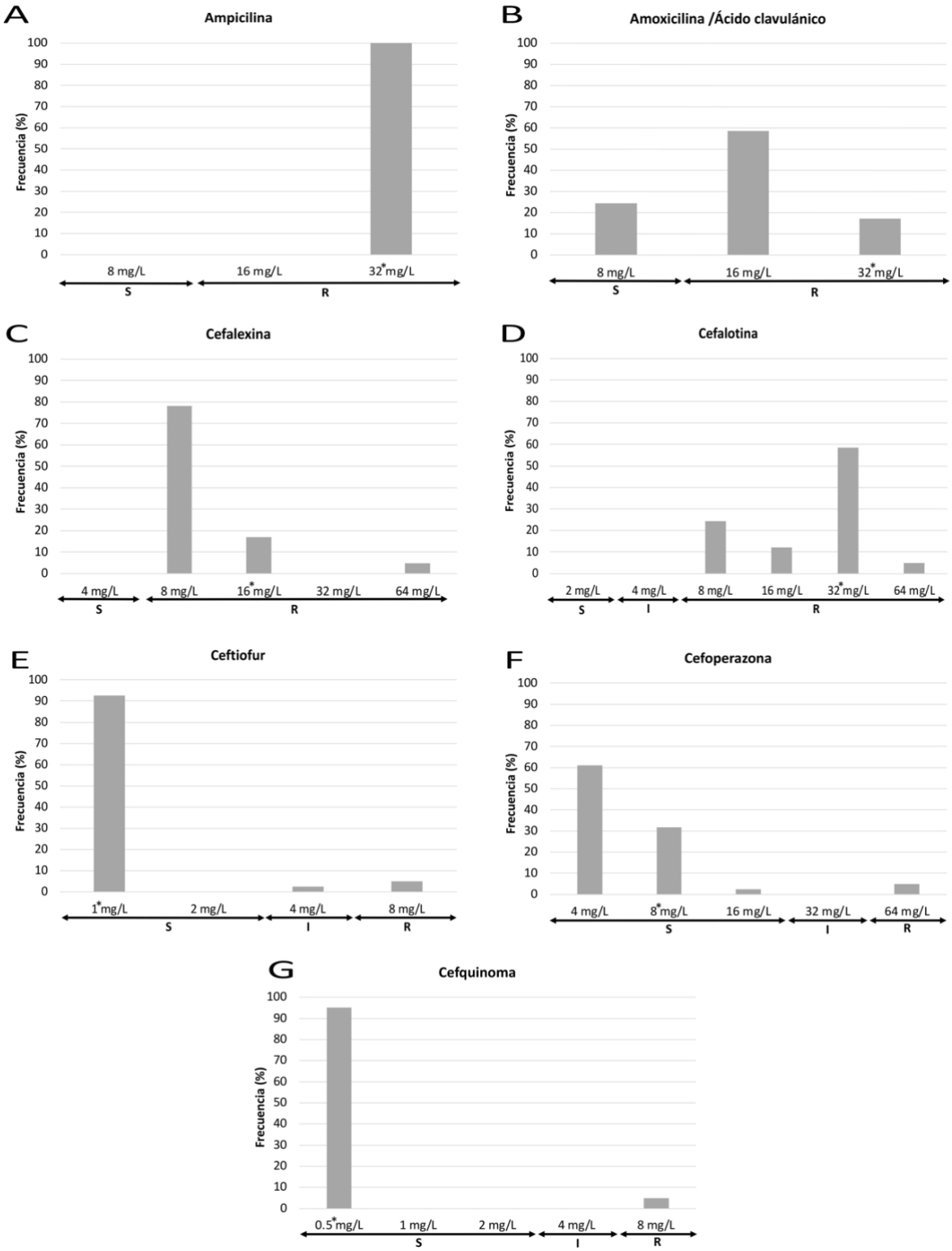


Figura 26. Frecuencias de la concentración mínima inhibitoria para los diferentes antibióticos beta-lactámicos testados: ampicilina (A), amoxicilina/ácido clavulánico (B), cefalexina (C), cefalotina (D), ceftiofur (E), cefoperazona (F) y cefquinoma (G). El asterisco (*) indica la CMI90. S: susceptible a una dosis estándar, I: intermedio (susceptible a dosis incrementadas), R: resistente.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

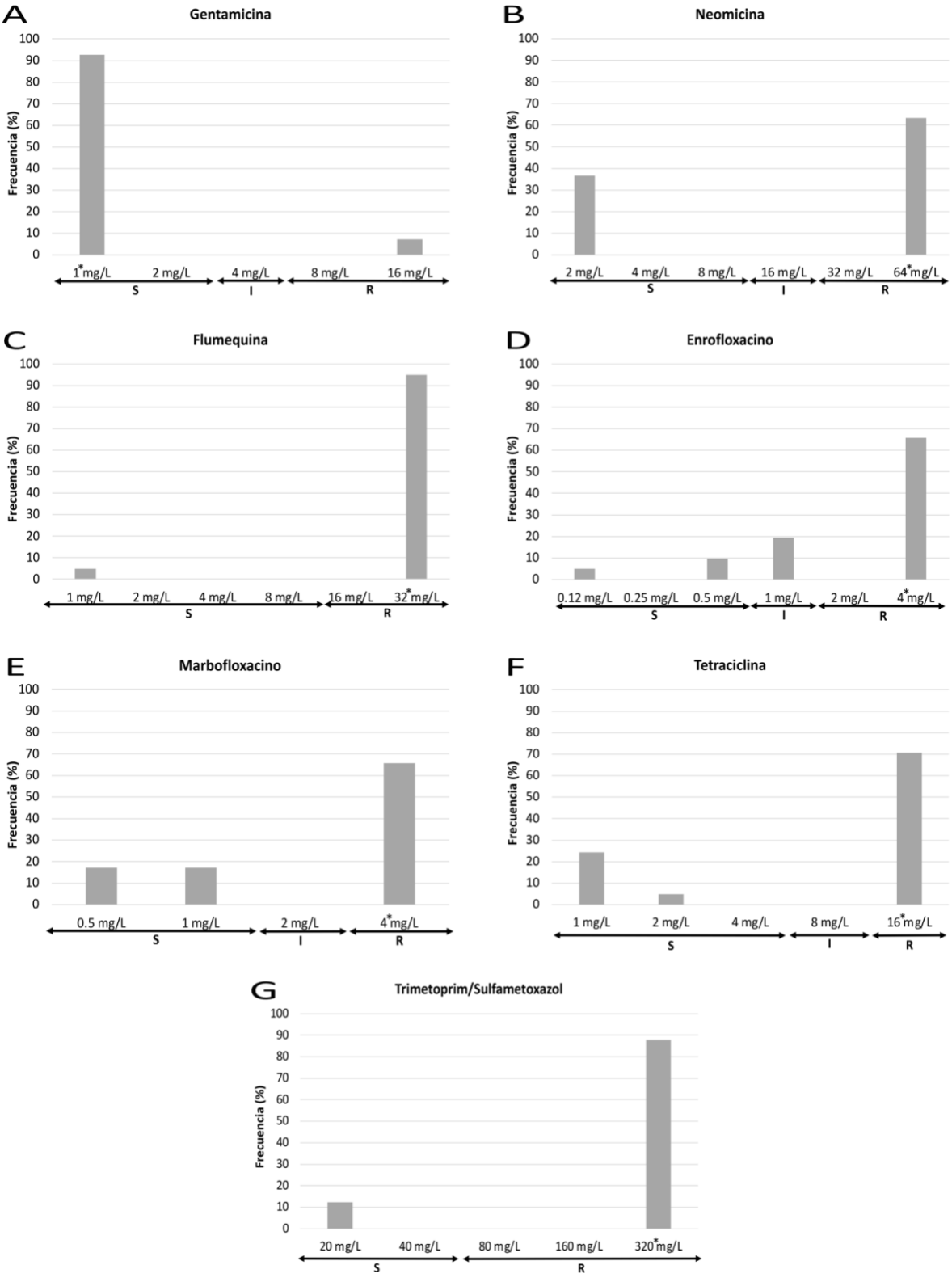


Figura 27. Frecuencias de la concentración mínima inhibitoria para la gentamicina (A), neomicina (B), flumequina (C), enrofloxacino (D), marbofloxacino (E), tetraciclina (F) y trimetoprim/sulfametoxazol (G). El asterisco (*) indica la CMI90. S: susceptible a una dosis estándar, I: intermedio (susceptible a dosis incrementadas), R: resistente.

Por otra parte, los resultados obtenidos también se analizaron en función de la familia antibiótica a la que pertenece cada uno de los compuestos testados. Los **antibióticos beta-lactámicos** (Figura 25) son de uso muy habitual en veterinaria (Agencia Europea del Medicamento, 2022) y, de hecho, algunos de los miembros de esta familia se encuentran entre los antibióticos considerados de elección para el tratamiento de la NCD (Constable, 2009; Peek *et al.*, 2018), lo que podría explicar que un 76-100% de las cepas de ETEC incluidas en este estudio fuesen resistentes a los compuestos de esta familia. Resultados previos refuerzan esta hipótesis, pues se ha observado una mayor presencia de cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina en terneros diarreicos que en individuos sanos, lo que probablemente se debe a una administración más frecuente de este antibiótico en aquellas granjas con problemas de NCD (Blanco *et al.*, 1993a; Gunn *et al.*, 2003). De igual modo, el uso rutinario de cefalosporinas de primera y segunda generación en el tratamiento de la NCD también podría ser la causa de que todas las cepas de ETEC incluidas en el estudio fuesen resistentes a estos antibióticos. En ningún otro trabajo se ha encontrado un porcentaje tan elevado de cepas resistentes a estos compuestos, pero sí se han obtenido altas tasas de resistencia en investigaciones realizadas en Alemania (80,5%; Feuerstein *et al.*, 2022), Irán (65,9%; Shahrani *et al.*, 2014), Turquía (91,6%; Güler *et al.*, 2008) o China (52-67%; Jia *et al.*, 2022). Por el contrario, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación demostraron tener una eficacia muy elevada frente a ETEC procedentes de terneros con NCD, pues el porcentaje de susceptibilidad osciló entre el 93 y el 95%, lo que está en línea con los resultados obtenidos por Güler *et al.* (2008) (100%) y Feuerstein *et al.* (2022) (76,8%). Teniendo en cuenta que los compuestos de estos dos últimos grupos se emplean con relativa frecuencia en el tratamiento de la NCD (De Briyne *et al.*, 2014), lo más probable es que las diferencias en la susceptibilidad a las cefalosporinas de tercera-cuarta y de primera-segunda generación estén relacionadas con diversos mecanismos de resistencia que puedan haber desarrollado los aislados incluidos en este estudio. En este sentido, es probable que las cepas analizadas contasen con mecanismos de hiperproducción de beta-lactamasas, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, de beta-lactamasas resistentes a los inhibidores (IRT) y/o de oxacilinasas, como OXA-1, que son capaces de conferir resistencia a las cefalosporinas de primera-segunda generación pero no a las de tercera-cuarta, por lo que se relacionan con el patrón fenotípico observado en este estudio (Navarro *et al.*, 2010).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La diferencia en la frecuencia de uso también podría explicar la divergencia en la susceptibilidad a los compuestos testados de la familia de los **aminoglucósidos** (Figura 25). Así, la gentamicina fue uno de los antibióticos más eficaces, con un 93% de aislados sensibles, mientras que a la neomicina, de uso común en las granjas de ganado vacuno para el tratamiento de mamitis y, hasta hace unos años, para la prevención de la NCD (Sawant *et al.*, 2005; Brunton *et al.*, 2012), tan sólo fueron sensibles el 37% de las cepas. Estos resultados coinciden con estudios previos en los que se obtuvieron porcentajes de sensibilidad del 75-89,7% para la gentamicina y del 39,1%-51% para la neomicina (Orden *et al.*, 2000; Güler *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2010; Cengiz y Adigüzel, 2020; Feuerstein *et al.*, 2022). Sin embargo, otros trabajos han señalado porcentajes de cepas resistentes a la gentamicina (48-83,8%) muy superiores a los descritos en este trabajo (Donaldson *et al.*, 2006; Shahrani *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2022). De forma similar a lo indicado para las cefalosporinas, la presencia de cepas resistentes a la neomicina y sensibles a la gentamicina también puede estar relacionada con el mecanismo de resistencia del que dispongan los ETEC. La resistencia a los aminoglucósidos se asocia a varios mecanismos, siendo el más común la inactivación enzimática, en la que pueden intervenir tres tipos de enzimas: aceltiltransferasas (AACs), nucleotidiltransferasas (ANTs) y fosfotransferasas (APHs) (Ramirez y Tolmasky, 2010) y su presencia puede determinarse de forma fenotípica mediante la exposición a diversos aminoglucósidos (Navarro *et al.*, 2010). Aunque en este estudio sólo se incluyeron dos compuestos de esta familia, es posible que los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos mayoritarios en estas cepas puedan ser APH(3') o AAC(6'), que son los que se relacionan con la resistencia a la neomicina y la sensibilidad a la gentamicina (Livermore *et al.*, 2001).

De la misma forma que se ha comentado para las dos familias anteriormente descritas, el mayor porcentaje de cepas resistentes a las **sulfonamidas** (88%) que a las **tetraciclinas** (71%) (Figura 25) también podría ser la consecuencia de su distinta frecuencia de empleo. En este sentido, un estudio realizado en varios países europeos indicó que las tetraciclinas se usaron como tratamiento de elección sólo en el 15% de los terneros con diarrea neonatal, mientras que las sulfonamidas se administraron en el 70% de los casos (Eibl *et al.*, 2021). Las elevadas tasas de resistencia frente a ambos compuestos están en la línea de lo señalado en trabajos previos aunque, en general, se señalan mayores prevalencias de cepas resistentes a las tetraciclinas (61,9–100%) que a las sulfonamidas (35,8–84,9%)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

(Hariharan *et al.*, 2004; Güler *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2010; Shahrani *et al.*, 2014; Cengiz y Adigüzel, 2020; Feuerstein *et al.*, 2022). En este estudio sólo se incluyó un representante de cada una de estas dos familias pues las bacterias muestran un comportamiento similar frente al resto de compuestos que las forman; por este motivo, el uso de un antibiótico representante de grupo es suficiente para conocer la susceptibilidad de los aislados a todos los demás (Livermore *et al.*, 2001). Sin embargo, a diferencia de en los casos anteriores, el estudio fenotípico no es suficiente para deducir los mecanismos particulares de resistencia presentes en estas cepas, por lo que, para conocerlos, sería necesaria su caracterización usando métodos moleculares. No obstante, en el caso de las tetraciclinas, el más común es la expulsión del compuesto de la célula, que puede producirse a través de hasta nueve tipos de bombas (Nguyen *et al.*, 2014; Poirel *et al.*, 2018), mientras que la resistencia a las sulfonamidas suele estar ligada a mutaciones en los genes que codifican para las enzimas diana o la sustitución de estas últimas por enzimas resistentes (Poirel *et al.*, 2018; Van Duijkeren *et al.*, 2018).

La última familia testada en este estudio fue la de las **fluoroquinolonas** (Figura 25), detectándose elevadas tasas de resistencia frente a sus compuestos (66–95%), que son notablemente superiores a la obtenida por Feuerstein *et al.* (2022) (37,9%) en Alemania. Con respecto a los estudios realizados en otras partes del mundo, nuestros valores también resultan más elevados que los observados por Cengiz y Adigüzel (2020) (42,4%) en Turquía o por Lim *et al.* (2010) (22,7%) en Corea del Sur, pero son similares a los descritos en otro trabajo realizado en Turquía (91,6%) (Güler *et al.*, 2008) y en Uruguay (80%) (Umpiérrez *et al.*, 2017). La resistencia a las fluoroquinolonas suele tener su origen en mutaciones cromosómicas, fundamentalmente de los genes que codifican para la ADN girasa y la ADN topoisomerasa IV, y/o en la adquisición de plásmidos específicos (resistencia las quinolonas mediada por plásmidos o PMQR) (Poirel *et al.*, 2018). Dado que estos mecanismos de resistencia son comunes a todas las fluoroquinolonas, la resistencia a un compuesto de primera generación de esta familia aumenta las posibilidades de que la cepa también lo sea a los de las siguientes generaciones (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2014). Este hecho explicaría la tendencia creciente de la CMI en el caso del enrofloxacino y del marbofloxacino, ambos compuestos de tercera generación, en contraste con la flumequina, de primera generación y en la que este valor se situó en todos los casos en la concentración más elevada. Por lo tanto, es muy probable que estos resultados estén relacionados con el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

hecho de que las fluoroquinolonas se encuentran entre los antibióticos más empleados para el tratamiento de la NCD (Eibl *et al.*, 2021). En este sentido se ha demostrado que el tratamiento de terneros neonatos con diarrea con enrofloxacino aumenta el número de *E. coli* resistentes presentes en las heces y que la presión de selección provocada por este compuesto puede resultar en la selección de resistencias frente a otros miembros de la misma familia como el ciprofloxacino y el ácido nalidíxico (Pereira *et al.*, 2014). Como consecuencia de todo esto, la elevada prevalencia de las resistencias a las fluoroquinolonas observada en este estudio resulta preocupante, sobre todo si tenemos en cuenta que la Agencia Europea del Medicamento (EMA) las ha clasificado como antibióticos de importancia crítica para la salud humana (Agencia Europea del Medicamento, 2020).

Aunque numerosas investigaciones defienden que la aparición de resistencias a antibióticos en las cepas de ETEC causantes de NCD se debe principalmente a la utilización extendida e indiscriminada de antibióticos para el tratamiento de este proceso (Brunton *et al.*, 2014; Duse *et al.*, 2015; Gonggrijp *et al.*, 2016; Tenhagen *et al.*, 2020), otros estudios sugieren que también podría tener relación con la administración al ternero de leche procedente de vacas que han recibido antibioterapia frente a la mamitis (Aust *et al.*, 2013; Maynou *et al.*, 2017). A pesar de ello, un trabajo reciente realizado en varios países europeos demuestra que los ganaderos y veterinarios clínicos continúan empleando estos compuestos de forma recurrente para el control de la NCD, independientemente de su etiología y de los signos clínicos observados (Eibl *et al.*, 2021). Además, los resultados de nuestro estudio indican que la mayoría de las cepas de ETEC son resistentes frente a las opciones de primera línea (Categoría D de la EMA) recomendadas para el tratamiento de la NCD, como las aminopenicilinas, las tetraciclinas o las sulfonamidas (Constable, 2009; Peek *et al.*, 2018). Así, tan sólo la gentamicina y las cefalosporinas de tercera y cuarta generación podrían considerarse opciones eficaces. Sin embargo, estos compuestos están clasificados en las categorías C (gentamicina) y B (cefalosporinas de tercera y cuarta generación) de la EMA, por lo que son antibióticos de uso restringido, y más especialmente los de la Categoría B, que se consideran de importancia crítica para la medicina humana (Agencia Europea del Medicamento, 2020). Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que el uso de la antibioterapia en el tratamiento de la NCD debe limitarse incluso cuando ésta se deba a infecciones por ETEC. En este sentido, solo deberían administrarse antibióticos cuando se observen signos clínicos indicativos de enfermedad sistémica. En estos casos resulta muy

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

útil la realización de un antibiograma que permita conocer la susceptibilidad de las cepas circulantes en la granja y, por tanto, seleccionar el antibiótico más adecuado a administrar. Asimismo, disponer de un historial de antibiogramas de la explotación permite monitorizar la evolución de las resistencias a lo largo del tiempo, lo que facilita la selección empírica del antibiótico a emplear ante infecciones bacterianas futuras.

El presente estudio de esta Tesis Doctoral reproduce los contenidos de la siguiente publicación:

Prieto, A., **López-Novo, C.**, Díaz, P., Díaz-Cao, J.M., López-Lorenzo, G., Antón, C., Remesar, S., García-Dios, D., López, C., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2022. Antimicrobial Susceptibility of Enterotoxigenic Escherichia coli from Diarrhoeic Neonatal Calves in Spain. Animals 12, 264. Editorial: MDPI (ISSN: 2076-2615). doi: https://doi.org/ 10.3390/ani12030264

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A partir de los resultados obtenidos en los diferentes estudios se extraen las siguientes **conclusiones**:

1º. La presencia de enteropatógenos juega un papel muy relevante en la aparición de la diarrea neonatal del ternero, pues en casi todas las muestras se detectó al menos un agente.

2º. *Cryptosporidium parvum* y el rotavirus bovino fueron los patógenos más frecuentes, mientras que *Escherichia coli* enterotoxigénica se halló en menor proporción. Cabe destacar la elevada prevalencia de otros agentes menos estudiados como los calicivirus bovinos emergentes, *Giardia duodenalis* y *E. coli* enteropatógena y enterohemorrágica, lo que plantea la necesidad de prestarles una mayor atención, pudiendo ser útil su inclusión en los paneles diagnósticos de rutina.

3º. Otros agentes, como el torovirus bovino y *E. coli* productora de toxinas Shiga fueron muy poco frecuentes. Destaca la baja presencia del coronavirus bovino, considerado uno de los principales enteropatógenos involucrados en la diarrea neonatal del ternero, y la ausencia de *Salmonella* spp., indicando que actualmente la importancia de ambos agentes en el proceso es escasa. Finalmente, la baja prevalencia de *Eimeria* spp. está probablemente relacionada con el rango de edad de los animales incluidos en el estudio.

4º. La edad del ternero y la consistencia de las heces influyeron en la prevalencia de algunos enteropatógenos. Así, la presencia de *E. coli* enterotoxigénica fue muy probable en terneros menores de siete días con una diarrea muy acuosa, mientras que se debe sospechar de *Cryptosporidium* spp. y norovirus bovino especialmente en animales de 8-21 días que eliminan heces líquidas. Además, la probabilidad de que los animales estén infectados con *G. duodenalis* y *Eimeria* spp. es más elevada si las heces son pastosas-acuosas, siendo más frecuente el primero en terneros de 3-4 semanas de vida y el segundo en los de cuatro semanas. Por último, se debería sospechar de *E. coli* enterohemorrágica en terneros de más de 15 días que eliminen heces pastosas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5º. La mayor parte de los brotes de diarrea neonatal son el resultado de infecciones mixtas, sobre todo a medida que aumenta la edad de los individuos infectados. Las asociaciones detectadas con mayor frecuencia fueron las constituidas por dos o tres enteropatógenos, pero se identificaron hasta siete agentes en una misma muestra. Teniendo en cuenta que la mayoría de los laboratorios sólo identifican cuatro enteropatógenos, nuestros resultados sugieren que el diagnóstico etiológico es, con frecuencia, incompleto, lo que se traduce en la aplicación de medidas de control no siempre eficaces.

6º. Los calicivirus fueron muy prevalentes en las infecciones mixtas, mostrando una asociación significativa con rotavirus y *C. parvum.* Este hallazgo sugiere que estos virus provocan fundamentalmente inmunosupresión que favorece la infección con otros enteropatógenos.

7º. La detección de infecciones mixtas integradas por *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enterohemorrágica fue significativamente improbable a lo largo de todo el primer mes de vida, lo que podría estar relacionado con un efecto inhibitorio derivado de la producción de bacteriocinas por estos patotipos.

8º. Se constató una elevada diversidad genética dentro de *C. parvum*, pues se identificaron 11 subtipos pertenecientes a la familia alélica IIa. Los más frecuentes fueron el IIaA15G2R1 y el IIaA16G3R1, mientras que el hallazgo de IIaA13G2R1, IIaA14G1R1, IIaA14G2R1, IIaA16G1R1, IIaA17G3R1, IIaA17G4R1 y IIaA17R1 supone la primera cita de estos subtipos en ganado vacuno en España. Todos los subtipos identificados presentaron potencial zoonósico, lo que sugiere que los terneros con diarrea neonatal constituyen un importante reservorio de *C. parvum* para el ser humano.

9º. Todos los aislados de *G. duodenalis* pertenecieron al genotipo E. Como este genotipo se ha identificado ocasionalmente en humanos, no se puede excluir que los terneros infectados supongan un riesgo para la salud pública. Además, la ausencia del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

genotipo A en terneros diarreicos podría indicar una mayor patogenicidad asociada al genotipo E.

10º. El análisis de la susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de *E. coli* enterotoxigénica aisladas de terneros diarreicos del noroeste de España mostró una situación muy preocupante, pues todos los aislados fueron multirresistentes y más de la mitad fueron resistentes a más de diez compuestos. Por todo ello es imprescindible limitar el uso de antibióticos a aquellos casos de diarrea neonatal donde el ternero muestre signos clínicos indicativos de enfermedad sistémica.

11º. La mayoría de las cepas de *E. coli* enterotoxigénica fueron resistentes frente a los antibióticos de primera línea. Tan sólo la gentamicina y las cefalosporinas de tercera y cuarta generación fueron efectivas para el tratamiento de las infecciones por este patotipo en terneros diarreicos. Sin embargo, estos últimos compuestos son de uso restringido por tratarse de antibióticos de importancia crítica para la medicina humana. Por lo tanto, cuando sea necesario recurrir a la antibioterapia en un brote de diarrea neonatal, resulta imprescindible realizar un antibiograma que permita conocer la susceptibilidad de las cepas circulantes en la granja y, en consecuencia, seleccionar el antibiótico más adecuado en cada caso.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7. RESUMEN-RESUMO-ABSTRACT

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

La diarrea neonatal del ternero (NCD) es un proceso muy frecuente en las explotaciones de ganado vacuno y cuya aparición representa importantes pérdidas económicas para el ganadero. Su origen puede deberse a deficiencias nutricionales o de manejo pero, en la mayoría de las ocasiones, es el resultado de la infección con enteropatógenos de naturaleza vírica, bacteriana y parasitaria. En la actualidad, los principales enteropatógenos asociados a la NCD son diferentes patotipos de *E. coli* (*E. coli* enterotoxigénica o ETEC, *E. coli* enteropatógena o EPEC, *E. coli* enterohemorrágica o EHEC y *E. coli* productora de toxinas Shiga o STEC), *Cryptosporidium parvum*, rotavirus A bovino (BRoV), coronavirus bovino (BCoV) y, en menor medida, *Salmonella* spp., *Giardia duodenalis* y *Eimeria* spp. Recientemente se ha sugerido que otros agentes considerados emergentes, como el torovirus bovino (BToV) o varios calicivirus como el norovirus bovino (BNoV) y el nebovirus bovino (BNeV) también podrían estar implicados en el proceso. Debido a que la sintomatología de los animales con NCD es similar independientemente del patógeno implicado, establecer una sospecha etiológica en condiciones de campo no es sencillo. Por ello, establecer una relación entre la presencia de cada enteropatógeno y dos parámetros como la edad del animal en el momento de la diarrea y las características de las heces, podría resultar muy orientativo para establecer una primera sospecha etiológica que permita implementar las primeras medidas de control ante la aparición de un brote. Por otra parte, la mayoría de los estudios realizados evalúan la presencia de cada patógeno por separado. Sin embargo, aquellos que analizan la presencia de varios agentes demuestran que la aparición de NCD es, habitualmente, el resultado de infecciones mixtas. Por ello, identificar los agentes implicados en las co-infecciones y sus interacciones resulta esencial para aplicar las medidas de control más apropiadas en cada caso, incluyendo los tratamientos específicos frente a determinados patógenos entéricos.

Por todo ello, en el **primer estudio** de esta Tesis Doctoral se planteó determinar la prevalencia de los principales enteropatógenos implicados en la NCD en terneros con diarrea menores de un mes del noroeste de España. También se analizó la posible influencia de la edad y la consistencia de las heces sobre el porcentaje de infección por los diferentes agentes. Finalmente, se identificaron las asociaciones más comunes entre los patógenos, así como su

USC DE COMPOSTELA

relación con la edad. Para ello, se recogieron 420 muestras fecales de terneros diarreicos menores de un mes procedentes de 222 ganaderías de Galicia y Asturias, que se clasificaron en función de la semana de edad del ternero y de su consistencia. Los enteropatógenos bacterianos (*E. coli* y *Salmonella* spp.) se aislaron por siembra en placa y, en aquellas muestras en las que se observaron colonias compatibles con *E. coli*, se identificó molecularmente el patotipo mediante la detección de ocho factores de virulencia (*eae*, F5, STa, STb, LT, F17, Stx1, Stx2). Por su parte, las colonias compatibles con *Salmonella* spp. se confirmaron empleando una prueba comercial de suero aglutinante. La detección de los agentes víricos se realizó mediante RT-qPCR. En cuanto a los enteropatógenos parasitarios, la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis* se efectuó mediante inmunofluorescencia directa precedida de una técnica de concentración difásica. La presencia de ooquistes de *Eimeria* spp. se evidenció mediante flotación. Además, las muestras positivas a *Cryptosporidium* spp. y *Eimeria* spp. se seleccionaron para su posterior identificación específica. Para ello, en el primer caso, se procedió al análisis genotípico mediante una PCR que amplifica el gen que codifica para la subunidad ribosomal 18s, seguida del análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP); mientras que en el segundo se efectuó el estudio morfométrico de los ooquistes esporulados.

Los resultados obtenidos mostraron que en el 97,1% de las muestras se detectó al menos uno de los agentes incluidos en el estudio, sugiriendo que la presencia de patógenos entéricos sigue jugando un papel muy relevante en la aparición de la NCD. BRoV y *Cryptosporidium* spp. fueron los enteropatógenos más frecuentes, con prevalencias superiores al 50%. El análisis genotípico de *Cryptosporidium* spp. permitió constatar que *C. parvum* (98,12%) predominó sobre *C. bovis* (0,94%) y *C. ryanae* (0,94%). Nuestros datos confirman la importancia de estos agentes en terneros diarreicos menores de un mes, incluso cuando se dispone de vacunas y tratamientos específicos con eficacia probada. A continuación, se detectó BNoV (45,7%), seguido por BNeV (22,4%), ETEC (22,1%), EPEC (21%), EHEC (20,2%) y *G. duodenalis* (17,6%). De todos estos agentes, ETEC es el único asociado claramente a la NCD, mientras que el papel del resto en el proceso no se conoce con exactitud. Sin embargo, su detección en una proporción tan elevada de las muestras plantea la necesidad de prestarles una mayor atención, pudiendo ser útil su inclusión en los paneles diagnósticos de rutina. Cuatro agentes se detectaron con prevalencias que oscilaron entre el 7 y el 10%: BToV, BCoV, *Eimeria* spp. y STEC. El examen morfométrico de los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

ooquistes de coccidios permitió identificar diez especies, siendo *E. ellipsoidalis, E. bovis* y *E. zuernii* las más prevalentes; en todas las muestras positivas se detectó la presencia de más de una especie de *Eimeria.* Finalmente, *Salmonella* spp. no se aisló en ninguna muestra, confirmando su escasa importancia como agente causal de NCD.

La edad de los animales influyó significativamente sobre la prevalencia de algunos agentes. Así, ETEC fue más prevalente en la primera semana de edad, mientras que *Cryptosporidium* spp. lo fue en la segunda semana. El porcentaje de animales positivos a BNeV, EHEC y *G. duodenalis* fue más elevado en los animales mayores de 15 días, y *Eimeria* spp. fue más frecuente en la cuarta semana. De forma similar, se observó una relación estadísticamente significativa entre la presencia de algunos agentes y la consistencia de la muestra fecal. Así, la detección de ETEC, BNoV y *Cryptosporidium* spp. fue significativamente más frecuente en las muestras de consistencia acuosa. Por el contrario, el porcentaje de muestras positivas a *G. duodenalis* fue significativamente superior en las muestras de consistencia pastosa-acuosa y EHEC se relacionó con la excreción de heces pastosas. Estos datos pueden ser muy útiles para el veterinario clínico que se enfrente a un brote de NCD en una explotación de ganado vacuno al facilitar el establecimiento de una primera sospecha etiológica. Obviamente, esta sospecha debe complementarse con otros datos clínicos y epidemiológicos que se obtengan tras el examen clínico reglado del animal y una adecuada anamnesis y, finalmente, confirmarla mediante análisis en el laboratorio.

Uno de los aspectos más novedosos de este estudio son los resultados de las co-infecciones. Así, tras el análisis de las infecciones mixtas se constató la presencia de varios enteropatógenos en el 82,1% de las muestras. La mayoría de las co-infecciones estuvieron constituidas por dos (27%) o tres (33,6%) patógenos, aunque se identificaron hasta siete agentes en una misma muestra (1,2%). Teniendo en cuenta que el diagnóstico de rutina de la NCD sólo incluye cuatro enteropatógenos (ETEC, BRoV, BCoV y *C. parvum*), nuestros resultados demuestran que, frecuentemente, los resultados laboratoriales no permiten alcanzar un diagnóstico etiológico completo, lo que dificulta la aplicación de las medidas de control más adecuadas en cada caso. Las co-infecciones integradas únicamente por uno o varios virus y *C. parvum* fueron las más abundantes (20,9%), destacando la elevada prevalencia de los calicivirus bovinos, que sugiere que, en la mayoría de las ocasiones, el papel de estos virus emergentes en la NCD consistiría en provocar una inmunosupresión que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

favoreciese la infección con otros enteropatógenos que actúan como agentes primarios. Así, BRoV, BNoV y *C. parvum* constituyeron la infección mixta predominante en este estudio, y junto con BNeV formaron la tercera combinación más frecuente, mientras que la segunda estaba integrada únicamente por BRoV y *C. parvum.*

Nuestros datos también demostraron que la frecuencia de las infecciones mixtas se incrementa con la edad (desde el 73,2-86,2% en las dos primeras semanas hasta alcanzar el 94,3% y 95,7% en la tercera y cuarta semanas de vida, respectivamente), así como el número de patógenos que las integran. Además, algunos de los patógenos implicados en las infecciones mixtas interaccionaron significativamente entre sí, tanto de forma positiva como negativa, y dichas asociaciones variaron con la edad. Así, en la primera semana de vida, la mayoría de las interacciones positivas se detectaron entre BRoV y otros agentes víricos (BToV, BNoV y BCoV), si bien también se encontró una asociación positiva entre *C. parvum* y *G. duodenalis*, así como de cada uno de estos protozoos con BNeV y EPEC. También se identificaron interacciones negativas entre ETEC y *C. parvum* y entre EPEC, EHEC y STEC. A partir de la segunda semana, las asociaciones fueron más esporádicas. Entre los 8 y los 14 días de vida se repitieron las relaciones positivas entre BRoV y BNoV y entre *G. duodenalis* y BNeV; este último virus se asoció además con BToV y STEC. La interacción entre EPEC y EHEC resultó negativa y se mantuvo durante el resto del estudio. En la tercera semana, en contraste con lo observado en los primeros siete días, fue improbable detectar *C. parvum* en combinación con *G. duodenalis* y *Eimeria* spp., que además se asociaron positivamente entre sí. La interacción negativa entre *C. parvum* y *G. duodenalis* se mantuvo durante la cuarta semana, período en el que fue más probable la detección conjunta de BCoV y BNoV.

Debido a que algunos de los agentes implicados en la NCD presentan potencial zoonósico, su presencia podría representar un peligro para la salud pública. De todos ellos destacan *C. parvum* y *G. duodenalis*, dada su elevada prevalencia tanto en terneros neonatos como en personas. Por ello, en el **segundo estudio** de esta Tesis Doctoral se identificaron los subtipos de *C. parvum* y genotipos de *G. duodenalis* presentes en terneros diarreicos menores de un mes del noroeste de España con el objeto de determinar su potencial zoonósico. Primeramente, se seleccionaron las muestras que resultaron positivas a *C. parvum* y *G. duodenalis* en el primer estudio. El análisis subtípico de *C. parvum* consistió

en amplificar un fragmento del gen *gp60* y en el posterior análisis de las secuencias obtenidas. Para la caracterización molecular de *G. duodenalis* se analizaron fragmentos de los genes *bg*, *gdh* y *tpi*. Se identificaron 11 subtipos de *C. parvum*, todos ellos pertenecientes a la familia alélica IIa, predominando el subtipo IIaA15G2R1 (77,1%) y el IIaA16G3R1 (11,9%). El resto fueron hallazgos esporádicos, aunque resulta reseñable que este trabajo constituye la primera cita de los subtipos IIaA13G2R1, IIaA14G1R1, IIaA14G2R1, IIaA16G1R1, IIaA17G3R1, IIaA17G4R1 y IIaA17R1 en ganado vacuno en España. Todos los subtipos detectados presentan potencial zoonósico; además, el subtipo predominante (IIaA15G2R1) es el más común en casos de infecciones por *C. parvum* en personas en España. Todos estos datos sugieren que los terneros que padecen NCD constituyen un importante reservorio de *C. parvum* para el ser humano, pudiendo ser responsables de un porcentaje significativo de los brotes detectados en personas. En cuanto a su distribución por granjas, todos los aislados procedentes del mismo rebaño pertenecieron al mismo subtipo, salvo en dos casos, lo que demuestra la elevada morbilidad de este protozoo dentro de la explotación.

En lo que respecta a la caracterización molecular de *G. duodenalis*, tan sólo amplificaron el 9,5% de las muestras seleccionadas. El mayor número de muestras positivas se obtuvo para el *gdh* (5), mientras que el análisis de los genes *bg* y *tpi* permitieron obtener cuatro y tres positivos, respectivamente. Tras el análisis de las secuencias obtenidas se determinó que todos los aislados pertenecían al genotipo E, el más común en ganado vacuno y ocasional en personas; por todo ello, no se puede excluir que los terneros infectados supongan un riesgo para la salud pública. No obstante, el reducido porcentaje de aislados genotipados, probablemente debido al elevado polimorfismo de las secuencias, no permite excluir por completo la presencia de otros genotipos zoonósicos como el A, que se ha detectado previamente en terneros asintomáticos en la misma zona geográfica. Sin embargo, teniendo en cuenta que todos los individuos analizados eliminaban heces diarreicas, la única presencia del genotipo E podría indicar que éste presenta una mayor patogenicidad para el ternero.

El impacto de la NCD en la salud pública también puede relacionarse con una de las medidas más frecuentemente empleadas para su tratamiento, la antibioterapia, pues su uso indiscriminado favorece la selección de bacterias resistentes. Este hecho supone un grave

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

problema al reducir de forma muy considerable las opciones terapéuticas para controlar de forma eficaz las infecciones bacterianas en humanos y animales. De entre los agentes bacterianos implicados en la NCD destaca ETEC, por lo que se debe prestar especial atención a las resistencias asociadas a este patógeno para optimizar la selección de los antibióticos a emplear. En base a todo esto, en el **tercer estudio** de esta Tesis Doctoral se planteó determinar la susceptibilidad de las cepas de ETEC aisladas de las heces de terneros diarreicos del noroeste de España a cinco familias antibióticas (beta-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y trimetoprim-sulfonamidas), conocer la frecuencia de las resistencias frente a estas familias e identificar la presencia de cepas multirresistentes (MDR). Para ello se seleccionaron aquellas muestras fecales del primer estudio en las que se confirmó la presencia de la fimbria F5 y la enterotoxina STa y que, además, presentaban valores de ciclo umbral (Ct) inferiores a 25 para ambos genes. Para cada muestra, se seleccionó una colonia confirmada como ETEC por qPCR, que se sometió a las pruebas de susceptibilidad a 14 antibióticos representativos de las cinco familias más empleadas en veterinaria (beta-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y trimetoprim-sulfonamidas). Así, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico para cada una de las cepas testadas, lo que permitió clasificar los aislados de ETEC como susceptibles, intermedios o resistentes a cada compuesto. Además, también en base a la CMI, se obtuvo la concentración mínima necesaria de cada antibiótico para inhibir el crecimiento del 90% de las cepas (CMI90).

Los resultados obtenidos muestran una situación muy preocupante e indican que, en granjas del noroeste de España, las resistencias a antibióticos son muy frecuentes en cepas de ETEC aisladas de terneros menores de un mes con diarrea. Todas las cepas fueron resistentes a al menos cuatro de los catorce antibióticos testados, y más de la mitad (51%) lo fueron a diez o más compuestos. Además, todas las cepas fueron resistentes a al menos un antibiótico de tres de las cinco familias testadas, pudiendo categorizarse como cepas MDR. La CMI90 fue equivalente a la mayor de las concentraciones utilizadas para ocho de los antibióticos testados, lo que indica que la mayoría de los aislados fueron resistentes a la máxima concentración de esos compuestos, mostrando por tanto una gran resistencia a los mismos. Al analizar los resultados por familias antibióticas se observaron notables diferencias en la susceptibilidad a los compuestos de una misma familia, que en la mayoría de los casos parecen tener su origen en su frecuencia de uso. De esta manera, la mayoría de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

las cepas de ETEC analizadas fueron resistentes a los antibióticos de primera línea más empleados para el tratamiento de la NCD, destacando el 100% de aislados resistentes a la ampicilina, la cefalexina y la cefalotina. Tan sólo la gentamicina y las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftiofur, cefoperazona y cefquinoma) fueron capaces de inhibir el crecimiento de más del 90% de las cepas siendo, por lo tanto, opciones eficaces para el tratamiento de la NCD. Sin embargo, son compuestos de uso restringido por considerarse de importancia crítica para la medicina humana. Todos estos resultados permiten concluir que el uso de la antibioterapia en el tratamiento de la NCD debe limitarse incluso cuando ésta se deba a infecciones por ETEC. En este sentido, solo deberían administrarse antibióticos cuando se observen signos clínicos indicativos de enfermedad sistémica. Además, la realización de un antibiograma para conocer la susceptibilidad de las cepas circulantes en la granja permitirá optimizar la selección del compuesto a administrar. Asimismo, disponer de un historial de antibiogramas de la explotación permite monitorizar la evolución de las resistencias a lo largo del tiempo y facilita la selección empírica del antibiótico a emplear ante infecciones bacterianas futuras.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMO

A diarrea neonatal do xato (NCD) é un proceso moi frecuente nas explotacións de gando vacún e cuxa aparición representa importantes perdas económicas para o gandeiro. A súa orixe pode deberse a deficiencias nutricionais ou de manexo pero, na maioría das ocasións, é o resultado da infección enteropatóxenos de natureza vírica, bacteriana e parasitaria. Na actualidade, os principais enteropatóxenos asociados á NCD son diferentes patotipos de *E. coli* (*E.coli* enterotoxixénica ou ETEC, *E. coli* enteropatóxena ou EPEC, *E. coli* enterohemorráxica ou EHEC e *E. coli* produtora de toxinas Shiga ou STEC), *Cryptosporidium parvum*, rotavirus A bovino (BRoV), coronavirus bovino (BCoV), e, en menor medida, *Salmonella* spp., *Giardia duodenalis* e *Eimeria* spp. Recentemente suxeriuse que outros axentes considerados emerxentes, como o torovirus bovino (BToV) ou varios calicivirus como o norovirus bovino (BNoV) e o nebovirus bovino (BNeV) tamén poderían estar implicados no proceso. Debido a que a sintomatoloxía dos animais con NCD é similar independentemente do patóxeno implicado, establecer unha sospeita etiolóxica en condicións de campo non é sinxelo. Por iso, establecer unha relación entre a presenza de cada enteropatóxeno e dous parámetros como a idade do animal no momento da diarrea e as características das feces, podería resultar moi orientativo para establecer unha primeira sospeita etiolóxica que permita implementar as primeiras medidas de control ante a aparición dun brote. Por outra parte, a maioría dos estudos realizados que avalían a presenza de varios axentes amosan que a aparición de NCD é, habitualmente, o resultado de infeccións mixtas. Por iso, identificar os axentes implicados nas co-infeccións e as súas interaccións resulta esencial para aplicar as medidas de control máis axeitadas en cada caso, incluíndo os tratamentos específicos fronte a determinados patóxenos entéricos.

Por todo iso, no **primeiro estudo** desta Tese de Doutoramento propúxose determinar a prevalencia dos principais enteropatóxenos implicados na NCD en xatos con diarrea menores dun mes do noroeste de España. Tamén se analizou a posible influencia da idade e a consistencia das feces sobre a porcentaxe de infección polos diferentes axentes. Finalmente, identificáronse as asociacións más comúns entre os patóxenos, así como a súa relación coa ideade. Para iso, recolléronse 420 mostras fecais de xatos diarreicos menores dun mes procedentes de 222 gandarías de Galicia e Asturias, que se clasificaron en función

da semana de idade do xato e da súa consistencia. Os enteropatóxenos bacterianos (*E. coli* y *Salmonella* spp.) illáronse por inoculación en placa e, naquelas mostras nas que se observaron colonias compatibles con *E. coli*, identificouse molecularmente o patotipo mediante a detección de oito factores de virulencia (eae, F5, Sta, STb, LT, F17, Stx1, Stx2). Pola súa parte, as colonias compatibles con *Salmonella* spp. confirmáronse empregando unha proba comercial de soro aglutinante. A detección dos axentes víricos (BRoV, BCoV, BToV, BNoV y BNeV) realizouse mediante RT-qPCR. En canto aos enteropatóxenos parasitarios, a detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. e quistes de *G. duodenalis* efectuouse mediante inmunofluorescencia directa precedida dunha técnica de concentración difásica. A presenza de ooquistes de *Eimeria* spp. evidenciouse mediante flotación. Ademais, as mostras positivas a *Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp. seleccionáronse para a súa posterior identificación específica. Para iso, no primeiro caso, procedeuse á análise xenotípica mediante unha PCR que amplifica o xene que codifica para a subunidade ribosomal 18s, seguida da análise de polimorfismo de lonxitude dos fragmentos de restrición (RFLP); mentres que no segundo efectuouse o estudo morfométrico dos ooquistes esporulados.

Os resultados obtidos amosaron que no 97,1% das mostras detectouse polo menos un dos axentes incluídos no estudo, suxerindo que a presenza de patóxenos entéricos segue xogando un papel moi relevante na aparición da NCD. BRoV e *Cryptosporidium* spp. foron os enteropatóxenos máis frecuentes, con prevalencias superiores ao 50%. A análise xenotípica de *Cryptosporidium* spp. permitiu constatar que *C. parvum* (98,12%) predominou sobre *C. bovis* (0,94%) e *C. ryanae* (0,94%). Os nosos datos confirman a importancia destes axentes en xatos diarreicos menores dun mes, incluso cando se dispón de vacinas e tratamentos específicos con eficacia probada. A continuación, detectouse BNoV (45,7%), seguido por BNeV (22,4%), ETEC (22,1%), EPEC (21%), EHEC (20,2%) e *G. duodenalis* (17,6%). De todos estes axentes, ETEC é o único asociado claramente coa NCD, mentres que o papel do resto no proceso non se coñece con exactitude. Non obstante, a súa detección nunha proporción tan elevada das mostras propón a necesidade de prestarlles unha maior atención, podendo ser útil a súa inclusión nos paneis diagnósticos de rutina. Catro axentes detectáronse con prevalencias que oscilaron entre o 7 e o 10%: BToV, BCoV, *Eimeria* spp. e STEC. O exame morfométrico dos ooquistes de coccidios permitiu identificar dez especies, sendo *E. ellipsoidalis*, *E. bovis* e *E. zuernii* as máis prevalentes; en todas as mostras positivas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

detectouse a presenza de máis dunha especie de *Eimeria*. *Salmonella* spp. non se illou en ningunha mostra, confirmando a súa escasa importancia como axente causal de NCD.

A idade dos animais influíu significativamente sobre a prevalencia dalgúns axentes. Así, ETEC foi máis prevalente na primeira semana de idade, mentres que *Cryptosporidium* spp. foino na segunda semana. A porcentaxe de animais positivos a BNeV, EHEC e *G. duodenalis* foi máis elevada nos animais maiores de 15 días, e *Eimeria* spp. foi máis frecuente na cuarta semana. De xeito similar, observouse unha relación estatisticamente significativa entre a presenza dalgúns axentes e a consistencia da mostra fecal. Así, a detección de ETEC, BNoV e *Cryptosporidium* spp. foi significativamente máis frecuente nas mostras de consistencia acuosa. Pola contra, a porcentaxe de mostras positivas a *G. duodenalis* foi significativamente superior nas mostras de consistencia pastosa-acuosa e EHEC relacionouse coa excreción de feces pastosas. Estes datos poden ser moi útiles para o veterinario clínico que se enfronte a un brote de NCD nunha explotación de gando vacún ao facilitar o establecemento dunha primeira sospeita etiolóxica. Obviamente, esta sospeita debe complementarse con outros datos clínicos e epidemiolóxicos que se obteñan tras o exame clínico sistemático do animal e unha adecuada anamnese e, finalmente, confirmala mediante análise no laboratorio.

Un dos aspectos máis novidosos deste estudo son os resultados das co-infeccións. Así, tras o análise das infeccións mixtas constatouse a presenza de varios enteropatóxenos no 82,1% das mostras. A maioría das co-infeccións estiveron constituídas por dous (27%) ou tres (33,6%) patóxenos, aínda que se identificaron ata sete axentes nunha mesma mostra (1,2%). Tendo en conta que o diagnóstico de rutina da NCD só inclúe catro enteropatóxenos (ETEC, BRoV, BCoV e *C. parvum*), os nosos resultados demostran que, frecuentemente, os resultados de laboratorio non permiten acadar un diagnóstico etiolóxico completo, o que dificulta a aplicación das medidas de control máis adecuadas en cada caso. As co-infeccións integradas unicamente por un ou varios virus e *C. parvum* foron as máis abundantes (20,9%), destacando a elevada prevalencia dos calicivirus bovinos, que suxire que, na maioría das ocasións, o papel destes virus emerxentes na NCD consistiría en provocar unha inmunosupresión que favorecese a infección con outros enteropatóxenos que actúan como axentes primarios. Así, BRoV, BNoV e *C. parvum* constituíron a infección mixta

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

predominante neste estudo, e xunto con BNeV formaron a terceira combinación máis frecuente, mentres que a segunda estaba integrada únicamente por BRoV e *C. parvum.*

Os nosos datos tamén demostraron que a frecuencia das infección mixtas increméntase coa idade (desde o 73,2-86,2% nas dúas primeiras semanas ata acadar o 94,3% e 95,7% na terceira e cuarta semanas de vida, respectivamente), así como o número de patóxenos que as integran. Ademais, algúns dos patóxenos implicados nas infeccións mixtas interaccionaron significativamente entre si, tanto de forma positiva como negativa, e ditas asociacións variaron coa idade. Así, na primeira semana de vida, a maioría das interaccións positivas detectáronse entre BRoV e outros axentes víricos (BToV, BNoV y BCoV), se ben tamén se atopou unha asociación positiva entre *C. parvum* e *G. duodenalis*, así como de cada un destes protozoos con BNeV e EPEC. Tamén se identificaron interaccións negativas entre ETEC e *C. parvum* e entre EPEC, EHEC e STEC. A partir da segunda semana, as asociacións foron máis esporádicas. Entre os 8 e os 14 días de vida repetíronse as relacións positivas entre BRoV e BNoV e entre *G. duodenalis* e BNeV; este último virus asociouse ademais con BToV e STEC. A interacción entre EPEC e EHEC resultou negativa e mantívose durante o resto do estudo. Na terceira semana, en contraste co observado nos primeiros sete días, foi improbable detectar *C. parvum* en combinación con *G. duodenalis* e *Eimeria* spp., que ademais asociáronse positivamente entre si. A interacción negativa entre *C. parvum* e *G. duodenalis* mantívose durante a cuarta semana, período no que foi máis probable a detección conxunta de BCoV e BNoV.

Debido a que algúns dos axentes implicados na NCD presentan potencial zoonósico, a súa presenza podería representar un perigo para a saúde pública. De todos eles, destacan *C. parvum* e *G. duodenalis*, dada a súa elevada prevalencia tanto en xatos neonatos como en persoas. Por iso, no **segundo estudo** desta Tese de Doutoramento identificáronse os subtipos de *C. parvum* e xenotipos de *G. duodenalis* presentes en xatos diarreicos menores dun mes do noroeste de España co obxectivo de determinar o seu potencial zoonósico. Primeiramente, seleccionáronse as mostras que resultaron positivas a *C. parvum* e *G. duodenalis* no primeiro estudo. A análise subtípica de *C. parvum* consistiu en amplificar un fragmento do xene *gp60* e na posterior análise das secuencias obtidas. Para a caracterización molecular de *G. duodenalis* analizáronse fragmentos dos xenes *bg*, *gdh* e *tpi*. Identificáronse 11 subtipos de *C. parvum*, todos eles pertencentes á familia alélica IIa, predominando o subtipo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

IIaA15G2R1 (77,1%) e o IIaA16G3R1 (11,9%). O resto foron achados esporádicos, aínda que resulta salientable que este traballo constitúe a primeira cita dos subtipos IIaA13G2R1, IIaA14G1R1, IIaA14G2R1, IIaA16G1R1, IIaA17G3R1, IIaA17G4R1 e IIaA17R1 en gando vacún en España. Todos os subtipos detectados presentan potencial zoonósico; ademais, o subtipo predominante (IIaA15G2R1) é o máis común en casos de infección por *C. parvum* en persoas en España. Todos estes datos suxiren que os xatos que padecen NCD constitúen un importante reservorio de *C. parvum* para o ser humano, podendo ser responsables dunha porcentaxe significativa dos brotes detectados en persoas. En canto á súa distribución por granxas, todos os illados procedentes do mesmo rabaño pertenceron ao mesmo subtipo, salvo en dous casos, o que demostra a elevada morbilidade deste protozoo dentro da explotación.

No que respecta á caracterización molecular de *G. duodenalis*, tan só amplificaron o 9,5% das mostras seleccionadas. O maior número de mostras positivas obtívose para o *gdh* (5), mentres que a análise dos xenes *bg* e *tpi* permitiron obter catro e tres positivos, respectivamente. Tras a análise das secuencias obtidas determinouse que todos os illados pertencían ao xenotipo E, que é o máis común en gando vacún e ocasional en persoas; por todo iso, non se pode excluir que os xatos infectados supoñan un risco para a saúde pública. Porén, a reducida porcentaxe de illados xenotipados, probablemente debido ao elevado polimorfismo das secuencias, non permite excluír por completo a presenza doutros xenotipos zoonósicos como o A, que se detectou previamente en xatos asintomáticos na mesma zona xeográfica. Non obstante, tendo en conta que todos os individuos analizados eliminaban feces diarreicas, a única presenza do xenotipo E podería indicar que este presenta unha maior patoxenicidade para o xato.

O impacto da NCD na saúde pública tamén pode relacionarse cunha das medidas máis frecuentemente empregadas para o seu tratamento, a antibioterapia, pois o seu uso indiscriminado favorece a selección de bacterias resistentes. Este feito supón un grave problema ao reducir de forma moi considerable as opcións terapéuticas para controlar de forma eficaz as infeccións bacterianas en humanos e animais. De entre os axentes bacterianos implicados na NCD destaca ETEC, polo que se debe prestar especial atención ás resistencias asociadas a este patóxeno para optimizar a selección dos antibióticos a empregar. En base a todo isto, no **terceiro estudo** desta Tese de Doutoramento propúxose determinar a susceptibilidade das cepas de ETEC illadas das feces de xatos diarreicos do

noroeste de España a cinco familias antibióticas (beta-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas e trimetoprim-sulfonamidas), coñecer a frecuencia das resistencias fronte a estas familias e identificar a presenza de cepas multirresistentes (MDR). Para iso, seleccionáronse aquelas mostras fecais do primeiro estudo nas que se confirmou a presenza da fimbria F5 e da enterotoxina Sta e que, ademais, presentaban valores de limiares de ciclo (Ct) inferiores a 25 para ambos xenes. Para cada mostra, seleccionouse unha colonia confirmada como ETEC por qPCR, que se someteu ás probas de susceptibilidade a 14 antibióticos representativos das cinco familias máis empregadas en veterinaria (beta-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas e trimetoprim-sulfonamidas). Así, determinouse a concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico para cada unha das cepas testadas, o que permitiu clasificar os illados de ETEC como susceptibles, intermedios ou resistentes a cada composto. Ademais, tamén en base á CMI, obtívose a concentración mínima necesaria de cada antibiótico para inhibir o crecemento do 90% das cepas (CMI90).

Os resultados obtidos amosan unha situación moi preocupante e indican que, en granxas do noroeste de España, as resistencias a antibióticos son moi frecuentes en cepas de ETEC illadas de xatos menores dun mes con diarrea. Todas as cepas foron resistentes a polo menos catro dos catorce antibióticos testados, e máis da metade (51%) fórono a dez ou máis compostos. Ademais, todas as cepas foron resistentes a polo menos un antibiótico de tres das cinco familias testadas, podendo clasificarse como cepas MDR. A CMI90 foi equivalente á maior das concentracións utilizadas para oito dos antibióticos testados, o que indica que a maioría dos illados foron resistentes á máxima concentración deses compostos, amosando por tanto unha gran resistencia aos mesmos. Ao analizar os resultados por familias antibióticas observáronse notables diferenzas na susceptibilidade aos compostos dunha mesma familia, que na maioría dos casos parecen ter a súa orixe na súa frecuencia de uso. Deste xeito, a maioría das cepas de ETEC analizadas foron resistentes aos antibióticos de primeira liña máis empregados para o tratamento da NCD, destacando o 100% de illados resistentes á ampicilina, á cefalexina e á cefalotina. Tan só a xentamicina e as cefalosporinas de terceira e cuarta xeración (ceftiofur, cefoperazona e cefquinoma) foron capaces de inhibir o crecemento de máis do 90% das cepas sendo, polo tanto, opcións eficaces para o tratamento da NCD. Non obstante, son compostos de uso restrinxido por considerarse de importancia crítica para a medicina humana. Todos estes resultados permiten concluír que o uso da

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

antibioterapia no tratamento da NCD debe limitarse incluso cando ésta se deba a infeccións por ETEC. Neste sentido, só deberían administrarse antibióticos cando se observen signos clínicos indicativos de enfermidade sistémica. Ademais, a realización dun antibiograma para coñecer a susceptibilidade das cepas circulantes na granxa permitirá optimizar a selección do composto a administrar. Así mesmo, dispoñer dun historial de antibiogramas da explotación permite monitorizar a evolución das resistencias ao longo do tempo e facilita a selección empírica do antibiótico a empregar ante infeccións bacterianas futuras.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABSTRACT

Neonatal calf diarrhoea (NCD) is a very frequent process in cattle farms whose onset entails important economic losses for the farmer. Its origin can derive from nutritional or management deficiencies but, in most cases, it is the result of the infection with viral, bacterial or parasitic enteropathogens. Nowadays, the main agents related to NCD are several *E. coli* pathotypes (Enterotoxigenic *E. coli* or ETEC, enteropathogenic *E. coli* or EPEC, enterohaemorrhagic *E. coli* or EHEC and Shiga toxin-producing *E. coli* or STEC), *Cryptosporidium parvum*, bovine group A rotavirus (BRoV), bovine coronavirus (BCoV) and, to a lesser extent, *Salmonella* spp., *Giardia duodenalis* and *Eimeria* spp. Recently, it has been suggested that other agents considered as emerging, like bovine torovirus (BToV) or several caliciviruses like bovine norovirus (BNoV) or bovine nebovirus (BNeV), could also be involved in the process. Provided that the clinical signs of the animals with NCD are similar regardless of the enteropathogens involved, constituting an aetiological suspicion in field conditions is not easy. Therefore, establishing a relationship between the presence of each enteropathogen and two parameters like the age of the animal at the time of the onset of diarrhea and the characteristics of the faeces could be helpful to constitute a preliminary aetiological suspicion which would enable the implementation of preliminary control measures after the emergence of an outbreak. On another note, most studies assess the presence of each pathogen separately. However, those which analyse the presence of several agents prove that the onset of NCD is usually the result of mixed infections. Thus, identifying the enteropathogens involved in co-infections and their interactions is essential to implement the most appropriate control measures in each case, which include specific treatments against certain enteric pathogens.

For these reasons, in the **first study** of this Doctoral Thesis we aimed to determine the prevalence of the main enteropathogens involved in NCD in diarrhoeic neonatal calves under a month of age from the northwest of Spain. Moreover, we assessed the possible influence of age and faecal consistency on the infection rate of each agent. Lastly, we identified the most common associations among the pathogens and their relationship with the age of the animal. In order to do this, 420 faecal samples from diarrheic calves under a month of age from 222 farms from Galicia and Asturias were collected and classified

USC DE COMPOSTELA

according to the week of age of the calf and the faecal consistency. Bacterial enteropathogens (*E. coli* and *Salmonella* spp.) were isolated by plating. In those samples in which colonies morphologically compatible with *E. coli* were observed, the pathotype to which they belonged was molecularly identified by the detection of eight virulence factors (*eae*, F5, STa, STb, LT, F17, Stx1, Stx2). The colonies that were morphologically compatible with Salmonella were confirmed using a commercial serum agglutination test. The detection of the viral agents (BRoV, BCoV, BToV, BNoV and BNeV) was performed using RT-qPCR. Regarding the parasitic enteropathogens, the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts was carried out by direct immunofluorescence preceded by a two-phase concentration method. The presence of *Eimeria* oocysts was revealed by floatation. Moreover, the samples that were deemed positive to *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. were selected to perform the subsequent species identification. In order to do so, in the first case, genotypic analysis was performed using a PCR technique which amplifies the gene that encodes a fragment of the 18s rRNA gene, followed by restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP); while in the second case the morphometric study of the sporulated oocysts was carried out.

The obtained results showed that at least one of the agents included in the study was detected in 97.1% of the samples, which suggests that the presence of enteric pathogens still plays a very important role in the onset of NCD. BRoV and *Cryptosporidium* spp. were the most frequent enteropathogens, with prevalence rates over 50%. The genotypic analysis of *Cryptosporidium* spp. allowed us to confirm that *C. parvum* (98.12%) predominated over *C. bovis* (0.94%) and *C. ryanae* (0.94%). Our data corroborates the importance of these agents in diarrhoeic calves under a month of age, despite the availability of vaccines and treatments with demonstrated effectiveness. Subsequently, BNoV (45.7%), followed by BNeV (22.4%), ETEC (22.1%), EPEC (21%), EHEC (20.2%) and *G. duodenalis* (17.6%) were detected. Out of all these agents, ETEC is the only one that has been clearly linked to NCD, whereas the role of the rest of them in the process is unclear. Nevertheless, their presence in such a high percentage of samples suggests that closer attention should be paid to them and that their inclusion in routine diagnostic panels may be useful. Four agents were detected with prevalence rates between 7 and 10%: BToV, BCoV, *Eimeria* spp. and STEC. The morphometric examination of coccidia oocysts enabled the identification of ten species, of which the most prevalent were *E. ellipsoidalis*, *E. bovis* and *E. zuernii*; all the positive

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

samples contained more than one *Eimeria* species. Finally, *Salmonella* was not isolated in any samples, which confirms its scarce importance as a causative agent of NCD.

The age of the animals had a significant influence on the prevalence rate of some agents. Thus, ETEC was more prevalent in the first week of age, whereas *Cryptosporidium* spp. reached its peak in the second week of life. The percentage of animals which were positive to BNeV, EHEC y *G. duodenalis* was higher in animals older than 15 days of age, and *Eimeria* spp. was more frequent in the fourth week. Likewise, a statistically significant association was observed between the presence of some agents and the consistency of the faecal sample. Thus, the detection of ETEC, BNoV and *Cryptosporidium* spp. was significantly more frequent in watery samples. In contrast, the percentage of samples which tested positive to *G. duodenalis* was significantly higher in loose samples and EHEC was related to the excretion of pasty faeces. These data could be very useful to the veterinarian who faces a NCD outbreak in a cattle farm, as they make the establishment of a preliminary aetiological suspicion easier. Obviously, this suspicion must be complemented with other clinical and epidemiological data obtained after the clinical examination of the animal and an appropriate anamnesis and, lastly, it must be confirmed by means of laboratory analyses.

The results of co-infections are among the most innovative aspects of this study. Thus, after the analysis of mixed infections, the presence of several enteropathogens was found in 82,1% of the samples. Most co-infections comprised two (27%) or three (33.6%) enteropathogens, although up to seven agents were identified in a single sample (1.2%). Considering that the routine diagnosis of NCD only includes four enteropathogens (ETEC, BRoV, BCoV and *C. parvum*), our results prove that, quite often, laboratory results do not achieve a complete aetiological diagnosis, which hinders the implementation of the most appropriate control measures in each case. The most frequent co-infections were the ones which comprised one or several viruses and *C. parvum* (20.9%). The high prevalence rate of bovine caliciviruses in them was noteworthy and it suggests that, in most cases, the role of these emergent viruses in NCD would be to cause an immunosuppression that would favour the infection with other enteropathogens which act as primary agents. Thus, BRoV, BNoV and *C. parvum* composed the predominant mixed infection in this study, and together with BNeV formed the third most frequent combination, whereas the second one only included BRoV and *C. parvum.*

USC DE COMPOSTELA

Our data also proved that the frequency of mixed infections increases with age (from 73.2-86.2% in the first two weeks to 94.3% and 95.7% in the third and fourth weeks, respectively), as well as the number of pathogens which they comprise. Furthermore, some of the agents involved in mixed infections significantly interacted with each other, positively and negatively, and those associations varied according to the age of the animals. Thus, in the first week of life, most of the positive interactions included BRoV and other viral agents (BToV, BNoV and BCoVC), although a positive association between *C. parvum* and *G. duodenalis* was also detected, and between each of these protozoans and BNeV and EPEC. Moreover, negative interactions between ETEC and *C. parvum*, and EPEC, EHEC and STEC were identified. From the second week of life onwards, the associations were more sporadic. Between 8 and 14 days of life, the positive relationships between BRoV and BNoV and between *G. duodenalis* and BNeV occurred again. The latter viral agent was also related to BToV and STEC. The interaction between EPEC and EHEC was negative and remained throughout the rest of the study. In the third week, in contrast to what was observed in the first seven days of life, the detection of *C. parvum* together with *G. duodenalis* and *Eimeria* spp. was unlikely, whereas these two protozoans were positively associated with each other. The negative interaction between *C. parvum* and *G. duodenalis* remained in the fourth week, during which the joint detection of BCoV and BNoV was more likely.

Provided that some of the agents involved in NCD have zoonotic potential, their presence could constitute a danger to public health. Out of all of them, *C. parvum* and *G. duodenalis* stand out, given their high prevalence rates both in neonatal calves and human beings. Thus, the **second study** of this Doctoral Thesis revolved around the identification of the *C. parvum* subtypes and *G. duodenalis* genotypes present in diarrhoeic neonatal calves under a month of age from the northwest of Spain to determine their zoonotic potential. Firstly, the samples that were positive to *C. parvum* and *G. duodenalis* in the first study were selected. Subtype analysis of *C. parvum* consisted in the amplification of a fragment of the *gp60* gene and the subsequent analysis of the obtained sequences. In order to molecularly characterise *G. duodenalis*, fragments of the genes *bg*, *gdh* and *tpi* were analysed. Eleven *C. parvum* subtypes were identified, all of which belonged to the allelic family IIA; the predominant subtypes were IIaA15G2R1 (77.1%) and IIaA16G3R1 (11.9%). The rest were occasional findings, although it must be noted that this study constitutes the first reference of the presence of the subtypes IIaA13G2R1, IIaA14G1R1, IIaA14G2R1, IIaA16G1R1,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

IIaA17G3R1, IIaA17G4R1 y IIaA17R1 in cattle from Spain. All the detected subtypes have zoonotic potential; moreover, the predominant subtype (IIaA15G2R1) is the most common one in human infections with *C. parvum* in Spain. These data suggest that the calves which suffer from NCD constitute an important *C. parvum* reservoir for humans and can be responsible for a significant percentage of the outbreaks that have been detected in people. Regarding their distribution according to the farm of origin, all the isolates from the same herd belonged to the same subtype, except for two cases, which proves the high morbidity of this protozoan in the farm environment.

Regarding the molecular characterization of *G. duodenalis*, only 9.5% of the samples could be amplified. The highest number of positive samples was obtained for the *gdh* gene (5), whereas the analysis of the *bg* and *tpi* genes enabled the obtention of four and three positives, respectively. Assemblage E was identified in all the obtained sequences, it is the most common one in cattle and its presence in humans is occasional; thus, we cannot exclude a public health risk stemming from the infected calves. Nevertheless, given the low percentage of genotyped isolates, probably due to the high polymorphism of the sequences, the presence of other zoonotic genotypes like assemblage A cannot be ruled out, especially considering that it has previously been detected in healthy calves from the same geographical area. However, provided that all the sampled animals were diarrhoeic, the sole presence of genotype E may indicate that it is more pathogenic for the calf.

The impact of NCD on public health can also be related to one of the most frequently used treatment measures, antibiotic therapy, provided that its indiscriminate use favours the selection of resistant bacteria. This is a severe issue given that it considerably reduces the available therapeutic options to effectively control bacterial infections in humans and animals. ETEC is one of the most important bacterial agents involved in NCD; thus, we must pay special attention to the resistance mechanisms linked to this pathogen to optimize the selection of the antibiotics which are going to be used against it. On this basis, in the **third study** of this Doctoral Thesis we aimed to characterize the susceptibility of ETEC strains isolated from diarrhoeic calves from the northwest of Spain against five antimicrobial families (beta- lactams, aminoglycosides, quinolones, tetracyclines and trimethoprim/sulphonamides), to determine the frequency of the resistance mechanisms against these families and to identify the presence of multidrug-resistant (MDR) strains. In

USC

order to do so, we selected those samples from the first study in which the presence of the F5 adhesin and the Sta enterotoxin was confirmed with cycle threshold (Ct) values under 25 for both genes. For each sample, one colony confirmed as ETEC by qPCR was chosen and antimicrobial susceptibility testing (AST) was performed. The AST included 14 antibiotics representative of the five most used antimicrobial families in veterinary medicine (beta-lactams, aminoglycosides, quinolones, tetracyclines and trimethoprim/sulphonamides). The results of the minimum inhibitory concentration (CMI) for each antibiotic were used to classify the ETEC isolates as susceptible, intermediate or resistant to each compound. Moreover, the minimum concentration of each antibiotic to suppress the growth of 90% of the strains was calculated (CMI90%).

The obtained results show a very worrying situation and indicate that, in farms from the northwest of Spain, antimicrobial resistance is very frequent in ETEC isolates from diarrhoeic calves under a month of age. All the strains were resistant to at least four out of the 14 tested antimicrobials, and more than half of them (51%) to ten or more compounds. Furthermore, all the strains were resistant to at least one antibiotic from three out of the five tested families and can be classified as multidrug-resistant strains. CMI90 was equal to the highest concentration used for eight of the tested antibiotics, which indicates that most of the strains were resistant to the maximum concentration of those compounds and, thus, showed great resistance to them. When we analysed the results according to antimicrobial families, we noticed remarkable differences in the susceptibility to the different compounds of the same family, which in most cases may have their origin in their respective frequency of use. Thus, most of the analysed ETEC strains were resistant to the first line antimicrobials most commonly used to treat NCD cases, with 100% of the strains resistant to ampicillin, cephalexin and cephalotin. Only gentamicin and third and fourth generation cefalosporins (ceftiofur, cefoperazone and cefquinome) could suppress the growth of more than 90% of the strains and are, thus, effective options to treat NCD. However, the usage of these compounds is restricted as they are considered critically important antibiotics for human medicine. These results lead to the conclusion that the use of antibiotic therapy in the treatment of NCD must be limited, even when its onset is due to an ETEC infection. In this respect, antibiotics should only be dispensed when clinical signs of systemic disease are observed. Moreover, the implementation of ASTs to determine the susceptibility of the strains which are circulating in the farm environment is very useful to optimize the selection

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

of the compound that is going to be used in the treatment. Likewise, establishing a farm record of antimicrobial susceptibility is helpful to monitor the evolution of resistance over time and facilitates the empirical selection of antimicrobials against future bacterial infections.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8. REFERENCIAS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Abal-Fabeiro, J.L., Maside, X., Llovo, J., Bartolomé, C., 2015. Aetiology and epidemiology of human cryptosporidiosis cases in Galicia (NW Spain), 2000-2008. Epidemiol. Infect. 143, 3022-3035. doi:10.1017/S0950268815000163

Abdel-Moein, K.A., Saeed, H., 2016. The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. Parasitol. Res. 115, 3197-3202. doi:10.1007/S00436-016-5081-7/TABLES/2

Abeywardena, H., Jex, A.R., Gasser, R.B., 2015. A Perspective on *Cryptosporidium* and *Giardia*, with an emphasis on bovines and recent epidemiological findings, Advances in Parasitology 88, 243-301. doi:10.1016/bs.apar.2015.02.001

Abraham, S., Trott, D.J., Jordan, D., Gordon, D.M., Groves, M.D., Fairbrother, J.M., Smith, M.G., Zhang, R., Chapman, T.A., 2014. Phylogenetic and molecular insights into the evolution of multidrug-resistant porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* in Australia. Int. J. Antimicrob. Agents 44, 105-111. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2014.04.011

Acero Adámez, P., 2009. Planificación y manejo de la explotación de vacuno de carne. Junta de Castilla y León.

Acres, S.D., 1985. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections in Newborn Calves: A Review. J. Dairy Sci. 68, 229-256. doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)80814-6

Adam, R.D., 2021. *Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. 34, e0002419. doi:10.1128/CMR.00024-19

Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447-475.

Adam, R.D., 2000. The *Giardia lamblia* genome. Int. J. Parasitol. 30, 475-484.

Adam, R.D., Dahlstrom, E.W., Martens, C.A., Bruno, D.P., Barbian, K.D., Ricklefs, S.M., Hernandez, M.M., Narla, N.P., Patel, R.B., Porcella, S.F., Nash, T.E., 2013. Genome Sequencing of *Giardia lamblia* Genotypes A2 and B Isolates (DH and GS) and Comparative Analysis with the Genomes of Genotypes A1 and E (WB and Pig). Genome Biol. Evol. 5, 2498-2511. doi:10.1093/GBE/EVT197

Adams, R.B., Guerrant, R.L., Zu, S., Fang, G., Roche, J.K., 1994. *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: Morphologic and functional studies in an in vitro model. J. Infect. Dis. 169, 170-177. doi:10.1093/infdis/169.1.170

Adkins, P.R.F., 2022. Cryptosporidiosis. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 38, 121-131. doi:10.1016/J.CVFA.2021.11.009

Adl, S.M., Bass, D., Lane, C.E., Lukeš, J., Schoch, C.L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M.W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A.A., Hoppenrath, M., James, T.Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D.J.G., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., Mann, D.G., Massana, R., Mitchell, E.A.D., Morrow, C., Park, J.S., Pawlowski, J.W., Powell, M.J., Richter, D.J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F.W., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V., Zhang, Q., 2019. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. J Eukaryot Microbiol. 66, 4-119. doi:10.1111/JEU.12691

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2022. Parofor crypto 140.000 UI/ml solución oral para bovino prerrumiante.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2021a. Deccox 60 mg/g premezcla medicamentosa para ovino y bovino.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2021b. Baycox Multi 50 mg/ml suspensión oral para bovino, porcino y ovino.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2020a. Halofusol 0,5 mg/ml solución oral para terneros.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2020b. Vecoxan 2,5 mg/ml Suspensión oral terneros y corderos.

Agencia Europea del Medicamento, 2022. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2021. Luxemburgo. doi:10.2809/39517

Agencia Europea del Medicamento, 2020. Categorisation of antibiotics used in animals promotes responsible use to protect public and animal health. Amsterdam, Países Bajos.

Agencia Europea del Medicamento, 2019. Categorisation of antibiotics in the European Union.

Agencia Europea del Medicamento, 2005. Commitee for Veterinary Medicinal Products: Lasalocid Sodium Summary Report.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aghakeshmiri, F., Azizzadeh, M., Farzaneh, N., Gorjidooz, M., 2017. Effects of neonatal diarrhea and other conditions on subsequent productive and reproductive performance of heifer calves. Vet. Res. Commun. 41, 107-112. doi:10.1007/s11259-017-9678-9

Ågren, E.C.C., Sternberg Lewerin, S., Wahlström, H., Emanuelson, U., Frössling, J., 2016. Low prevalence of *Salmonella* in Swedish dairy herds highlight differences between serotypes. Prev. Vet. Med. 125, 38-45. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.12.015

Ahmed, A.M., Younis, E.E.A., Osman, S.A., Ishida, Y., El-khodery, S.A., Shimamoto, T., 2009. Genetic analysis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. Vet. Microbiol. 136, 397-402. doi:10.1016/j.vetmic.2008.11.021

Aita, T., Kuwabara, M., Murayama, K., Sasagawa, Y., Yabe, S., Higuchi, R., Tamura, T., Miyazaki, A., Tsunemitsu, H., 2012. Characterization of epidemic diarrhea outbreaks associated with bovine torovirus in adult cows. Arch. Virol. 157, 423. doi:10.1007/S00705-011-1183-9

Akam, A., Khelef, D., Kaidi, R., Othmani, A., Lafri, M., Tali-Maamar, H., Rahal, K., Tahrat, N., Chirila, F., Cozma, V., Abdul-Hussain, M.S., 2004. Frequency of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli* K99 and *Salmonella* spp. isolated from healthy and unhealthy calves in six breeding farms from Mitidja, Algeria (Preliminary results). Rev. Sci. Parasitol. 5, 13-21.

Al-Majali, A.M., Asem, E.K., Lamar, C.H., Robinson, J.P., Freeman, M.J., Saeed, A.M., 2000. Studies on the Mechanism of Diarrhoea Induced by *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin (STa) in Newborn Calves. Vet. Res. Commun. 24, 327-338. doi:10.1023/A:1006444105846

Al Mawly, J., Grinberg, A., Prattley, D., Moffat, J., Marshall, J., French, N., 2015. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. Vet. J. 203, 155-160. doi:10.1016/j.tvjl.2015.01.010

Alfieri, A.A., Parazzi, M.E., Takiuchi, E., Médici, K.C., Alfieri, A.F., 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. Trop. Anim. Health Prod. 38, 521-526. doi:10.1007/S11250-006-4349-9

Allen, U.D., Deadman, L., Wang, E.E.L., 1994. Standardizing the assessment of diarrhea in clinical trials : results of an interobserver agreement study. Acta Pædiatrica 83, 179-182.

Alotaibi, M.A., Al-Amad, S., Chenari Bouket, A., Al-Aqeel, H., Haider, E., Hijji, A. Bin, Belbahri, L., Alenezi, F.N., 2022. High Occurrence Among Calves and Close Phylogenetic Relationships With Human Viruses Warrants Close Surveillance of Rotaviruses in Kuwaiti Dairy Farms. Front. Vet. Sci. 9, 1-8. doi:10.3389/fvets.2022.745934

Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., Antunes, F., 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. J. Clin. Microbiol. 41, 2744-2747. doi:10.1128/JCM.41.6.2744-2747.2003

Aly, S.S., Pithua, P., Champagne, J.D., Haines, D.M., 2013. A randomized controlled trial on preweaning morbidity, growth and mortality in Holstein heifers fed a lacteal-derived colostrum replacer or pooled maternal colostrum. BMC Vet. Res. 9, 168. doi:10.1186/1746-6148-9-168

Ament, M.E., 1972. Diagnosis and treatment of giardiasis. J. Pediatr. 80, 633-637. doi:10.1016/S0022-3476(72)80061-1

Ammar, S.S.M., Mokhtaria, K., Tahar, B.B., Amar, A.A., Redha, B.A., Yuva, B., Mohamed, H.S., Abdellatif, N., Laid, B., 2014. Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 4, S318-S322. doi:10.12980/APJTB.4.2014C778

Anderson, D.C., Kress, D.D., Bernardini, T.M.M., Davis, K.C., Boss, D.L., Doornbos, D.E., 2003. The Effect of Scours on Calf Weaning Weight. Prof. Anim. Sci. 19, 399-403.

Anderson, M., Clift, C., Schulze, K., Sagan, A., Driss, S.N., Ouakrim, A., Mossialos, E., 2019. Averting the AMR crisis: What are the avenues for policy action for countries in Europe? European Observatory on Health Systems and Policies, Copenhague, Dinamarca.

Ando, T., Noel, J.S., Fankhauser, R.L., 2000. Genetic Classification of "Norwalk-like Viruses". J. Infect. Dis. 181, S336-S348. doi:10.1086/315589

Angappan, M., Ghatak, S., Milton, A.A.P., Verma, A.K., Inbaraj, S., Abhishek, Chaudhuri, P., Agarwal, R.K., Thomas, P., 2021. Detection of novel sequence types and zoonotic transmission potentiality among strains of Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) from dairy calves, animal handlers and associated environments.

Brazilian J. Microbiol. 52, 2541-2546. doi:10.1007/S42770-021-00561-9

Anjum, M.F., 2015. Screening methods for the detection of antimicrobial resistance genes present in bacterial isolates and the microbiota. Future Microbiol. 10, 317-320. doi:10.2217/FMB.15.2

Anjum, M.F., Zankari, E., Hasman, H., 2017. Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. Microbiol. Spectr. 5. doi:10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0011-2017

Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., Svärd, S.G., 2010. Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nat. Rev. Microbiol. 8, 413-422. doi:10.1038/nrmicro2317

Anusz, K.Z., Mason, P.H., Riggs, M.W., Perryman, L.E., 1990. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 28, 2770-2774. doi:10.1128/jcm.28.12.2770-2774.1990

Argenzio, R.A., 1992. Pathophysiology of diarrhea, en: Anderson, N. V., Sherding, R.G., Merritt, A.M., Whitlock, R.H. (Eds.), Veterinary Gastroenterology. Lea & Febiger, pp. 163-172.

Argenzio, R.A., 1985. Pathophysiology of neonatal calf diarrhea. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 1, 461-469. doi:10.1016/S0749-0720(15)31296-2

Argenzio, R.A., 1981. Short-chain fatty acids and the colon. Dig. Dis. Sci. 1981 262 26, 97-99. doi:10.1007/BF01312223

Arsenopoulos, K., Theodoridis, A., Papadopoulos, E., 2017. Effect of colostrum quantity and quality on neonatal calf diarrhoea due to *Cryptosporidium* spp. infection. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 53, 50-55. doi:10.1016/j.cimid.2017.07.005

Asher, A.J., Hose, G., Power, M.L., 2016. Giardiasis in NSW : Identification of *Giardia duodenalis* assemblages contributing to human and cattle cases, and an epidemiological assessment of sporadic human giardiasis. Infect. Genet. Evol. 44, 157-161.

Atlas, R., Snyder, J., 2015. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology, en: Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A. (Eds.), Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington D. C., EE.UU. pp. 316-349.

Aust, V., Knappstein, K., Kunz, H.J., Kaspar, H., Wallmann, J., Kaske, M., 2013. Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 97, 1091-1103. doi:10.1111/JPN.12019

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA J. 20. doi:10.2903/J.EFSA.2022.7666

Avendaño, C., Ramo, A., Vergara-Castiblanco, C., Bayona, M., Velasco-Benitez, C.A., Sánchez-Acedo, C., Quílez, J., 2019. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in child population from Colombia. Infect. Genet. Evol. 76, 104034. doi:10.1016/J.MEEGID.2019.104034

Azami, M., Moghaddam, D.D., Salehi, R., Salehi, M., 2007. The identification of *Cryptosporidium* species in Isfahan, Iran by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. Mol. Biol. 41, 851-856. doi:10.1134/S0026893307050196

Azcona-Gutiérrez, J., de Lucio, A., Hernández-de-Mingo, M., García-García, C., Miguel Soria-Blanco, L., Morales, L., Aguilera, M., Fuentes, I., Carmena, D., 2017. Molecular diversity and frequency of the diarrheagenic enteric protozoan *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a hospital setting in Northern Spain. PLoS One 12, e0178575. doi:10.1371/journal.pone.0178575

Bachmann, L., Homeier, T., Arlt, S., Brueckner, M., Rawel, H., Deiner, C., Hartmann, H., 2009. Influence of different oral rehydration solutions on abomasal conditions and the acid-base status of suckling calves. J. Dairy Sci. 92, 1649-1659. doi:10.3168/jds.2008-1487

Bajer, A., Cacciò, S.M., Bednarska, M., Behnke, J.M., Pieniazek, N.J., Sinski, E., 2003. Preliminary Molecular Characterization of *Cryptosporidium parvum* Isolates of Wildlife Rodents From Poland. J. Parasitol. 89, 1053-1055. doi:10.1645/GE-3096RN

Bangoura, B., Bardsley, K.D., 2020. Ruminant Coccidiosis. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 36, 187-203. doi:10.1016/J.CVFA.2019.12.006

Bangoura, B., Daugschies, A., 2020. Coccidiosis in Cattle, en: Dubey, J.P. (Ed.), Coccidiosis in Livestock, Poultry, Companion Animals, and Humans. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU., pp. 79-90.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bangoura, B., Daugschies, A., 2018. *Eimeria*, en: Schnittger, L., Florin-Christensen, M. (Eds.), Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. Springer International Publishing AG, Cham, Suíza, pp. 55-101. doi:10.1007/978-3-319-70132-5

Barkley, J.A., Pempek, J.A., Bowman, A.S., Nolting, J.M., Lee, J., Lee, S., Habing, G.G., 2021. Longitudinal health outcomes for enteric pathogens in preweaned calves on Ohio dairy farms. Prev. Vet. Med. 190, 105323. doi:10.1016/J.PREVETMED.2021.105323

Barnett, S.C., Sischo, W.M., Moore, D.A., Reynolds, J.P., 2003. Evaluation of flunixin meglumine as an adjunct treatment for diarrhea in dairy calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 223, 1329-1333. doi:10.2460/javma.2003.223.1329

Barreiros, M.A.B., Alfieri, A.F., Médici, K.C., Leite, J.P.G., Alfieri, A.A., 2004. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. J. Vet. Med. Ser. B Infect. Dis. Vet. Public Heal. 51, 104-109. doi:10.1111/J.1439-0450.2004.00737.X

Barrier, A.C., Haskell, M.J., Birch, S., Bagnall, A., Bell, D.J., Dickinson, J., Macrae, A.I., Dwyer, C.M., 2013. The impact of dystocia on dairy calf health, welfare, performance and survival. Vet. J. 195, 86-90. doi:10.1016/J.TVJL.2012.07.031

Barrier, A.C., Ruelle, E., Haskell, M.J., Dwyer, C.M., 2012. Effect of a difficult calving on the vigour of the calf, the onset of maternal behaviour, and some behavioural indicators of pain in the dam. Prev. Vet. Med. 103, 248-256. doi:10.1016/J.PREVETMED.2011.09.001

Barrington, G.M., Gay, J.M., Evermann, J.F., 2002. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 18, 7-34. doi:10.1016/S0749-0720(02)00005-1

Barrington, G.M., Parish, S.M., 2001. Bovine Neonatal Immunology. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 17, 463-476. doi:10.1016/S0749-0720(15)30001-3

Bartels, C.J.M., Holzhauer, M., Jorritsma, R., Swart, W.A.J.M., Lam, T.J.G.M., 2010. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. Prev. Vet. Med. 93, 162-169. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.09.020

Bartens, M.C., Drillich, M., Rychli, K., Iwersen, M., Arnholdt, T., Meyer, L., Klein-Jöbstl, D., 2016. Assessment of different methods to estimate bovine colostrum quality on farm. N. Z. Vet. J. 64, 263-267. doi:10.1080/00480169.2016.1184109

Bartier, A.L., Windeyer, M.C., Doepel, L., 2015. Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement. J. Dairy Sci. 98, 1878-1884. doi:10.3168/jds.2014-8415

Bartley, P.M., Roehe, B.K., Thomson, S., Shaw, H.J., Peto, F., Innes, E.A., Katzer, F., 2019. Detection of potentially human infectious assemblages of *Giardia duodenalis* in fecal samples from beef and dairy cattle in Scotland. Parasitology 146, 1123-1130. doi:10.1017/S0031182018001117

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B.M., Walker, S.C., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. J. Stat. Softw. 67, 1-48. doi:10.18637/JSS.V067.I01

Beam, A.L., Lombard, J.E., Kopral, C.A., Garber, L.P., Winter, A.L., Hicks, J.A., Schlater, J.L., 2009. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. J. Dairy Sci. 92, 3973-3980. doi:10.3168/jds.2009-2225

Behrendt, J.H., Hermosilla, C., Hardt, M., Failing, K., Zahner, H., Taubert, A., 2008. PMN-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. Vet. Parasitol. 151, 97-109. doi:10.1016/j.vetpar.2007.11.013

Bellamy, J.E., Acres, S.D., 1979. Enterotoxigenic colibacillosis in colostrum-fed calves: pathologic changes. Am. J. Vet. Res. 40, 1391-1397.

Bendali, F., Bichet, H., Schelcher, F., Sanaa, M., 1999a. Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. Vet Res 30, 61-74.

Bendali, F., Moez, S., Bichet, H., Schelcher, F., 1999b. Risk factors associated with diarrhoea in newborn calves. Vet Res 30, 509-522.

Benfield, D.A., Stotz, I.J., Nelson, E.A., Groon, K.S., 1984. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with electron microscopy, fluorescent antibody, and virus isolation for the detection of bovine and porcine rotavirus. Am. J. Vet. Res. 45, 1998-2002.

Benito, A.A., Arnal, J.L., García, B., Serrano, J.D., Barrios, J., Ondarra, M., Chacón, G., 2019. Identificación y genotipado de rotavirus A circulante en terneros con problemas digestivos en España, en: XXIV Congreso Internacional ANEMBE Medicina Bovina. Sevilla, España, p. 360.

Benito, A.A., Monteagudo, L. V., Arnal, J.L., Baselga, C., Quílez, J., 2020. Occurrence and genetic diversity of rotavirus A in faeces of diarrheic calves submitted to a veterinary laboratory in Spain. Prev. Vet. Med. 185, 105196. doi:10.1016/J.PREVETMED.2020.105196

Berahmat, R., Spotin, A., Ahmadpour, E., Mahami-Oskouei, M., Rezamand, A., Aminisani, N., Ghojazadeh, M., Ghoyounchi, R., Mikaeili-Galeh, T., 2017. Human cryptosporidiosis in Iran: a systematic review and meta-analysis. Parasitol. Res. 116, 1111-1128. doi:10.1007/S00436-017-5376-3

Berge, A.C., Hancock, D.D., Sischo, W.M., Besser, T.E., 2010. Geographic, farm, and animal factors associated with multiple antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from cattle in the western United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 236, 1338-1344. doi:10.2460/javma.236.12.1338

Berge, A.C.B., Atwill, E.R., Sischo, W.M., 2005. Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. Prev. Vet. Med. 69, 25-38. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.01.013

Berge, A.C.B., Moore, D.A., Besser, T.E., Sischo, W.M., 2009. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: Effects on health, growth, and treatment costs. J. Dairy Sci. 92, 4707-4714. doi:10.3168/jds.2009-2199

Berge, A.C.B., Moore, D.A., Sischo, W.M., 2006. Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. Appl. Environ. Microbiol. 72, 3872-3878. doi:10.1128/AEM.02239-05

Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S.E., Hutson, A.M., Estes, M.K., 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. J. Virol. 77, 11603–11615. doi:10.1128/JVI.77.21.11603

Bertoni, E.A., Aduriz, M., Bok, M., Vega, C., Saif, L., Aguirre, D., Cimino, R.O., Miño, S., Parreño, V., 2020. First report of group A rotavirus and bovine coronavirus associated with neonatal calf diarrhea in the northwest of Argentina. Trop. Anim. Health Prod. 52, 2761-2768. doi:10.1007/s11250-020-02293-8/Published

Bertoni, E.A., Bok, & M., Vega, & C., Martinez, G.M., Cimino, & R., Parreño, V., 2021. Influence of individual or group housing of newborn calves on rotavirus and coronavirus infection during the first 2 months of life. Trop. Anim. Health Prod. 53, 62. doi:10.1007/s11250-020-02540-y

Besser, T.E., Gay, C.C., Pritchett, L., 1991. Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 198, 419-422.

Bielaszewska, M., Aldick, T., Bauwens, A., Karch, H., 2014. Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Structure, transport, biological activity and putative role in virulence. Int. J. Med. Microbiol. 304, 521-529. doi:10.1016/J.IJMM.2014.05.005

Bielefeldt-Ohmann, H., 1995. The Pathologies of Bovine Viral Diarrhea Virus Infection: A Window on the Pathogenesis. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 11, 447-476. doi:10.1016/S0749-0720(15)30461-8

Björkman, C., Svensson, C., Christensson, B., De Verdier, K., 2003. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. Acta Vet. Scand. 44, 145-152. doi:10.1186/1751-0147-44-145

Blake, D.P., Tomley, F.M., 2014. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. Trends Parasitol. 30, 12-19. doi:10.1016/J.PT.2013.10.003

Blanchard, P.C., 2012. Diagnostics of Dairy and Beef Cattle Diarrhea. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 28, 443-464. doi:10.1016/j.cvfa.2012.07.002

Blanco, J., 2014. Un galego: a fala, a retranca, a morriña, a terra: A estrutura da terra como feito diferencial de Galicia, en: Saavedra, P., Rodríguez, R. (Eds.), A terra en Galicia: pasado, presente e futuro. Concello de Lalín, Universidad Internacional Menendez Pelayo, Lalín, España, pp. 36-54.

Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J.E., Gonzalez, E.A., Garabal, J.I., Cantalapiedra, A., Goicoa, A., 1993a. Resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* de origen bovino. Med. Vet. 10, 154-162.

Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J.E., Ramos, J., 1993b. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. Am. J. Vet. Res. 54, 1446-1451.

Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., Gonzalez, E.A., Mora, A., Prado, C., Fernandez, L., Rio, M., Ramos, J., Alonso, M.P., 1996. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. Epidemiol. Infect. 117, 251-257. doi:10.1017/s0950268800001424

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bleul, U.T., Schwantag, S.C., Kähn, W.K., 2007. Effects of hypertonic sodium bicarbonate solution on electrolyte concentrations and enzyme activities in newborn calves with respiratory and metabolic acidosis. Am. J. Vet. Res. 68, 850-857. doi:10.2460/ajvr.68.8.850

Bohrmann, R., 1991. Treatment with toltrazuril in a natural outbreak of coccidiosis in calves. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 98, 343-345.

Bok, M., Miño, S., Rodriguez, D., Badaracco, A., Nuñes, I., Souza, S.P., Bilbao, G., Louge Uriarte, E., Galarza, R., Vega, C., Odeon, A., Saif, L.J., Parreño, V., 2015. Molecular and antigenic characterization of bovine coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994-2010. Vet. Microbiol. 181, 221-229. doi:10.1016/j.vetmic.2015.10.017

Bonura, F., Mangiaracina, L., Filizzolo, C., Bonura, C., Martella, V., Ciarlet, M., Giammanco, G.M., De Grazia, S., 2022. Impact of Vaccination on Rotavirus Genotype Diversity: A Nearly Two-Decade-Long Epidemiological Study before and after Rotavirus Vaccine Introduction in Sicily, Italy. Pathogens 11, 424. doi:10.3390/PATHOGENS11040424

Bornay-Llinares, F.J., Da Silva, A.J., Moura, I.N.S., Myjak, P., Pietkiewicz, H., Kruminis-ŁOzowska, W., Graczyk, T.K., Pieniazek, N.J., 1999. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1455-1458. doi:10.1128/AEM.65.4.1455-1458.1999/FORMAT/EPUB

Borowski, H., Clode, P.L., Thompson, R.C.A., 2008. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. Trends Parasitol. 24, 509-516. doi:10.1016/j.pt.2008.08.002

Borowski, H., Thompson, R.C.A., Armstrong, T., Clode, P.L., 2010. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. Parasitology 137, 13-26. doi:10.1017/S0031182009990837

Bosák, J., Hrala, M., Micenková, L., Šmajs, D., 2021. Non-antibiotic antibacterial peptides and proteins of *Escherichia coli*: efficacy and potency of bacteriocins. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 19, 309-322. doi:10.1080/14787210.2020.1816824

Bosák, J., Hrala, M., Pirková, V., Micenková, L., Čížek, A., Smola, J., Kučerová, D., Vacková, Z., Budinská, E., Koláčková, I., Šmajs, D., 2019. Porcine pathogenic *Escherichia coli* strains differ from human fecal strains in occurrence of bacteriocin types. Vet. Microbiol. 232, 121-127. doi:10.1016/j.vetmic.2019.04.003

Bowman, D.D., 2014. Georgis' Parasitology for Veterinarians, 10ª. ed. Elsevier Inc., St. Louis, Misuri, EE.UU.

Boyce, J.M., Pittet, D., 2002. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Society for Healthcare Epidemiology of America/Association for Professionals in Infection Control/Infectious Diseases Society of America. Morb. Mortal. Wkly. Report. Recomm. Reports 51.

Brainard, J., Hammer, C.C., Hunter, P.R., Katzer, F., Hurle, G., Tyler, K., 2021. Efficacy of halofuginone products to prevent or treat cryptosporidiosis in bovine calves: A systematic review and meta-analyses. Parasitology 148, 408-409. doi:10.1017/S0031182020002267

Bridger, J.C., Hall, G.A., Brown, J.F., 1984. Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea. Infect. Immun. 43, 133-138. doi:10.1128/iai.43.1.133-138.1984

Brooks, D.E., Cavanagh, J., Jayroe, D., Janzen, J., Snoek, R., Trust, T.J., 1989. Involvement of the MN blood group antigen in shear-enhanced hemagglutination induced by the *Escherichia coli* F41 adhesin. Infect. Immun. 57, 377-383.

Broom, D.M., 1983. Cow-calf and sow-piglet behaviour in relation to colostrum ingestion. Ann. Rech. Vet. 14, 342-348.

Brunauer, M., Roch, F.F., Conrady, B., 2021. Prevalence of Worldwide Neonatal Calf Diarrhoea Caused by Bovine Rotavirus in Combination with Bovine Coronavirus, *Escherichia coli* K99 and *Cryptosporidium* spp.: A Meta-Analysis. Animals 11, 1014. doi:10.3390/ANI11041014

Brunton, L.A., Duncan, D., Coldham, N.G., Snow, L.C., Jones, J.R., 2012. A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. Vet. Rec. 171, 296-296. doi:10.1136/VR.100924

Brunton, L.A., Reeves, H.E., Snow, L.C., Jones, J.R., 2014. A longitudinal field trial assesing the impact of feeding waste milk containing antibiotic residues on the prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* in calves. Prev. Vet. Med. 117, 403-412. doi:10.1016/J.PREVETMED.2014.08.005

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Buczinski, S., Vandeweerd, J.M., 2016. Diagnostic accuracy of refractometry for assessing bovine colostrum quality: A systematic review and meta-analysis. J. Dairy Sci. 99, 7381-7394. doi:10.3168/JDS.2016-10955

Buret, A.G., 2007. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. Gut 56, 316-317. doi:10.1136/GUT.2006.107771

Buret, A.G., Chin, A.C., Scott, K.G.E., 2003. Infection of human and bovine epithelial cells with *Cryptosporidium andersoni* induces apoptosis and disrupts tight junctional ZO-1: Effects of epidermal growth factor. Int. J. Parasitol. 33, 1363-1371. doi:10.1016/S0020-7519(03)00138-3

Bürger, H.J., 1983. *Eimeria*-Infektionen beim Rind. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 96, 350-357.

Buts, L., Bouckaert, J., De Genst, E., Loris, R., Oscarson, S., Lahmann, M., Messens, J., Brosens, E., Wyns, L., De Greve, H., 2003. The fimbrial adhesin F17-G of enterotoxigenic *Escherichia coli* has an immunoglobulin-like lectin domain that binds N -acetylglucosamine. Mol. Microbiol. 49, 705-715.

Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Pozio, E., 2002. Sequence analysis of the β-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int. J. Parasitol. 32, 1023-1030. doi:10.1016/S0020-7519(02)00068-1

Cacciò, S.M., Lalle, M., Svärd, S.G., 2018. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. Infect. Genet. Evol. 66, 335-345. doi:10.1016/J.MEEGID.2017.12.001

Caffarena, R.D., Casaux, M.L., Schild, C.O., Fraga, M., Castells, M., Colina, R., Maya, L., Corbellini, L.G., Riet-correa, F., Giannitti, F., 2021. Causes of neonatal calf diarrhea and mortality in pasture-based dairy herds in Uruguay : a farm-matched case-control study. Brazilian J. Microbiol. 52, 977-988.

Cai, M., Guo, Y., Pan, B., Li, N., Wang, X., Tang, C., Feng, Y., Xiao, L., 2017. Longitudinal monitoring of *Cryptosporidium* species in pre-weaned dairy calves on five farms in Shanghai, China. Vet. Parasitol. 241, 14-19. doi:10.1016/j.vetpar.2017.05.005

Cai, W., Ryan, U.M., Xiao, L., Feng, Y., 2021. Zoonotic giardiasis: an update. Parasitol. Res. 120, 4199-4218. doi:10.1007/S00436-021-07325-2

Cama, V., Gilman, R.H., Vivar, A., Ticona, E., Ortega, Y., Bern, C., Xiao, L., 2006. Mixed *Cryptosporidium* Infections and HIV. Emerg. Infect. Dis. 12, 1025-1028.

Cameron, A., Zaheer, R., Adator, E.H., Barbieri, R., Reuter, T., McAllister, T.A., 2019. Bacteriocin occurrence and activity in *Escherichia coli* isolated from bovines and wastewater. Toxins. 11, 1-17. doi:10.3390/toxins11080475

Cantón, R., 2010. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 28, 375-385. doi:10.1016/J.EIMC.2010.01.001

Carreno, R.A., Matrin, D.S., Barta, J.R., 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol. Res. 85. doi:10.1007/s004360050655

Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., Cavard, D., 2007. Colicin Biology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71, 158-229. doi:10.1128/MMBR.00036-06

Casemore, D.P., Armstrong, M., Sands, R.L., 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J. Clin. Pathol. 38, 1337-1341. doi:10.1136/jcp.38.12.1337

Castellanos-Gonzalez, A., Yancey, L.S., Wang, H.C., Pantenburg, B., Liscum, K.R., Lewis, D.E., White, A.C.J., 2008. *Cryptosporidium* infection of human intestinal epithelial cells increases expression of osteoprotegerin: a novel mechanism for evasion of host defenses. J. Infect. Dis. 197, 916–923.

Castells, M., Caffarena, R.D., Casaux, M.L., Schild, C., Castells, F., Castells, D., Victoria, M., Riet-Correa, F., Giannitti, F., Parreño, V., Colina, R., 2020a. Detection, risk factors and molecular diversity of norovirus GIII in cattle in Uruguay. Infect. Genet. Evol. 86. doi:10.1016/J.MEEGID.2020.104613

Castells, M., Caffarena, R.D., Casaux, M.L., Schild, C., Miño, S., Castells, F., Victoria, M., Riet-Correa, F., Giannitti, F., Parreño, V., Colina, R., 2020b. Phylogenetic Analyses of Rotavirus A from Cattle in Uruguay Reveal the Circulation of Common and Uncommon Genotypes and Suggest Interspecies Transmission. Pathogens 9, 570.

Castells, M., Colina, R., 2021. Viral enteritis in cattle: To well known viruses and beyond. Microbiol. Res. 12, 663-682.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

doi:10.3390/MICROBIOLRES12030048

Castells, M., Giannitti, F., Caffarena, R.D., Casaux, M.L., Schild, C., Castells, D., Riet-Correa, F., Victoria, M., Parreño, V., Colina, R., 2019. Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries. Arch. Virol. 164, 2715-2724. doi:10.1007/S00705-019-04384-W

Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia Da Costa, J.M., Rumbo-Lorenzo, C., Mezo, M., 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. Parasitol. Res. 101, 1443-1448. doi:10.1007/S00436-007-0624-6/TABLES/1

Castro-Hermida, J.A., Carro-Corral, C., González-Warleta, M., Mezo, M., 2006. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and Giardia duodenalis in dairy cattle in Galicia (NW Spain). J. Vet. Med. Ser. B Infect. Dis. Vet. Public Heal. 53, 244-246. doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00946.x

Castro-Hermida, J.A., García-Presedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Da Costa, J.M.C., Mezo, M., 2011. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). Sci. Total Environ. 409, 2451-2459. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2011.03.010

Castro-Hermida, J.A., González-Losada, Y.A., Ares-Mazás, E., 2002a. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). Vet. Parasitol. 106, 1-10. doi:10.1016/S0304-4017(02)00036-5

Castro-Hermida, J.A., González-Losada, Y.A., Mezo-Menéndez, M., Ares-Mazás, E., 2002b. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. Vet. Parasitol. 106, 11-17. doi:10.1016/S0304-4017(02)00038-9

Cengiz, S., Adigüzel, M.C., 2020. Determination of virulence factors and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from calf diarrhea, part of eastern Turkey. Ankara Univ Vet Fak Derg 67, 365-371. doi:10.33988/auvfd.640990

Chakravarty, S., Hutson, A.M., Estes, M.K., Prasad, B.V. V., 2005. Evolutionary Trace Residues in Noroviruses: Importance in Receptor Binding, Antigenicity, Virion Assembly, and Strain Diversity. J. Virol. doi:10.1128/JVI.79.1.554-568.2005

Chalmers, R.M., Katzer, F., 2013. Looking for *Cryptosporidium*: The application of advances in detection and diagnosis. Trends Parasitol. doi:10.1016/j.pt.2013.03.001

Chalmers, R.M., Robinson, G., Elwin, K., Elson, R., 2019. Analysis of the *Cryptosporidium* spp. and *gp60* subtypes linked to human outbreaks of cryptosporidiosis in England and Wales, 2009 to 2017. Parasit. Vectors 12. doi:10.1186/S13071-019-3354-6

Chalmers, R.M., Sturdee, A.P., Bull, S.A., Miller, A., Wright, S.E., 1997. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in Mus domesticus, Apodemus sylvaticus and Clethrionomys glareolus in an agricultural system. Parasitol. Res. 1997 835 83, 478-482. doi:10.1007/S004360050283

Chan, W.W., Jonker, F.H., Rausch, W.D., Taverne, M.A.M., 1993. Plasma catecholamines and blood chemistry in newborn calves in relation to different obstetrical procedures and to neonatal outcome. Anim. Reprod. Sci. 34, 43-54. doi:10.1016/0378-4320(93)90048-V

Chanter, N., Hall, G.A., Bland, A.P., Hayle, A.J., Parsons, K.R., 1986. Dysentery in calves caused by an atypical strain of *Escherichia coli* (S102-9). Vet. Microbiol. 12, 241-253. doi:10.1016/0378-1135(86)90053-2

Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B., Dewulf, J., 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries. J. Antimicrob. Chemother. 69, 827-834. doi:10.1093/jac/dkt443

Chen, S., Zhang, W., Zhai, J., Chen, X., Qi, Y., 2022. Prevalence of bovine rotavirus among cattle in mainland China: A meta-analysis. Microb. Pathog. 170, 105727. doi:10.1016/J.MICPATH.2022.105727

Chen, Y., Huang, J., Qin, H., Wang, L., Li, J., Zhang, L., 2023. *Cryptosporidium parvum* and *gp60* genotype prevalence in dairy calves worldwide: a systematic review and meta-analysis. Acta Trop. 240, 106843. doi:10.1016/j.actatropica.2023.106843

Chigerwe, M., Tyler, J.W., Middleton, J.R., Spain, J.N., Dill, J.S., Steevens, B.J., 2008. Comparison of four methods to assess colostral IgG concentration in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 233, 761-766. doi:10.2460/javma.233.5.761

China, B., Pirson, V., Mainil, J., 1998. Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in

Belgium. Vet. Microbiol. 63, 249-259. doi:10.1016/S0378-1135(98)00237-5

Cho, H.C., Kim, E.M., Shin, S.U., Park, J., Choi, K.S., 2022. Molecular surveillance of rotavirus A associated with diarrheic calves from the Republic of Korea and full genomic characterization of bovine-porcine reassortant G5P[7] strain. Infect. Genet. Evol. 100, 105266. doi:10.1016/J.MEEGID.2022.105266

Cho, Y.-I., 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. Vet. Microbiol. 166, 375-385. doi:10.1016/j.vetmic.2013.07.001

Cho, Y.-I., Kim, W.-I., Liu, S., Kinyon, J.M., Yoon, K.J., 2010. Development of a panel of multiplex real-time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of major agents causing calf diarrhea in feces. J. Vet. Diagnostic Investig. 22, 509-517.

Cho, Y.-I., Yoon, K.-J., 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. J. Vet. Sci. 15, 1-17.

Clancy, J.L., Hargy, T.M., 2008. Waterborne: Drinking Water, en: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, EE.UU., pp. 305-334.

Clark, M.A., 1993. Bovine Coronavirus. Br. Vet. J. 149, 51-70.

Clarke, S.C., Haigh, R.D., Freestone, P.P.E., Williams, P.H., 2003. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 16, 365. doi:10.1128/CMR.16.3.365-378.2003

Clerc, M., Fenton, A., Babayan, S.A., Pedersen, A.B., 2019. Parasitic nematodes simultaneously suppress and benefit from coccidian coinfection in their natural mouse host. Parasitology 146, 1107. doi:10.1017/S0031182019000623

Coburn, B., Grassl, G.A., Finlay, B.B., 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. Immunol. Cell Biol. 85, 112-118. doi:10.1038/sj.icb.7100007

Cohen, D., Green, M., Block, C., Slepon, R., Ambar, R., Wasserman, S.S., Levine, M.M., 1991. Reduction of transmission of shigellosis by control of houseflies (*Musca domestica*). Lancet 337, 993-997. doi:10.1016/0140-6736(91)92657-N

Conneely, M., Berry, D.P., Sayers, R., Murphy, J.P., Lorenz, I., Doherty, M.L., Kennedy, E., 2013. Factors associated with the concentration of immunoglobulin G in the colostrum of dairy cows. Animal 7, 1824-1832. doi:10.1017/S1751731113001444

Conrady, B., Brunauer, M., Roch, F.F., 2021. *Cryptosporidium* spp. Infections in Combination with Other Enteric Pathogens in the Global Calf Population. Animals 11, 1786. doi:10.3390/ANI11061786

Consellería do Medio Rural, 2021. Anuario de estatística agraria 2019.

Consellería do Medio Rural, 2020. Programa de Desarrollo Rural 2014-2020.

Constable, P.D., 2009. Treatment of Calf Diarrhea: Antimicrobial and Ancillary Treatments. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 25, 101-120. doi:10.1016/j.cvfa.2008.10.012

Constable, P.D., 2004. Antimicrobial Use in the Treatment of Calf Diarrhea. J. Vet. Intern. Med. 18, 8-17. doi:10.1892/0891-6640(2004)18<8:AUITTO>2.0.CO;2

Constable, P.D., 2003. Fluid and electrolyte therapy in ruminants. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 19, 557-597. doi:10.1016/S0749-0720(03)00054-9

Constable, P.D., Pyörälä, S., Smith, G.W., 2009. Guidelines for Antimicrobial Use in Cattle, en: Guardabassi, L., Jensen, L.B., Kruse, H. (Eds.), Guide to Antimicrobial Use in Animals. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, Reino Unido, pp. 143-160. doi:10.1002/9781444302639.ch9

Constable, P.D., Stämpfli, H.R., Navetat, H., Berchtold, J., Schelcher, F., 2005. Use of a quantitative strong ion approach to determine the mechanism for acid-base abnormalities in sick calves with or without diarrhea. J. Vet. Intern. Med. 19, 581-589. doi:10.1892/0891-6640(2005)19[581:UOAQSI]2.0.CO;2

Constable, P.D., Thomas, E., Boisrame, B., 2001. Comparison of Two Oral Electrolyte Solutions for the Treatment of Dehydrated Calves with Experimentally-Induced Diarrhoea. Vet. J. 162, 129-140. doi:10.1053/tvjl.2000.0553

Constable, P.D., Trefz, F.M., Sen, I., Berchtold, J., Nouri, M., Smith, G., Grünberg, W., 2021. Intravenous and Oral Fluid Therapy in Neonatal Calves With Diarrhea or Sepsis and in Adult Cattle. Front. Vet. Sci. 7, 603358. doi:10.3389/fvets.2020.603358

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Constable, P.D., Walker, P.G., Morin, D.E., Foreman, J.H., 1998. Clinical and laboratory assessment of hydration status of neonatal calves with diarrhea. J. Am. Vet. Med. Assoc. 212, 991-996.

Contrepois, M., Bertin, Y., Girardeau, J.P., Picard, B., Goullet, P., 1993. Clonal relationships among bovine pathogenic *Escherichia coli* producing surface antigen CS31A. FEMS Microbiol. Lett. 106, 217-222.

Cornelissen, A.W.C.A., Verstegen, R., van den Brand, H., Perie, N.M., Eysker, M., Lam, T.J.G.M., Pijpers, A., 1995. An observational study of *Eimeria* species in housed cattle on Dutch dairy farms. Vet. Parasitol. 56, 7-16.

Coskun, A., Sen, I., Guzelbektes, H., Ok, M., Turgut, K., Canikli, S., 2010. Comparison of the effects of intravenous administration of isotonic and hypertonic sodium bicarbonate solutions on venous acid-base status in dehydrated calves with strong ion acidosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 236, 1098-1103. doi:10.2460/javma.236.10.1098

Costa, J.F.D.R., Novo, S.M.F., Baccili, C.C., Sobreira, N.M., Hurley, D.J., Gomes, V., 2017. Innate immune response in neonate Holstein heifer calves fed fresh or frozen colostrum. Res. Vet. Sci. 115, 54-60. doi:10.1016/j.rvsc.2017.01.008

Costa, J.H.C., von Keyserlingk, M.A.G., Weary, D.M., 2016. Invited review: Effects of group housing of dairy calves on behavior, cognition, performance, and health. J. Dairy Sci. 99, 2453-2467. doi:10.3168/JDS.2015-10144

Coura, F.M., Freitas, M.D., Ribeiro, J., de Leme, R.A., de Souza, C., Alfieri, A.A., Facury Filho, E.J., de Carvalho, A.Ú., Silva, M.X., Lage, A.P., Heinemann, M.B., 2014. Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. Trop. Anim. Health Prod. 47, 3-11. doi:10.1007/s11250-014-0675-5

Cresswell, E., Brennan, M.L., Barkema, H.W., Wapenaar, W., 2014. A questionnaire-based survey on the uptake and use of cattle vaccines in the UK. Vet. Rec. Open 1, e000042. doi:10.1136/vropen-2014-000042

Cruywagen, C.W., Jordaan, I., Venter, L., 1996. Effect of *Lactobacillus acidophilus* Supplementation of Milk Replacer on Preweaning Performance of Calves. J. Dairy Sci. 79, 483-486. doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76389-0

Csardi, G., Nepusz, T., 2006. The igraph software package for complex network research. InterJournal Complex Sy, 1695.

Cui, J., Fang, L., Shi, Z.-L., 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nat. Rev. Microbiol. 17, 181-192. doi:10.1038/s41579-018-0118-9

Cummings, K.J., Virkler, P.D., Wagner, B., Lussier, E.A., Thompson, B.S., 2018. Herd-level prevalence of *Salmonella* Dublin among New York dairy farms based on antibody testing of bulk tank milk. Zoonoses Public Health 65, 1003-1007. doi:10.1111/zph.12523

Cummins, C., Berry, D.P., Sayers, R., Lorenz, I., Kennedy, E., 2016. Questionnaire identifying management practices surrounding calving on spring-calving dairy farms and their associations with herd size and herd expansion. Animal 10, 868-877. doi:10.1017/S1751731116000124

Curtis, C.R., Scarlett, J.M., Erb, H.N., White, M.E., 1988. Path model of individual-calf risk factors for calfhood morbidity and mortality in New York Holstein herds. Prev. Vet. Med. 6, 43-62.

Curtis, G.C., Argo, C.M., Jones, D., Grove-White, D.H., 2016. Impact of feeding and housing systems on disease incidence in dairy calves. Vet. Rec. 179, 512-512. doi:10.1136/VR.103895

D'Souza, D.H., Su, X., 2010. Efficacy of Chemical Treatments Against Murine Norovirus, Feline Calicivirus, and MS2 Bacteriophage. Foodborne Pathog. Dis. 7, 319-326. doi:10.1089/FPD.2009.0426

da Silva Medeiros, T.N., Lorenzetti, E., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2015. Phylogenetic analysis of a G6P[5] bovine rotavirus strain isolated in a neonatal diarrhea outbreak in a beef cattle herd vaccinated with G6P[1] and G10P[11] genotypes. Arch. Virol. 160, 447-451. doi:10.1007/S00705-014-2271-4

Dar, A.M., Kapil, S., Goyal, S.M., 1998. Comparison of immunohistochemistry, electron microscopy, and direct fluorescent antibody test for the detection of bovine coronavirus. J. Vet. Diagnostic Investig. 10, 152-157. doi:10.1177/104063879801000206

Dastjerdi, A.M., Green, J., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G., Bridger, J.C., 1999. The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. Virology 254, 1-5.

Daugschies, A., Najdrowski, M., 2005. Eimeriosis in Cattle: Current Understanding. J. Vet. Med. Ser. B 52, 417-427. doi:10.1111/j.1439-

0450.2005.00894.x

Davis, L.R., Bowman, G.W., Boughton, D.C., 1957. The Endogenous Development of *Eimeria alabamensis* Christensen, 1941, an Intranuclear Coccidium of Cattle. J. Protozool. 4, 219-225. doi:10.1111/J.1550-7408.1957.TB02511.X

Davis, M.A., Hancock, D.D., Besser, T.E., Daniels, J.B., Baker, K.N.K., Call, D.R., 2007. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Dublin isolates from beef and dairy sources. Vet. Microbiol. 119, 221-230. doi:10.1016/J.VETMIC.2006.08.028

Davoudi, Y., Garedaghi, Y., Safarmashaei, S., 2011. Epidemiological study of Giardiasis in diarrheic calves in East-Azerbaijan province, Iran. J. Anim. Vet. Adv. 10, 2508-2510. doi:10.3923/JAVAA.2011.2508.2510

De Briyne, N., Atkinson, J., Borriello, S.P., Pokludová, L., 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. Vet. Rec. 175, 325-325. doi:10.1136/VR.102462

de Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E., 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. Int. J. Parasitol. 29, 1269-1287. doi:10.1016/S0020-7519(99)00076-4

De Graaf, F.K., Roorda, I., 1982. Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. Infect. Immun. 36, 751-758.

De La Fuente, R., García, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Luzón, M., Cid, D., García, S., Orden, J.A., Gómez-Bautista, M., 1998. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. Prev. Vet. Med. 36, 145-152. doi:10.1016/S0167-5877(98)00077-4

De La Fuente, R., Luzón, M., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., García, A., Cid, D., Orden, J.A., García, S., Sanz, R., Gómez-Bautista, M., 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enterophatogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. Vet. Parasitol. 80, 179-185. doi:10.1016/S0304-4017(98)00218-0

de Lucio, A., Merino, F.J., Martínez-Ruiz, R., Bailo, B., Aguilera, M., Fuentes, I., Carmena, D., 2016. Molecular genotyping and sub-genotyping of *Cryptosporidium* spp. isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. Infect. Genet. Evol. 37, 49-56. doi:10.1016/J.MEEGID.2015.10.026

De Passillé, A.M., Borderas, T.F., Rushen, J., 2011. Weaning age of calves fed a high milk allowance by automated feeders: Effects on feed, water, and energy intake, behavioral signs of hunger, and weight gains. J. Dairy Sci. 94, 1401-1408. doi:10.3168/JDS.2010-3441

De Verdier, K., Nyman, A., Greko, C., Bengtsson, B., 2012. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. Acta Vet. Scand. 54. doi:10.1186/1751-0147-54-2

Dean-Nystrom, E.A., Bosworth, B.T., Cray, W.C., Moon, H.W., 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. Infect. Immun. 65, 1842-1848. doi:10.1128/IAI.65.5.1842-1848.1997

Del Coco, V.F., Córdoba, M.A., Bilbao, G., de Almeida Castro, A.P., Basualdo, J.A., Fayer, R., Santín, M., 2014. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. Res. Vet. Sci. 96, 311-314. doi:10.1016/J.RVSC.2013.12.010

Delling, C., Daugschies, A., 2022. Literature Review: Coinfection in Young Ruminant Livestock-*Cryptosporidium* spp. and Its Companions. Pathogens 11, 103. doi:10.3390/PATHOGENS11010103

Demigné, C., Rémésy, C., Chartier, F., Kaligis, D., 1983. Utilization of volatile fatty acids and improvement of fluid therapy for treatment of dehydration in diarrheic calves. Ann. Rech. Vet. 14, 541-547.

Demigné, C., Rémésy, C., Chartier, F., LeFaivre, J., 1981. Effect of acetate or chloride anions on intestinal absorption of water and solutes in the calf. Am. J. Vet. Res. 42, 1356-1359.

Deng, Y., Batten, C.A., Liu, B.L., Lambden, P.R., Elschner, M., Günther, H., Otto, H.P., Schnürch, P., Eichhorn, W., Herbst, W., Clarke, I.N., 2003. Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine Noroviruses in Germany. J. Clin. Microbiol. 41, 2300-2305. doi:10.1128/JCM.41.6.2300-2305.2003

Denholm, K.S., McDougall, S., Chambers, G., Clough, W., 2018. Factors associated with colostrum quality in individual cows from dairy herds in the Waikato region of New Zealand. N. Z. Vet. J. 66, 115-120. doi:10.1080/00480169.2017.1418684

Desselberger, U., 2014. Rotaviruses. Virus Res. 190, 75-96. doi:10.1007/978-1-4899-7448-8_30

Di Bartolo, I., Ponterio, E., Monini, M., Ruggeri, F.M.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2011. A pilot survey of bovine norovirus in northern Italy. Vet. Rec. 169, 73-73. doi:10.1136/vr.d2625

Di Felice, E., Mauroy, A., Pozzo, F.D., Thiry, D., Ceci, C., Di Martino, B., Marsilio, F., Thiry, E., 2016. Bovine noroviruses: A missing component of calf diarrhoea diagnosis. Vet. J. 207, 53-62. doi:10.1016/J.TVJL.2015.10.026

Di Martino, B., Di Profio, F., Martella, V., Ceci, C., Marsilio, F., 2011. Evidence for recombination in neboviruses. Vet. Microbiol. 153, 367-372. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.034

Díaz, P., Hadfield, S.J., Quílez, J., Soilán, M., López, C., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Chalmers, R.M., 2012. Assessment of three methods for multilocus fragment typing of *Cryptosporidium parvum* from domestic ruminants in north west Spain. Vet. Parasitol. 186, 188-195. doi:10.1016/J.VETPAR.2011.11.039

Díaz, P., Navarro, E., Prieto, A., Pérez-Creo, A., Viña, M., Díaz-Cao, J.M., López, C.M., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2018a. *Cryptosporidium* species in post-weaned and adult sheep and goats from N.W. Spain: Public and animal health significance. Vet. Parasitol. 254, 1-5. doi:10.1016/J.VETPAR.2018.02.040

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, 256. doi:10.3390/ANI11020256

Díaz, P., Pedreira García, J., Morrondo, P., Díez-Baños, P., López, C., Panadero, R., Fernández, G., Prieto, A., Remesar, S., Díaz-Cao, J.M., López-Lorenzo, G., 2019. Servet Update: Diarrea Neonatal en Terneros. Servet, Zaragoza, España.

Díaz, P., Quílez, J., Chalmers, R.M., Panadero, R., López, C., Sánchez-Acedo, C., Morrondo, P., Díez-Baños, P., 2010. Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). Parasitology 137, 1187-1193. doi:10.1017/S0031182010000181

Díaz, P., Quílez, J., Prieto, A., Navarro, E., Pérez-Creo, A., Fernández, G., Panadero, R., López, C., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2015. *Cryptosporidium* species and subtype analysis in diarrhoeic pre-weaned lambs and goat kids from north-western Spain. Parasitol. Res. 114, 4099-4105. doi:10.1007/S00436-015-4639-0/TABLES/1

Díaz, P., Varcasia, A., Pipia, A.P., Tamponi, C., Sanna, G., Prieto, A., Ruiu, A., Spissu, P., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Scala, A., 2018b. Molecular characterisation and risk factor analysis of *Cryptosporidium* spp. in calves from Italy. Parasitol. Res. 117, 3081-3090. doi:10.1007/S00436-018-6000-X

Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre la vigilancia de las zoonosis y de los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L 325, 31.

Donahue, M., Godden, S.M., Bey, R., Wells, S., Oakes, J.M., Sreevatsan, S., Stabel, J., Fetrow, J., 2012. Heat treatment of colostrum on commercial dairy farms decreases colostrum microbial counts while maintaining colostrum immunoglobulin G concentrations. J. Dairy Sci. 95, 2697-2702. doi:10.3168/jds.2011-5220

Donaldson, S.C., Straley, B.A., Hegde, N. V., Sawant, A.A., DebRoy, C., Jayarao, B.M., 2006. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. Appl. Environ. Microbiol. 72, 3940-3948. doi:10.1128/AEM.02770-05/FORMAT/EPUB

Donnenberg, M.S., Finlay, B.B., 2013. Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: The way forward. Trends Microbiol. 21, 317-319. doi:10.1016/j.tim.2013.05.003

Donovan, G.A., Dohoo, I.R., Montgomery, D.M., Bennett, F.L., 1998. Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. Prev. Vet. Med. 34, 31-46. doi:10.1016/S0167-5877(97)00060-3

Doran, D.J., Farr, M.M., 1962. Excystation of the Poultry Coccidium, *Eimeria acervulina*. J. Protozool. 19, 154-161.

Drackley, J.K., 2008. Calf Nutrition from Birth to Breeding. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 24, 55-86. doi:10.1016/J.CVFA.2008.01.001

Dubreuil, J.D., Isaacson, R.E., Schifferli, D.M., 2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. EcoSal Plus 7, 1-47. doi:10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0006-2016

Duckmanton, L.M., Carman, S., Nagy, É., Petric, M., 1998a. Detection of bovine torovirus in fecal specimens of calves with diarrhea from Ontario

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

farms. J. Clin. Microbiol. 36, 1266-1270. doi:10.1128/JCM.36.5.1266-1270.1998

Duckmanton, L.M., Tellier, R., Liu, P., Petric, M., 1998b. Bovine torovirus: Sequencing of the structural genes and expression of the nucleocapsid protein of Breda virus. Virus Res. 58, 83-96.

Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Rebuffat, S., 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. Nat. Prod. Rep. 24, 708-734. doi:10.1039/B516237H

Durham, P.J., Johnson, R.H., Isles, H., Parker, R.J., Holroyd, R.G., Goodchild, I., 1985. Epidemiological studies of parvovirus infections in calves on endemically infected properties. Res. Vet. Sci. 38, 234-240. doi:10.1016/s0034-5288(18)31832-0

Durham, P.J.K., Farquharson, B.C., Stevenson, B.J., 1979. Rotavirus and coronavirus associated diarrohoea in calves. N. Z. Vet. J. 27, 266-272. doi:10.1080/00480169.1979.34669

Duse, A., Waller, K.P., Emanuelson, U., Unnerstad, H.E., Persson, Y., Bengtsson, B., 2015. Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. J. Dairy Sci. 98, 500-516. doi:10.3168/JDS.2014-8432

Edwards, S.A., 1982. Factors affecting the time to first suckling in dairy calves. Anim. Sci. 34, 339-346. doi:10.1017/S0003356100010291

Egyed, Z., Sréter, T., Széll, Z., Varga, I., 2003. Characterization of *Cryptosporidium* spp.—recent developments and future needs. Vet. Parasitol. 111, 103-114.

Eibl, C., Bexiga, R., Viora, L., Guyot, H., Félix, J., Wilms, J., Tichy, A., Hund, A., 2021. The antibiotic treatment of calf diarrhea in four european countries: A survey. Antibiotics 10, 910. doi:10.3390/ANTIBIOTICS10080910/S1

Elad, D., Brenner, J., Markovics, A., Yakobson, B., Shlomovitz, S., Basan, J., 1998. Yeasts in the gastrointestinal tract of preweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. Mycopathologia 141, 7-14.

Eldesoukey, I.E., Elmonir, W., Alouffi, A., Beleta, E.I.M., Kelany, M.A., Elnahriry, S.S., Alghonaim, M.I., alZeyadi, Z.A., Elaadli, H., 2022. Multidrug-Resistant Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Diarrhoeic Calves, Milk, and Workers in Dairy Farms: A Potential Public Health Risk. Antibiotics 11, 999. doi:10.3390/antibiotics11080999

Elizondo-Salazar, J.A., Jayarao, B.M., Heinrichs, A.J., 2010. Effect of heat treatment of bovine colostrum on bacterial counts, viscosity, and immunoglobulin G concentration. J. Dairy Sci. 93, 961-967. doi:10.3168/jds.2009-2388

Ellis, J.A., Hassard, L.E., Cortese, V.S., Morley, P.S., 1996. Effects of perinatal vaccination on humoral and cellular immune responses in cows and young calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 208, 393-400.

Elmendorf, H.G., Dawson, S.C., McCaffery, J.M., 2003. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. Int. J. Parasitol. 33, 3-28. doi:10.1016/S0

Enemark, H.L., Dahl, J., Enemark, J.M.D., 2015. Significance of Timing on Effect of Metaphylactic Toltrazuril Treatment against Eimeriosis in Calves. Parasitol. Res. 114, 201-212. doi:10.1007/s00436-015-4526-8

Engelen, F., Thiry, D., Devleesschauwer, B., Heyndrickx, M., Mainil, J., De Zutter, L., Cox, E., 2021. Pathogenic potential of *Escherichia coli* O157 and O26 isolated from young Belgian dairy calves by recto-anal mucosal swab culturing. J. Appl. Microbiol. 131, 964-972. doi:10.1111/JAM.14909

Enjalbert, F., Lebreton, P., Salat, O., 2006. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 90, 459-466. doi:10.1111/j.1439-0396.2006.00627.x

Epe, C., Von Samson-Himmelstjerna, G., Wirtherle, N., Von Der Heyden, V., Welz, C., Beening, J., Radeloff, I., Hellmann, K., Schnieder, T., Krieger, K., 2005. Efficacy of toltrazuril as a metaphylactic and therapeutic treatment of coccidiosis in first-year grazing calves. Parasitol. Res. 97, S127. doi:10.1007/s00436-005-1456-x

Estes, M.K., Cohen, J., 1989. Rotavirus gene structure and function. Microbiol. Rev. 53, 410-449.

Estes, M.K., Greenberg, H.B., 2013. Rotaviruses, en: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania, pp. 1347-1401.

Etcheverría, A.I., Padola, N.L., 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Virulence 4, 366-372. doi:10.4161/VIRU.24642

Ewaschuk, J.B., Naylor, J.M., Chirino-Trejo, M., Zello, G.A., 2004. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

is a potential probiotic for calves. Can. J. Vet. Res. 68, 249-253.

Faber, J.E., Kollmann, D., Heise, A., Bauer, C., Failing, K., Bürger, H.J., Zahner, H., 2002. *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: Oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. Vet. Parasitol. 104, 1-17. doi:10.1016/S0304-4017(01)00610-0

Faber, S.N., Faber, N.E., Mccauley, T.C., Ax, R.L., 2005. Case Study: Effects Of Colostrum Ingestion on Lactational Performance. Prof. Anim. Sci. 21, 420-425. doi:10.15232/S1080-7446(15)31240-7

Fagan, J., Dwyer, P.J., Quinlan, J.F., 1994. The diagnosis and occurrence of enteropathogens associated with calf diarrhea in Ireland. Ir. Vet. J. 47, 313-318.

Fagerland, J.A., Pohlenz, J.F.L., Woode, G.N., 1986. A morphological study of the replication of Breda virus (proposed family Toroviridae) in bovine intestinal cells. J. Gen. Virol. 67, 1293-1304. doi:10.1099/0022-1317-67-7-1293

Fantinatti, M., Bello, A.R., Fernandes, O., Da-Cruz, A.M., 2016. Identification of *Giardia lamblia* Assemblage E in Humans Points to a New Anthropozoonotic Cycle. J. Infect. Dis. 214, 1256-1259. doi:10.1093/INFDIS/JIW361

Fayer, R., 2008. General Biology, en: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU., pp. 1-42.

Fayer, R., Ellis, W., 1993. Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. J. Parasitol. 79, 771-774. doi:10.2307/3283619

Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., Zarlenga, D., 1998a. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. Int. J. Parasitol. 28, 49-56.

Fayer, R., Santín, M., Macarisin, D., 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. Vet. Parasitol. 172, 23-32. doi:10.1016/j.vetpar.2010.04.028

Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (Bos taurus). Vet. Parasitol. 156, 191-198. doi:10.1016/j.vetpar.2008.05.024

Fayer, R., Santin, M., Xiao, L., 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) in cattle (Bos taurus). J. Parasitol. 91, 624-629. doi:10.1645/GE-3435

Fayer, R., Trout, J.M., Graczyk, T.K., Lewis, E.J., 2000. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. Vet. Parasitol. 93, 103-112. doi:10.1016/S0304-4017(00)00356-3

Fayer, R., Trout, J.M., Jenkins, M.C., 1998b. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Stored in Water at Environmental Temperatures. J. Parasitol. 84, 1165-1169. doi:10.2307/3284666

Fecteau, G., Van Metre, D.C., Paré, J., Smith, B.P., Higgins, R., Holmberg, C.A., Jang, S., Guterbock, W., 1997. Bacteriological culture of blood from critically ill neonatal calves. Can. Vet. J. 38, 95-100.

Feng, Y., Gong, X., Zhu, K., Li, N., Yu, Z., Guo, Y., Weng, Y., Kváč, M., Feng, Y., Xiao, L., 2019. Prevalence and genotypic identification of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in pre-weaned dairy calves in Guangdong, China. Parasites and Vectors 12, 1-9. doi:10.1186/S13071-019-3310-5

Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V., Xiao, L., 2007. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. Vet. Parasitol. 144, 1-9. doi:10.1016/J.VETPAR.2006.10.001

Feng, Y., Xiao, L., 2012. *Giardia*, en: Liu, D. (Ed.), Molecular detection of human parasitic pathogens. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU., pp. 77-90.

Feng, Y., Xiao, L., 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. 24, 110-140. doi:10.1128/CMR.00033-10

Feuerstein, A., Scuda, N., Klose, C., Hoffmann, A., Melchner, A., Boll, K., Rettinger, A., Fell, S., Straubinger, R.K., Riehm, J.M., 2022. Antimicrobial resistance, serologic and molecular characterization of *E. coli* isolated from calves with severe or fatal enteritis in Bavaria, Germany. Antibiotics 11, 23. doi:10.3390/antibiotics11010023

Follet, J., Guyot, K., Leruste, H., Follet-Dumoulin, A., Hammouma-Ghelboun, O., Certad, G., Dei-Cas, E., Halama, P., 2011. *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: Molecular characterization of species in a longitudinal study.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Vet. Res. 42, 1-8. doi:10.1186/1297-9716-42-116

Fossler, C.P., Wells, S.J., Kaneene, J.B., Ruegg, P.L., Warnick, L.D., Bender, J.B., Eberly, L.E., Godden, S.M., Halbert, L.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. doi:10.1016/J.PREVETMED.2005.04.002

Foster, D.M., Smith, G.W., 2009. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 25, 13-36. doi:10.1016/j.cvfa.2008.10.013

Foster, N., Berndt, A., 2013. Immunity to *Salmonella* in farm animals and murine models of disease., en: Barrow, P., Methner, U. (Eds.), *Salmonella* in domestic animals. CAB International, Wallingford, Reino Unido, pp. 136-161. doi:10.1079/9781845939021.0136

Fox, J., Weisberg, S., 2019. An R Companion to Applied Regression, 3rd ed. SAGE Publications.

Francis, D.H., Allen, S.D., White, R.D., 1989. Influence of bovine intestinal fluid on the expression of K99 pili by *Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res. 50, 822-826.

Franck, S.M., Bosworth, B.T., Moon, H.W., 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. J. Clin. Microbiol. 36, 1795-1797. doi:10.1128/JCM.36.6.1795-1797.1998

Frank, N.A., Kaneene, J.B., 1993. Management Risk Factors Associated with Calf Diarrhea in Michigan Dairy Herds. J. Dairy Sci. 76, 1313-1323. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77462-7

Franzén, O., Jerlström-Hultqvist, J., Castro, E., Sherwood, E., Ankarklev, J., Reiner, D.S., Palm, D., Andersson, J.O., Andersson, B., Svärd, S.G., 2009. Draft Genome Sequencing of *Giardia intestinalis* Assemblage B Isolate GS: Is Human Giardiasis Caused by Two Different Species? PLOS Pathog. 5, e1000560. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1000560

Friend, S.C.E., Stockdale, P.H.G., 1980. Experimental *Eimeria bovis* infection in calves: A histopathological study. Can. J. Comp. Med. 44, 129-140.

Fritzen, J.T.T., Oliveira, M. V., Lorenzetti, E., Miyabe, F.M., Viziack, M.P., Rodrigues, C.A., Ayres, H., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2019. Longitudinal surveillance of rotavirus A genotypes circulating in a high milk yield dairy cattle herd after the introduction of a rotavirus vaccine. Vet. Microbiol. 230, 260-264. doi:10.1016/J.VETMIC.2019.02.022

Fujino, T., Matsui, T., Kobayashi, F., Haruki, K., Yoshino, Y., Kajima, J., Tsuji, M., 2002. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. J. Vet. Med. Sci. 64, 199-200. doi:Doi 10.1292/Jvms.64.199

Furman-Fratczak, K., Rzasa, A., Stefaniak, T., 2011. The influence of colostral immunoglobulin concentration in heifer calves' serum on their health and growth. J. Dairy Sci. 94, 5536-5543. doi:10.3168/jds.2010-3253

García-Meniño, I., Díaz, P., Gómez, V., Prieto, A., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Mora, A., 2015. Estudio de prevalencia de enteropatógenos implicados en la diarrea del ternero en Galicia. Boletín de ANEMBE 108, 33-37.

García-Presedo, I., Pedraza-Díaz, S., González-Warleta, M., Mezo, M., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Castro-Hermida, J.A., 2013. Presence of *Cryptosporidium scrofarum*, *C. suis* and *C. parvum* subtypes IIaA16G2R1 and IIaA13G1R1 in Eurasian wild boars (Sus scrofa). Vet. Parasitol. 196, 497-502. doi:10.1016/J.VETPAR.2013.04.017

Garcia-R, J.C., Ogbuigwe, P., Pita, A.B., Velathanthiri, N., Knox, M.A., Biggs, P.J., French, N.P., Hayman, D.T.S., 2021. First report of novel assemblages and mixed infections of *Giardia duodenalis* in human isolates from New Zealand. Acta Trop. 220, 105969. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2021.105969

García, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Orden, J.A., Cid, D., Sanz, R., Gómez-Bautista, M., De La Fuente, R., 2000. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 23, 175-183. doi:10.1016/S0147-9571(99)00071-5

Garro, C.J., Morici, G.E., Tomazic, M.L., Vilte, D., Encinas, M., Vega, C., Bok, M., Parreño, V., Schnittger, L., 2021. Occurrence of *Cryptosporidium* and other enteropathogens and their association with diarrhea in dairy calves of Buenos Aires province, Argentina. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports 24, 100567. doi:10.1016/j.vprsr.2021.100567

Garthwaite, B.D., Drackley, J.K., McCoy, G.C., Jaster, E.H., 1994. Whole Milk and Oral Rehydration Solution for Calves with Diarrhea of Spontaneous

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Origin. J. Dairy Sci. 77, 835-843. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77018-1

Gelsinger, S.L., Gray, S.M., Jones, C.M., Heinrichs, A.J., 2014. Heat treatment of colostrum increases immunoglobulin G absorption efficiency in high-, medium-, and low-quality colostrum. J. Dairy Sci. 97, 2355-2360. doi:10.3168/jds.2013-7374

Geurden, T., Berkvens, D., Martens, C., Casaert, S., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2007. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. Parasitology 134, 1981-1987. doi:10.1017/S0031182007003460

Geurden, T., Claerebout, E., Dursin, L., Deflandre, A., Bernay, F., Kaltsatos, V., Vercruysse, J., 2006a. The efficacy of an oral treatment with paromomycin against an experimental infection with *Giardia* in calves. Vet. Parasitol. 135, 241-247. doi:10.1016/j.vetpar.2005.09.006

Geurden, T., Olson, M.E., 2011. *Giardia* in Pets and Farm Animals, and Their Zoonotic Potential, en: Luján, H.D., Svärd, S. (Eds.), *Giardia*: A Model Organism. Springer-Verlag, Viena, Austria, pp. 71-92.

Geurden, T., Vandenhoute, E., Pohle, H., Casaert, S., De Wilde, N., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2010a. The effect of a fenbendazole treatment on cyst excretion and weight gain in calves experimentally infected with *Giardia duodenalis*. Vet. Parasitol. 169, 18-23. doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.027

Geurden, T., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2010b. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? Exp. Parasitol. 124, 98-106. doi:10.1016/J.EXPPARA.2009.03.001

Geurden, T., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2006b. Field testing of a fenbendazole treatment combined with hygienic and management measures against a natural *Giardia* infection in calves. Vet. Parasitol. 142, 367-371. doi:10.1016/j.vetpar.2006.07.019

Ghanem, M.M., Radwaan, M.E., Moustafa, A.M.M., Ebeid, M.H., 2008. Comparative therapeutic effect of toltrazuril, sulphadimidine and amprolium on *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* given at different times following infection in buffalo calves (*Bubalus bubalis*). Prev. Vet. Med. 84, 161-170. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.12.013

Giannella, R.A., Mann, E.A., 2003. *E. coli* heat-stable enterotoxin and guanylyl cyclase C: new functions and unsuspected actions. Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc. 114, 67-85; discussion 85-6.

Gillhuber, J., Rügamer, D., Pfister, K., Scheuerle, M.C., 2014. Giardiosis and other enteropathogenic infections: A study on diarrhoeic calves in Southern Germany. BMC Res. Notes 7, 1-9. doi:10.1186/1756-0500-7-112

Girard, F., Dziva, F., Stevens, M.P., Frankelt, G., 2009. Interactions of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains with the calf intestinal mucosa ex vivo. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5991-5995. doi:10.1128/AEM.01170-09

Girardeau, J.P., Der Vartanian, M., Ollier, J.L., Contrepois, M., 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. Infect. Immun. 56, 2180-2188.

Glombowsky, P., da Silva, A.S., Volpato, A., Soldá, N.M., Campigotto, G., Galli, G.M., Fávero, J.F., da Silva Santos, D., Machado, G., 2017. Relation between diarrhea and infection by protozoans in dairy calves. Comp. Clin. Path. 26, 929-933. doi:10.1007/s00580-017-2467-6

Godden, S.M., 2008. Colostrum Management for Dairy Calves. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. doi:10.1016/j.cvfa.2007.10.005

Godden, S.M., Haines, D.M., Hagman, D., 2009. Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. I: dose effect of feeding a commercial colostrum replacer. J. Dairy Sci. 92, 1750-1757. doi:10.3168/JDS.2008-1846

Godden, S.M., Smith, S., Feirtag, J.M., Green, L.R., Wells, S.J., Fetrow, J.P., 2003. Effect of On-Farm Commercial Batch Pasteurization of Colostrum on Colostrum and Serum Immunoglobulin Concentrations in Dairy Calves. J. Dairy Sci. 86, 1503-1512. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(03)73736-9

Godden, S.M., Smolenski, D.J., Donahue, M., Oakes, J.M., Bey, R., Wells, S., Sreevatsan, S., Stabel, J., Fetrow, J., 2012. Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness. J. Dairy Sci. 95, 4029-4040. doi:10.3168/jds.2011-5275

Göhring, F., Lendner, M., Daugschies, A., 2022. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subgenotypes in pre-weaned calves in Germany. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports 36, 100806. doi:10.1016/J.VPRSR.2022.100806

Göhring, F., Möller-Holtkamp, P., Daugschies, A., Lendner, M., 2014. Co-infections with *Cryptosporidium parvum* and other enteropathogenes support the occurrence and severity of diarrhoea in suckling calves. Tierarztl. Umsch. 69, 112-120.

Gomes Rocha, T., Dornelas, F., Silva, F., Gregori, F., Amauri, &, Alfieri, A., Da, M., Buzinaro, G., Fagliari, J.J., 2017. Longitudinal study of bovine rotavirus group A in newborn calves from vaccinated and unvaccinated dairy herds. Trop. Anim. Health Prod. 49, 783-790. doi:10.1007/s11250-017-1263-2

Gomez, D.E., Arroyo, L.G., Poljak, Z., Viel, L., Weese, J.S., 2017. Detection of Bovine Coronavirus in Healthy and Diarrheic Dairy Calves. J. Vet. Intern. Med. 31, 1884-1891. doi:10.1111/jvim.14811

Gomez, D.E., Weese, J.S., 2017. Viral enteritis in calves. Can. Vet. J. 58, 1267-1274.

Gonggrijp, M.A., Santman-Berends, I.M.G.A., Heuvelink, A.E., Buter, G.J., van Schaik, G., Hage, J.J., Lam, T.J.G.M., 2016. Prevalence and risk factors for extended-spectrum β-lactamase- and AmpC-producing *Escherichia coli* in dairy farms. J. Dairy Sci. 99, 9001-9013. doi:10.3168/JDS.2016-11134

González, J.M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., 2003. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. Arch. Virol.

González, J.V., Astiz, S., 2005. Diarreas en el ternero neonato. Servet, Zaragoza, España.

Gonzalez, R., Elvira, L., Carbonell, C., Vertenten, G., Fraile, L., 2021. The specific immune response after vaccination against neonatal calf diarrhoea differs between apparent similar vaccines in a case study. Animals 11, 1238. doi:10.3390/ani11051238

Goossens, E., Valgaeren, B.R., Pardon, B., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Deprez, P.R., Van Immerseel, F., 2017. Rethinking the role of alpha toxin in *Clostridium perfringens*-associated enteric diseases: a review on bovine necro-haemorrhagic enteritis. Vet. Res. 48, 9. doi:10.1186/s13567-017-0413-x

Gow, S., Waldner, C., 2006. An examination of the prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves from western Canadian cow-calf herds. Vet. Parasitol. 137, 50-61. doi:10.1016/j.vetpar.2005.05.071

Graczyk, T.K., Fayer, R., Knight, R., Mhangami-Ruwende, B., Trout, J.M., Da Silva, A.J., Pieniazek, N.J., 2000. Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 63, 178-183. doi:10.4269/ajtmh.2000.63.178

Graham, D.Y., Sackman, J.W., Estes, M.K., 1984. Pathogenesis of rotavirus-induced diarrhea - Preliminary studies in miniature swine piglet. Dig. Dis. Sci. 29, 1028-1035. doi:10.1007/BF01311255

Green, K.Y., 2013. Caliciviridae: The Noroviruses, en: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania, EE.UU., pp. 582-608.

Griffith, D.M., Veech, J.A., Marsh, C.J., 2016. Cooccur: Probabilistic species co-occurrence analysis in R. J. Stat. Softw. 69, 1-17. doi:10.18637/jss.v069.c02

Grimont, P.A.D., Weill, F.-X., 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. doi:10.1038/nature12153

Grinberg, A., Lopez-Villalobos, N., Markovics, A., Kosak, A., Galindez, J., Tranquillo, V.M., 2002. Controlling the onset of natural cryptosporidiosis in calves with paromomycin sulphate. Vet. Rec. 151, 606-608. doi:10.1136/vr.151.20.606

Grove-White, D.H., 2004. A rational approach to treatment of calf diarrhoea. Ir. Vet. J. 57, 722-728.

Güler, L., Gündüz, K., Ok, Ü., 2008. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. Zoonoses Public Health 55, 249-257. doi:10.1111/J.1863-2378.2008.01121.X

Gulliksen, S.M., Jor, E., Lie, K.I., Hamnes, I.S., Løken, T., Åkerstedt, J., Østerås, O., 2009. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. J. Dairy Sci. 92, 5057-5066.

Gulliksen, S.M., Lie, K.I., Sølverød, L., Østerås, O., 2008. Risk Factors Associated with Colostrum Quality in Norwegian Dairy Cows. J. Dairy Sci. 91, 704-712. doi:10.3168/JDS.2007-0450

Gunn, G.J., Hall, M., Low, J.C., 2003. Comparison of antibiotic resistance for *Escherichia coli* populations isolated from groups of diarrhoeic and control valves. Vet. J. 165, 172-174.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

doi:10.1016/S1090-0233(02)00244-7

Guo, Z., He, Q., Zhang, B., Yue, H., Tang, C., 2019. Detection and molecular characteristics of neboviruses in dairy cows in China. J. Gen. Virol. 100, 35-45. doi:10.1099/JGV.0.001172

Gutiérrez-Escolano, A.L., 2014. Host-cell factors involved in the calicivirus replicative cycle. Future Virol. 9, 147-160.

Gyles, C.L., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J. Anim. Sci. 85, E45-E62. doi:10.2527/jas.2006-508

Gyles, C.L., Fairbrother, J.M., 2010. *Escherichia coli*, en: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, G., Thoen, C.O. (Eds.), Pathogenesis of bacterial infections in animals. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, EE.UU., pp. 267-308.

Habets, A., Engelen, F., Duprez, J.N., Devleesschauwer, B., Heyndrickx, M., De Zutter, L., Thiry, D., Cox, E., Mainil, J., 2020. Identification of Shigatoxigenic and Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes in Healthy Young Dairy Calves in Belgium by Recto-Anal Mucosal Swabbing. Vet. Sci. 7, 167. doi:10.3390/VETSCI7040167

Hackstein, J.H.P., Mackenstedt, U., Mehlhorn, H., Meijerink, J.P.P., Schubert, H., Leunissen, J.A.M., 1995. Parasitic apicomplexans harbor a chlorophyll a-D1 complex, the potential target for therapeutic triazines. Parasitol. Res. 81, 207-216. doi:10.1007/BF00937111

Hailu, A.W., Degarege, A., Adamu, H., Costa, D., Villier, V., Mouhajir, A., Favennec, L., Razakandrainibe, R., Petros, B., 2021. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from humans in Ethiopia. PLoS One 16, e0253186. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0253186

Halaihel, N., Liévin, V., Ball, J.M., Estes, M.K., Alvarado, F., Vasseur, M., 2000. Direct Inhibitory Effect of Rotavirus NSP4(114-135) Peptide on the Na+-Glucose Symporter of Rabbit Intestinal Brush Border Membrane. J. Virol. 74, 9464-9470. doi:10.1128/JVI.74.20.9464-9470.2000

Hall, G.A., 1987. Comparative pathology of infection by novel diarrhoea viruses, en: Novel Diarrhoea Viruses. Ciba Foundation symposium Nº 128. John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido, pp. 192-217. doi:10.1136/jcp.40.12.1490-b

Hall, G.A., Reynolds, D.J., Parsons, K.R., Bland, A.P., Morgan, J.H., 1988. Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. Res. Vet. Sci. 45, 240-250. doi:10.1016/S0034-5288(18)30939-1

Hamid, P.H., Hirzmann, J., Kerner, K., Gimpl, G., Lochnit, G., Hermosilla, C.R., Taubert, A., 2015. *Eimeria bovis* infection modulates endothelial host cell cholesterol metabolism for successful replication. Vet. Res. 46, 100-117. doi:10.1186/s13567-015-0230-z

Hammer, C.J., Quigley, J.D., Ribeiro, L., Tyler, H.D., 2004. Characterization of a colostrum replacer and a colostrum supplement containing IgG concentrate and growth factors. J. Dairy Sci. 87, 106-111. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73147-1

Hariharan, H., Coles, M., Poole, D., Page, R., 2004. Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves from piglets and calves with diarrhea. Can. Vet. J. 45, 605.

Harp, J.A., Jardon, P., Atwill, E.R., Zylstra, M., Checel, S., Goff, J.P., De Simone, C., 1996. Field testing of prophylactic measures against *Cryptosporidium parvum* infection in calves in a California dairy herd. Am. J. Vet. Res. 57, 1586-1588.

Haschek, B., Klein, D., Benetka, V., Herrera, C., Sommerfeld-Stur, I., Vilcek, Š., Moestl, K., Baumgartner, W., 2006. Detection of bovine torovirus in neonatal calf diarrhoea in Lower Austria and Styria (Austria). J. Vet. Med. Ser. B Infect. Dis. Vet. Public Heal. 53, 160-165. doi:10.1111/J.1439-0450.2006.00936.X

Hasoksuz, M., Sreevatsan, S., Cho, K., Hoet, A.E., Saif, L.J., 2002. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. Virus Res. 84, 101-109.

Hassine-Zaafrane, M., Kaplon, J., Sdiri-Loulizi, K., Aouni, Z., Pothier, P., Aouni, M., Ambert-Balay, K., 2012. Molecular prevalence of bovine noroviruses and neboviruses detected in central-eastern Tunisia. Arch. Virol. 157, 1599-1604. doi:10.1007/S00705-012-1344-5

Hatalová, E., Valenčáková, A., Luptáková, L., Špalková, M., Kalinová, J., Halánová, M., Bednárová, V., Gabzdilová, J., Dedinská, K., Ondriska, F., Boldiš, V., 2019. The first report of animal genotypes of *Cryptosporidium parvum* in immunosuppressed and immunocompetent humans in Slovakia. Transbound. Emerg. Dis. 66, 243-249. doi:10.1111/TBED.13009

Hawkins, A., Burdine, K., Amaral-Phillips, D., Costa, J.H.C., 2019. An economic analysis of the costs associated with pre-weaning management strategies for dairy heifers. Animals 9, 471.

doi:10.3390/ani9070471

Heine, J., 1982. Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot [A simple technique for the demonstration of cryptosporidia in feces]. Zentralblatt fur Vet. R. B. 29, 324-327.

Heinrichs, A.J., Radostits, O.M., 2001. Health and Production Management of Dairy Calves and Replacement Heifers, en: Radostits, O.M. (Ed.), Herd health: Food Animal Production Medicine. Saunders, Filadelfia, Pensilvania, EE.UU., pp. 333-473.

Heller, M.C., Chigerwe, M., 2018. Diagnosis and Treatment of Infectious Enteritis in Neonatal and Juvenile Ruminants. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 34, 101-117. doi:10.1016/j.cvfa.2017.08.001

Hendrix, C.M., Robinson, E., 2022. Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians, 6ª. ed. Mosby Inc., St. Louis, Misuri, EE.UU.

Henriksen, S.A., Pohlenz, J.F., 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet. Scand. 22, 594-596.

Hodnik, J.J., Acinger-Rogić, Ž., Alishani, M., Autio, T., Balseiro, A., Berezowski, J., Carmo, L.P., Chaligiannis, I., Conrady, B., Costa, L., Cvetkovikj, I., Davidov, I., Dispas, M., Djadjovski, I., Duarte, E.L., Faverjon, C., Fourichon, C., Frössling, J., Gerilovych, A., Gethmann, J., Gomes, J., Graham, D., Guelbenzu, M., Gunn, G.J., Henry, M.K., Hopp, P., Houe, H., Irimia, E., Ježek, J., Juste, R.A., Kalaitzakis, E., Kaler, J., Kaplan, S., Kostoulas, P., Kovalenko, K., Kneževič, N., Knific, T., Koleci, X., Madouasse, A., Malakauskas, A., Mandelik, R., Meletis, E., Mincu, M., Mõtus, K., Muñoz-Gómez, V., Niculae, M., Nikitović, J., Ocepek, M., Tangen-Opsal, M., Ózsvári, L., Papadopoulos, D., Papadopoulos, T., Pelkonen, S., Polak, M.P., Pozzato, N., Rapaliuté, E., Ribbens, S., Niza-Ribeiro, J., Roch, F.F., Rosenbaum Nielsen, L., Saez, J.L., Nielsen, S.S., van Schaik, G., Schwan, E., Sekovska, B., Starič, J., Strain, S., Šatran, P., Šerić-Haračić, S., Tamminen, L.M., Thulke, H.H., Toplak, I., Tuunainen, E., Verner, S., Vilček, Š., Yildiz, R., Santman-Berends, I.M.G.A., 2021. Overview of Cattle Diseases Listed Under Category C, D or E in the Animal Health Law for Which Control Programmes Are in Place Within Europe. Front. Vet. Sci. 8, 688078. doi:10.3389/fvets.2021.688078

Hoet, A.E., Cho, K.O., Chang, K.O., Loerch, S.C., Wittum, T.E., Saif, L.J., 2002. Enteric and nasal shedding of bovine torovirus (Breda virus) in feedlot cattle. Am. J. Vet. Res. 63, 342-348. doi:10.2460/AJVR.2002.63.342

Hoet, A.E., Nielsen, P.R., Hasoksuz, M., Thomas, C., Wittum, T.E., Saif, L.J., 2003a. Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle. J. Vet. Diagnostic Investig. 15, 205-212. doi:10.1177/104063870301500301

Hoet, A.E., Saif, L.J., 2004. Bovine torovirus (Breda virus) revisited. Anim. Heal. Res. Rev. 5, 157-171.

Hoet, A.E., Smiley, J., Thomas, C., Nielsen, P.R., Wittum, T.E., Saif, L.J., 2003b. Association of enteric shedding of bovine torovirus (Breda virus) and other enteropathogens with diarrhea in veal calves. Am. J. Vet. Res. 64, 485-490. doi:10.2460/AJVR.2003.64.485

Hoey, D.E.E., Currie, C., Roderick, W.E., Nutikka, A., Lingwood, C.A., Gally, D.L., Smith, D.G.E., 2002. Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. J. Med. Microbiol. 51, 143-149. doi:10.1099/0022-1317-51-2-143

Hoey, D.E.E., Sharp, L., Currie, C., Lingwood, C.A., Gally, D.L., Smith, D.G.E., 2003. Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. Cell. Microbiol. 5, 85-97.

Holland, R.E., 1990. Some Infectious Causes of Diarrhea in Young Farm Animals. Clin. Microbiol. Rev. 3, 345-375.

Holland, R.E., Bezek, D.M., Sprecher, D.J., Patterson, J.S., Steficek, B.A., Trapp, A.L., 1993. Investigation of an epizootic of bovine viral diarrhea virus infection in calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 202, 1849–1854.

Holland, R.E., Herdt, T.H., Refsal, K.R., 1986. Breath hydrogen concentration and small intestinal malabsorption in calves. Am. J. Vet. Res. 47, 2020-2024.

Holschbach, C.L., Peek, S.F., 2018. *Salmonella* in Dairy Cattle. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. doi:10.1016/j.cvfa.2017.10.005

Holzhausen, I., Lendner, M., Göhring, F., Steinhöfel, I., Daugschies, A., 2019. Distribution of *Cryptosporidium parvum gp60* subtypes in calf herds of Saxony, Germany. Parasitol. Res. 118, 1549-1558. doi:10.1007/s00436-019-06266-1

Homem, C.G., Nakamura, A.A., Silva, D.C., Teixeira, W.F.P., Coelho, W.M.D., Meireles, M. V., 2012.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf fecal samples. Parasitol. Res. 110, 1741-1745. doi:10.1007/S00436-011-2694-8/TABLES/3

Homerosky, E.R., Caulkett, N.A., Timsit, E., Pajor, E.A., Kastelic, J.P., Windeyer, M.C., 2017. Clinical indicators of blood gas disturbances, elevated L-lactate concentration and other abnormal blood parameters in newborn beef calves. Vet. J. 219, 49-57. doi:10.1016/J.TVJL.2016.12.001

Hooper, D.C., Jacoby, G.A., 2015. Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1354, 12-31. doi:10.1111/NYAS.12830

Hooshmand-Rad, P., Svensson, C., Uggla, A., 1994. Experimental *Eimeria alabamensis* infection in calves. Vet. Parasitol. 53, 23-32. doi:10.1016/0304-4017(94)90013-2

Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J., 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. Int. J. Antimicrob. Agents 25, 358-373. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2005.02.006

Horzinek, M.C., Weiss, M., 1984. Toroviridae: a taxonomic proposal. Zentralblatt für Veterinärmedizin R. B 31, 649-659.

Horzinek, M.C., Weiss, M., Ederveen, J., 1987. Toroviridae: a proposed new family of enveloped RNA viruses., en: Brock, G.R., Whelan, J. (Eds.), Novel Diarrhoea Viruses. Ciba Foundation symposium Nº 128. John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido, pp. 162-174.

House, J.K., Smith, G.W., McGuirk, S.M., Gunn, A.A., Izzo, M., 2015. Manifestations and Management of Disease in Neonatal Ruminants, en: Smith, B.P. (Ed.), Large Animal Internal Medicine. Elsevier Inc., St. Louis, Misuri, EE.UU., pp. 302-338.

Hrala, M., Bosák, J., Micenková, L., Křenová, J., Lexa, M., Pirková, V., Tomáštíková, Z., Koláčková, I., Šmajs, D., 2021. *Escherichia coli* Strains Producing Selected Bacteriocins Inhibit Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) under both In Vitro and In Vivo Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 87. doi:10.1128/AEM.03121-20

Huang, D.B., White, A.C., 2006. An Updated Review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. Gastroenterol. Clin. North Am. 35, 291-314. doi:10.1016/j.gtc.2006.03.006

Hublin, J.S.Y., Maloney, J.G., George, N.S., Molokin, A., Lombard, J.E., Urie, N.J., Shivley, C.B., Santin, M., 2022. Enhanced detection of *Giardia duodenalis* mixed assemblage infections in pre-weaned dairy calves using next generation sequencing. Vet. Parasitol. 304, 109702. doi:10.1016/j.vetpar.2022.109702

Huetink, R.E.C., Van der Giessen, J.W.B., Noordhuizen, J.P.T.M., Ploeger, H.W., 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. Vet. Parasitol. 102, 53-67. doi:10.1016/S0304-4017(01)00514-3

Hulbert, L.E., Moisá, S.J., 2016. Stress, immunity, and the management of calves. J. Dairy Sci. 99, 3199-3216. doi:10.3168/JDS.2015-10198

Hur, T.-Y., Jung, Y.-H., Choe, C.-Y., Cho, Y.-I., Kang, S.-J., Lee, H.-J., Ki, K.-S., Baek, K.-S., Suh, G.-H., 2013. The dairy calf mortality: the causes of calf death during ten years at a large dairy farm in Korea. Korean J. Vet. Res. 53, 103-108.

Imre, K., Lobo, L.M., Matos, O., Popescu, C., Genchi, C., Dărăbuş, G., 2011. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in Romania: Is there an actual risk of zoonotic infections? Vet. Parasitol. 181, 321-324. doi:10.1016/J.VETPAR.2011.04.042

Instituto Galego de Estatística, 2020a. Contas económicas anuais 2019.

Instituto Galego de Estatística, 2020b. Número de explotacións segundo a tipoloxía. Galicia e provincias. Ano 2019.

Instituto Nacional de Estadística, 2020. Contabilidad nacional trimestral de España.

Iqbal, A., Lim, Y.A.L., Surin, J., Sim, B.L.H., 2012. High Diversity of *Cryptosporidium* Subgenotypes Identified in Malaysian HIV/AIDS Individuals Targeting gp60 Gene. PLoS One 7, e31139. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0031139

Isegawa, Y., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Ishida, S., Uesugi, S., Ueda, S., 1993. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes 7, 277-284. doi:10.1006/MCPR.1993.1041

Iwashita, H., Sugamoto, T., Takemura, T., Tokizawa, A., Vu, T.D., Nguyen, T.H., Pham, T.D., Tran, N.L., Doan, H.T., Pham, A.H.Q., Yamashiro, T., 2021. Molecular epidemiology of *Giardia* spp. in northern Vietnam: Potential transmission between animals and humans. Parasite Epidemiol. Control 12, e00193. doi:10.1016/J.PAREPI.2020.E00193

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Izzo, M.M., Gunn, A.A., House, J.K., 2015. Neonatal diarrhea, en: Smith, B.P. (Ed.), Large Animal Internal Medicine. Mosby Inc., St. Louis, Misuri, EE.UU., pp. 314-335.

Izzo, M.M., Kirkland, P.D., Mohler, V.L., Perkins, N.R., Gunn, A.A., House, J.K., 2011. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. Aust. Vet. J. 89, 167-173. doi:10.1111/j.1751-0813.2011.00692.x

James, R.E., Polan, C.E., Cummins, K.A., 1981. Influence of Administered Indigenous Microorganisms on Uptake of [Iodine-125] γ-Globulin In Vivo by Intestinal Segments of Neonatal Calves. J. Dairy Sci. 64, 52-61. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(81)82528-3

Jang, D.H., Cho, H.C., Shin, S.U., Kim, E.M., Park, Y.J., Hwang, S., Park, J., Choi, K.S., 2021. Prevalence and distribution pattern of *Cryptosporidium* spp. among pre-weaned diarrheic calves in the Republic of Korea. PLoS One 16, e0259824. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0259824

Jarrige, N., Cazeau, G., Bosquet, G., Bastien, J., Benoit, F., Gay, E., 2020. Effects of antimicrobial exposure on the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in the digestive flora of dairy calves. Prev. Vet. Med. 185, 105177. doi:10.1016/j.prevetmed.2020.105177

Jarvie, B.D., Trotz-Williams, L.A., McKnight, D.R., Leslie, K.E., Wallace, M.M., Todd, C.G., Sharpe, P.H., Peregrine, A.S., 2005. Effect of halofuginone lactate on the occurrence of *Cryptosporidium parvum* and growth of neonatal dairy calves. J. Dairy Sci. 88, 1801-1806. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72854-X

Jeníková, M., Němejc, K., Sak, B., Květoňová, D., Kváč, M., 2011. New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. Vet. Parasitol. 176, 120-125. doi:10.1016/J.VETPAR.2010.11.010

Jenkins, M.B., Eaglesham, B.S., Anthony, L.C., Kachlany, S.C., Bowman, D.D., Ghiorse, W.C., 2010. Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1926-1934. doi:10.1128/AEM.02295-09

Jerlström-Hultqvist, J., Franzén, O., Ankarklev, J., Xu, F., Nohýnková, E., Andersson, J.O., Svärd, S.G., Andersson, B., 2010. Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. BMC Genomics 11, 1-15. doi:10.1186/1471-2164-11-543/FIGURES/5

Jia, Y., Mao, W., Liu, B., Zhang, S., Cao, J., Xu, X., 2022. Study on the drug resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* isolated from calf diarrhea and the distribution of virulence genes and antimicrobial resistance genes. Front. Microbiol. 13, 1-10. doi:10.3389/fmicb.2022.992111

Jiang, J., Alderisio, K.A., Singh, A., Xiao, L., 2005. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. Appl. Environ. Microbiol. 71, 1135-1141. doi:10.1128/AEM.71.3.1135-1141.2005

Joachim, A., Altreuther, G., Bangoura, B., Charles, S., Daugschies, A., Hinney, B., Lindsay, D.S., Mundt, H.C., Ocak, M., Sotiraki, S., 2018. WAAVP guideline for evaluating the efficacy of anticoccidials in mammals (pigs, dogs, cattle, sheep). Vet. Parasitol. 253, 102-119. doi:10.1016/J.VETPAR.2018.02.029

Joachim, A., Krull, T., Schwarzkopf, J., Daugschies, A., 2003. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. Vet. Parasitol. 112, 277-288. doi:10.1016/S0304-4017(03)00006-2

Johnson, J.L., Godden, S.M., Molitor, T., Ames, T., Hagman, D., 2007. Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. J. Dairy Sci. 90, 5189-5198. doi:10.3168/jds.2007-0219

Johnson, K.F., Chancellor, N., Burn, C.C., Wathes, D.C., 2017. Prospective cohort study to assess rates of contagious disease in pre-weaned UK dairy heifers: Management practices, passive transfer of immunity and associated calf health. Vet Rec Open 4, 1-10. doi:10.1136/vetreco-2017-000226

Johnston, S.P., Ballard, M.M., Beach, M.J., Causer, L., Wilkins, P.P., 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 41, 623-626. doi:10.1128/JCM.41.2.623-626.2003

Johnston, W.T., Shirley, M.W., Smith, A.L., Gravenor, M.B., 2001. Modelling host cell availability and the crowding effect in *Eimeria* infections. Int. J. Parasitol. 31, 1070-1081. doi:10.1016/S0020-7519(01)00234-X

Jones, C.M., James, R.E., Quigley, J.D., McGilliard,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

M.L., 2004. Influence of pooled colostrum or colostrum replacement on IgG and evaluation of animal plasma in milk replacer. J. Dairy Sci. 87, 1806-1814. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73337-8

Jones, M.K., Grau, K.R., Costantini, V., Kolawole, A.O., De Graaf, M., Freiden, P., Graves, C.L., Koopmans, M., Wallet, S.M., Tibbetts, S.A., Schultz-Cherry, S., Wobus, C.E., Vinjé, J., Karst, S.M., 2015. Human norovirus culture in B cells. Nat. Protoc. 2015 1012 10, 1939-1947. doi:10.1038/nprot.2015.121

Jor, E., Myrmel, M., Jonassen, C.M., 2010. SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway. J. Virol. Methods 169, 1-7. doi:10.1016/j.jviromet.2010.03.028

Jung, K., Scheuer, K.A., Zhang, Z., Wang, Q., Saif, L.J., 2014. Pathogenesis of GIII.2 bovine norovirus, CV186-OH/00/US strain in gnotobiotic calves. Vet. Microbiol. 168, 202-207. doi:10.1016/J.VETMIC.2013.11.008

Kahrs, R.F., 1995. General disinfection guidelines. Rev. Sci. Tech. 14, 105-163. doi:10.20506/rst.14.1.836

Kang, S.J., Ryu, S.J., Chae, J.S., Eo, S.K., Woo, G.J., Lee, J.H., 2004. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhoea. Vet. Microbiol. 98, 323-328. doi:10.1016/J.VETMIC.2003.11.004

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2, 123-140.

Kaplon, J., Fremy, C., Bernard, S., Rehby, L., Aho, S., Pothier, P., Ambert-Balay, K., 2013. Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. Vaccine 31, 2433-2440. doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.039

Kaplon, J., Guenau, E., Asdrubal, P., Pothier, P., Ambert-Balay, K., 2011. Possible novel Nebovirus genotype in cattle, France. Emerg. Infect. Dis. 17, 1120-1123.

Karayel, I., Fehér, E., Marton, S., Coskun, N., Bányai, K., Alkan, F., 2017. Putative vaccine breakthrough event associated with heterotypic rotavirus infection in newborn calves, Turkey, 2015. Vet. Microbiol. 201, 7-13. doi:10.1016/J.VETMIC.2016.12.028

Kasari, T.R., Naylor, J.M., 1985a. Metabolic acidosis without clinical signs of dehydration in young calves. Can. Vet. J. 25, 394-399.

Kasari, T.R., Naylor, J.M., 1985b. Clinical evaluation of sodium bicarbonate, sodium L-lactate, and sodium acetate for the treatment of acidosis in diarrheic calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 187, 392-397.

Kaske, M., Werner, A., Schuberth, H.J., Rehage, J., Kehler, W., 2005. Colostrum management in calves: effects of drenching vs. bottle feeding. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 89, 151-157. doi:10.1111/J.1439-0396.2005.00535.X

Kato, S., Lindergard, G., Mohammed, H.O., 2003. Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. Vet. Parasitol. 111, 153-159. doi:10.1016/S0304-4017(02)00353-9

Keeton, S.T.N., Navarre, C.B., 2018. Coccidiosis in Large and Small Ruminants. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 34, 201-208. doi:10.1016/J.CVFA.2017.10.009

Keller, T.L., Zocco, D., Sundrud, M.S., Hendrick, M., Edenius, M., Yum, J., Kim, Y.J., Lee, H.K., Cortese, J.F., Wirth, D.F., Dignam, J.D., Rao, A., Yeo, C.Y., Mazitschek, R., Whitman, M., 2012. Halofuginone and other febrifugine derivatives inhibit prolyl-tRNA synthetase. Nat. Chem. Biol. 8, 311-317. doi:10.1038/nchembio.790

Kessler, E.C., Pistol, G.C., Bruckmaier, R.M., Gross, J.J., 2020. Pattern of milk yield and immunoglobulin concentration and factors associated with colostrum quality at the quarter level in dairy cows after parturition. J. Dairy Sci. 103, 965-971. doi:10.3168/JDS.2019-17283

Khurana, B., Pandey, R., 2001. Evidence of bovine non - group A rotavirus in diarrheic neonatal calves in India. Vet. Rec. 149, 364-365.

Kiani, H., Haghighi, A., Seyyedtabaei, S.J., Azargashsb, E., Zebardast, N., Taghipour, N., Rostami, A., Xiao, L., 2017. Prevalence, Clinical Manifestations and Genotyping of *Cryptosporidium* spp. in Patients with Gastrointestinal Illnesses in Western Iran. Iran. J. Parasitol. 12, 169.

Kilshaw, P.J., Sissons, J.W., 1979. Gastrointestinal allergy to soyabean protein in preruminant calves. Antibody production and digestive disturbances in calves fed heated soyabean flour. Res. Vet. Sci. 27, 361-365. doi:10.1016/S0034-5288(18)32808-X

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Kim, E.M., Cho, H.C., Shin, S.U., Park, J., Choi, K.S., 2022. Prevalence and genetic characterization of bovine coronavirus identified from diarrheic pre-weaned native Korean calves from 2019 to 2021. Infect. Genet. Evol. 100, 105263. doi:10.1016/J.MEEGID.2022.105263

King, B., Brian, D.A., 1982. Bovine coronavirus structural proteins. J. Virol. 42, 700-707.

Kirisawa, R., Takeyama, A., Koiwa, M., Iwai, H., 2007. Detection of Bovine Torovirus in Fecal Specimens of Calves with Diarrhea in Japan. J. Vet. Med. Sci. 69, 471-476. doi:10.1292/jvms.69.471

Klein-Jöbstl, D., Iwersen, M., Drillich, M., 2014. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: A case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. J. Dairy Sci. 97, 5110-5119. doi:10.3168/jds.2013-7695

Klein, P., Kleinová, T., Volek, Z., Šimůnek, J., 2008. Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonatal calves. Vet. Parasitol. 152, 53-59. doi:10.1016/J.VETPAR.2007.11.020

Klemm, P., 1985. Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. Rev. Infect. Dis. 7, 321-351.

Knutton, S., Phillips, A.D., Smith, H.R., Gross, R.J., Shaw, R., Watson, P., Price, E., 1991. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. Infect. Immun. 59, 365-371.

Koch, A., Kaske, M., 2008. Clinical Efficacy of Intravenous Hypertonic Saline Solution or Hypertonic Bicarbonate Solution in the Treatment of Inappetent Calves with Neonatal Diarrhea. J. Vet. Intern. Med. 22, 202-211. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.0029.x

Koehler, A. V., Jex, A.R., Haydon, S.R., Stevens, M.A., Gasser, R.B., 2014. *Giardia*/giardiasis - A perspective on diagnostic and analytical tools. Biotechnol. Adv. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.009

Koinari, M., Lymbery, A.J., Ryan, U.M., 2014. *Cryptosporidium* species in sheep and goats from Papua New Guinea. Exp. Parasitol. 141, 134-137. doi:10.1016/J.EXPPARA.2014.03.021

Kolářová, I., Valigurová, A., 2021. Hide-and-Seek: A Game Played between Parasitic Protists and Their Hosts. Microorg. 9, 2434. doi:10.3390/MICROORGANISMS9122434

Kolenda, R., Burdukiewicz, M., Schierack, P., 2015. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic E. coli. Front. Cell. Infect. Microbiol. 5, 23. doi:10.3389/fcimb.2015.00023

Koopmans, M., Horzinek, M., 1994. Toroviruses of Animals And Humans: A Review, Adv. Virus Res. 43, 233-273.

Koopmans, M., van Wuijckhuise-Sjouke, L., Schukken, Y.H., Cremers, H., Horzinek, M.C., 1991. Association of diarrhea in cattle with torovirus infections on farms. Am. J. Vet. Res. 52, 1769-1773.

Koutny, H., Joachim, A., Tichy, A., Baumgartner, W., 2012. Bovine *Eimeria* species in Austria. Parasitol. Res. 110, 1893-1901. doi:10.1007/s00436-011-2715-7

Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Jenkins, C., Monteiro Pires, S., Morabito, S., Niskanen, T., Scheutz, F., da Silva Felício, M.T., Messens, W., Bolton, D., 2020. Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. EFSA J. 18. doi:10.2903/J.EFSA.2020.5967

Krause, G., Zimmermann, S., Beutin, L., 2005. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. Vet. Microbiol. 106, 87-95.

Krause, W.J., Cullingford, G.L., Freeman, R.H., Eber, S.L., Richardson, K.C., Fok, K.F., Currie, M.G., Forte, L.R., 1994. Distribution of heat-stable enterotoxin/guanylin receptors in the intestinal tract of man and other mammals. J. Anat. 184, 407-417.

Krehbiel, C., Rust, S., Zhang, G., Gilliland, S., 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. J. Anim. Sci. 81, E120-E132. doi:10.2527/2003.8114_suppl_2E120x

Krogh, H. V., 1983a. Infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves and protection of the calves by vaccination of the dams. Ann. Rech. Vétérinaires 14, 522-525.

Krogh, H. V., 1983b. Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves with acute neonatal

diarrhoea. Nord. Vet. Med. 35, 346-352.

Kühne, S., Hammon, H.M., Bruckmaier, R.M., Morel, C., Zbinden, Y., Blum, J.W., 2000. Growth performance, metabolic and endocrine traits, and absorptive capacity in neonatal calves fed either colostrum or milk replacer at two levels. J. Anim. Sci. 78, 609-620. doi:10.2527/2000.783609X

Kváč, M., Hromadová, N., Květoňová, D., Rost, M., Sak, B., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. Vet. Parasitol. 177, 378-382. doi:10.1016/J.VETPAR.2010.11.048

La Ragione, R.M., Best, A., Clifford, D., Weyer, U., Johnson, L., Marshall, R.N., Marshall, J., Cooley, W.A., Farrelly, S., Pearson, G.R., Woodward, M.J., 2006. Influence of colostrum deprivation and concurrent *Cryptosporidium parvum* infection on the colonization and persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in young lambs. J. Med. Microbiol. 55, 819-828. doi:10.1099/JMM.0.46469-0/CITE/REFWORKS

La Ragione, R.M., Best, A., Woodward, M.J., Wales, A.D., 2009. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. FEMS Microbiol. Rev. 33, 394-410. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00138.x

La Ragione, R.M., Metcalfe, H.J., Villarreal-Ramos, B., Werling, D., 2013. *Salmonella* Infections in Cattle, en: Barrow, P.A., Methner, U. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. Wallingford, Reino Unido, pp. 233-262.

Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., Cacciò, S.M., 2005. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Int. J. Parasitol. 35, 207-213. doi:10.1016/J.IJPARA.2004.10.022

Lallemond, M., Villeneuve, A., Belda, J., Dubreuil, P., 2006. Field study of the efficacy of halofuginone and decoquinate in the treatment of crytosporidiosis in veal calves. Vet. Rec. 159, 672-677. doi:10.1136/vr.159.20.672

Langkjær, R.B., Vigre, H., Enemark, H.L., Maddox-Hyttel, C., 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. Parasitology 134, 339-350. doi:10.1017/S0031182006001533

Lanz Uhde, F., Kaufmann, T., Sager, H., Albini, S., Zanoni, R., Schelung, E., Meylan, M., 2008. Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. Vet. Rec. 163, 362-366. doi:10.1136/vr.163.12.362

Le Bouguénec, C., Bertin, Y., 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. Vet. Res. 30, 317.

Le Sueur, C., Mage, C., Mundt, H.C., 2009. Efficacy of toltrazuril (Baycox® 5% suspension) in natural infections with pathogenic *Eimeria* spp. in housed lambs. Parasitol. Res. 104, 1157-1162. doi:10.1007/s00436-008-1305-9

Lebbad, M., Winiecka-Krusnell, J., Stensvold, C.R., Beser, J., 2021. High Diversity of *Cryptosporidium* Species and Subtypes Identified in Cryptosporidiosis Acquired in Sweden and Abroad. Pathogens 10, 523. doi:10.3390/PATHOGENS10050523

Lee, J.H., Hur, J., Stein, B.D., 2008. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 and O111 in calves associated with diarrhea. Vet. J. 176, 205-209. doi:10.1016/J.TVJL.2007.02.007

Lee, S.-H., Kim, H.-Y., Lee, H., Kim, J.W., Lee, Y.-R., Chae, M.J., Oh, S.-I., Kim, J.H., Rhee, M.H., Kwon, O.-D., Goo, Y.-K., Kim, T.-H., Geraldino, P.J.L., Kwak, D., 2018. *Eimeria* species in cattle with diarrhoea in the Republic of Korea regarding age, season and nature of diarrhoea. Vet. Rec. 183, 504-504. doi:10.1136/vr.104600

Lee, S., Vanbik, D., Kim, H.Y., Cho, A., Kim, J.W., Byun, J.W., Oem, J.K., Oh, S.I., Kwak, D., 2016. Prevalence and molecular characterisation of *Giardia duodenalis* in calves with diarrhoea. Vet. Rec. 178, 663-669. doi:10.1136/vr.103534

Lee, S.H., Kim, H.Y., Choi, E.W., Kim, D., 2019a. Causative agents and epidemiology of diarrhea in Korean native calves. J. Vet. Sci. 20. doi:10.4142/JVS.2019.20.E64

Lee, Y.J., Ryu, J.-H., Shin, S.U., Choi, K.S., 2019b. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned native calves in the Republic of Korea. Parasitol. Res. 118, 3509-3517. doi:10.1007/s00436-019-06482-9

Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R., 2001. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. Vet. Rec. 148, 108-112. doi:10.1136/vr.148.4.108

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Levine, M.M., 1987. *Escherichia coli* That Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. J. Infect. Dis. 155, 377-389.

Lew, J.F., LeBaron, C.W., Glass, R.I., Torok, T., Griffin, P.M., Well, J.G., Dennis, M.S., Juranek, D., Suzanne, D.V.M., Wahlquist, M.S., 1990. Recommendations for Collection of Laboratory Specimens Associated with Outbreaks of Gastroenteritis. Morb. Mortal. Wkly. Report. Recomm. Reports 39, 1-13.

Lewis, L.D., Phillips, R.W., 1973. Diarrheic induced changes in intracellular and extracellular ion concentrations in neonatal calves. Ann. Rech. Vet. 4, 99-111.

Lewis, L.D., Phillips, R.W., 1972. Water and electrolyte losses in neonatal calves with acute diarrhea. A complete balance study. Cornell Vet. 62, 596-607.

Li, N., Zhao, W., Song, S., Ye, H., Chu, W., Guo, Y., Feng, Y., Xiao, L., 2022. Diarrhoea outbreak caused by coinfections of *Cryptosporidium parvum* subtype IIdA20G1 and rotavirus in pre-weaned dairy calves. Transbound. Emerg. Dis. 69, e1606-e1617. doi:10.1111/TBED.14496

Lichtmannsperger, K., Hinney, B., Joachim, A., Wittek, T., 2019. Molecular characterization of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* from calves with diarrhoea in Austria and evaluation of point-of-care tests. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 66, 101333. doi:10.1016/j.cimid.2019.101333

Liebler, E.M., Klüver, S., Pohlenz, J., Koopmans, M., 1992. The significance of bredavirus as a diarrhea agent in calf herds in Lower Saxony. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 99, 195–200.

Lim, S.K., Lim, K.G., Lee, H.S., Jung, S.C., Kang, M. Il, Nam, H.M., 2010. Prevalence and Molecular Characterization of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic Cattle in Korea. J. Vet. Med. Sci. 72, 611-614. doi:10.1292/JVMS.08-0302

Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Fayer, R., 1990. Extraintestinal stages of *Eimeria bovis* in calves and attempts to induce relapse of clinical disease. Vet. Parasitol. 36, 1-9. doi:10.1016/0304-4017(90)90088-S

Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, Bos taurus. J. Eukaryot. Microbiol. 47, 91-95. doi:10.1111/j.1550-7408.2000.tb00016.x

Lintermans, P.F., Bertels, A., Schlicker, C., Deboeck, F., Charlier, G., Pohl, P., Norgren, M., Normark, S., Van Montagu, M., De Greve, H., 1991. Identification, characterization, and nucleotide sequence of the F17-G gene, which determines receptor binding of *Escherichia coli* F17 fimbriae. J. Bacteriol. 173, 3366-3373.

Liu, B.L., Lambden, P.R., Günther, H., Otto, P., Elschner, M., Clarke, I.N., 1999. Molecular Characterization of a Bovine Enteric Calicivirus: Relationship to the Norwalk-Like Viruses. Note 73, 819-825.

Liu, J., Deng, M., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Rutherford, M.S., Enomoto, S., 2009. Biphasic modulation of apoptotic pathways in *Cryptosporidium parvum* infected human intestinal epithelial cells. Infect. Immun. 77, 837-849. doi:10.1128/IAI.00955-08

Livermore, D.M., Winstanley, T.G., Shannon, K.P., 2001. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J. Antimicrob. Chemother. 48, 87-102. doi:10.1093/JAC/48.SUPPL_1.87

Lofstedt, J., Dohoo, I.R., Duizer, G., 1999. Model to predict septicemia in diarrheic calves. J. Vet. Intern. Med. 13, 81-88. doi:10.1111/j.1939-1676.1999.tb01134.x

Lombardelli, J.A., Tomazic, M.L., Schnittger, L., Tiranti, K.I., 2019. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves and GP60 subtyping of diarrheic calves in central Argentina. Parasitol. Res. 118, 2079. doi:10.1007/S00436-019-06366-Y

Lora, I., Gottardo, F., Contiero, B., Dall Ava, B., Bonfanti, L., Stefani, A., Barberio, A., 2018. Association between passive immunity and health status of dairy calves under 30 days of age. Prev. Vet. Med. 152, 12-15. doi:10.1016/j.prevetmed.2018.01.009

Lorenz, I., 2006. Diarrhoea Of The Young Calf: An Update, en: XXIV World Buiatrics Congress. Niza, Francia, pp. 130-138.

Lorenz, I., 2004a. Influence of d-lactate on Metabolic Acidosis and on Prognosis in Neonatal Calves with Diarrhoea. J. Vet. Med. Ser. A 51, 425-428. doi:10.1111/j.1439-0442.2004.00662.x

Lorenz, I., 2004b. Investigations on the influence of serum D-lactate levels on clinical signs in calves with metabolic acidosis. Vet. J. 168, 323-327.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

doi:10.1016/j.tvjl.2003.10.021

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, 1-6. doi:10.1186/2046-0481-64-9

Loy, D.J., Brodersen, B., 2022. Tips on sample submission for diagnosis of neonatal calf diarrhea. University of Nebraska-Lincoln. School of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences. https://vbms.unl.edu/tips-sample-submission-diagnosis-neonatal-calf-diarrhea

Lucas, A.S., Swecker, W.S., Lindsay, D.S., Scaglia, G., Neel, J.P.S., Elvinger, F.C., Zajac, A.M., 2014. A study of the level and dynamics of *Eimeria* populations in naturally infected, grazing beef cattle at various stages of production in the Mid-Atlantic USA. Vet. Parasitol. 202, 201-206. doi:10.1016/J.VETPAR.2014.02.053

Lundborg, G.K., Svensson, E.C., Oltenacu, P.A., 2005. Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0-90 days. Prev. Vet. Med. 68, 123-143. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.11.014

Lung, T.W.F., Pearson, J.S., Schuelein, R., Hartland, E.L., 2014. The cell death response to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Cell. Microbiol. 16, 1736-1745. doi:10.1111/cmi.12371

Lutz, K., Schmitt, S., Linder, M., Hermosilla, C., Zahner, H., Taubert, A., 2011. *Eimeria* bovis-induced modulation of the host cell proteome at the meront I stage. Mol. Biochem. Parasitol. 175, 1-9.

MacFarlane, J.A., Grove-White, D.H., Royal, M.D., Smith, R.F., 2015. Identification and quantification of factors affecting neonatal immunological transfer in dairy calves in the UK. Vet. Rec. 176, 625. doi:10.1136/VR.102852

Maddox-Hyttel, C., Langkjær, R.B., Enemark, H.L., Vigre, H., 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs—Occurrence and management associated risk factors. Vet. Parasitol. 141, 48-59. doi:10.1016/J.VETPAR.2006.04.032

Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 18, 268-281. doi:10.1111/J.1469-0691.2011.03570.X

Maier, G.U., Breitenbuecher, J., Gomez, J.P., Samah, F., Fausak, E., Van Noord, M., 2022. Vaccination for the Prevention of Neonatal Calf Diarrhea in Cow-Calf Operations: A Scoping Review. Vet. Anim. Sci. 15, 100238. doi:10.1016/J.VAS.2022.100238

Mainil, J.G., Gerardin, J., Jacquemin, E., 2000. Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesion-encoding (f17 and f17G) gene variants in necrotoxigenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. Vet. Microbiol. 73, 327-335.

Maldonado-Camargo, S., Atwill, E.R., Saltijeral-Oaxaca, J.A., Herrera-Alonso, L.C., 1998. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. Prev. Vet. Med. 36, 95-107.

Mank, T.G., Zaat, J.O.M., Deelder, A.M., Van Eijk, J.T.M., Polderman, A.M., 1997. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. doi:10.1007/BF02447929

Marshall, R.N., Catchpole, J., Green, J.A., Webster, K.A., 1998. Bovine coccidiosis in calves following turnout. Vet. Rec. 143, 366-367. doi:10.1136/VR.143.13.366

Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. Vet. Microbiol. 140, 246-255. doi:10.1016/J.VETMIC.2009.08.028

Masters, P.S., Perlman, S., 2013. Coronaviridae, en: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania, EE.UU., pp. 825-858.

Matiz, K., Kecskeméti, S., Kiss, I., Ádám, Z., Tanyi, J., Nagy, B., 2002. Torovirus detection in faecal specimens of calves and pigs in Hungary: Short communication. Acta Vet. Hung. 50, 293-296. doi:10.1556/AVet.50.2002.3.5

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J., Buesa, J., Esona, M., Estes, M., Gentsch, J., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C., Martella, V., Mertens, P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F., Saif, L., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Arch.

Virol. 156, 1397-1413.

Matthijnssens, J., Desselberger, U., 2012. Genome Diversity and Evolution of Rotaviruses, en: Hacker, J., Dobrindt, U., Kurth, R. (Eds.), Genome Plasticity and Infectious Diseases. ASM Press, Washington D.C., EE.UU., pp. 214-241.

Maunsell, F., Donovan, G.A., 2008. Biosecurity and Risk Management for Dairy Replacements. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 24, 155-190. doi:10.1016/j.cvfa.2007.10.007

Mauroy, A., Gillet, L., Mathijs, E., Vanderplasschen, A., Thiry, E., 2011. Alternative attachment factors and internalization pathways for GIII.2 bovine noroviruses. J. Gen. Virol. 92, 1398-1409. doi:10.1099/vir.0.030072-0

Mauroy, A., Scipioni, A., Mathijs, E., Saegerman, C., Mast, J., Bridger, J.C., Ziant, D., Thys, C., Thiry, E., 2009. Epidemiological study of bovine norovirus infection by RT-PCR and a VLP-based antibody ELISA. Vet. Microbiol. 137, 243-251. doi:10.1016/J.VETMIC.2009.01.031

Maynou, G., Bach, A., Terré, M., 2017. Feeding of waste milk to Holstein calves affects antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* isolated from fecal and nasal swabs. J. Dairy Sci. 100, 2682-2694. doi:10.3168/JDS.2016-11891

McAllister, T.A., Olson, M.E., Fletch, A., Wetzstein, M., Entz, T., 2005. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. Can. Vet. J. 46, 47-55.

McCole, D.F., Eckmann, L., Laurent, F., Kagnoff, M.F., 2000. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. Infect. Immun. 68, 1710-1713. doi:10.1128/IAI.68.3.1710-1713.2000

McDaniels, A.E., Cochran, K.W., Gannon, J.J., Williams, G.W., 1983. Rotavirus and reovirus stability in microorganism-free distilled and wastewaters. Water Res. 17, 1349-1353.

McDaniels, A.E., Rice, E.W., Reyes, A.L., Johnson, C.H., Haugland, R.A., Stelma, J., 1998. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β-D-glucuronidase. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4113. doi:10.1128/aem.64.10.4113-4113.1998

McGee, M., Earley, B., 2019. Review: Passive immunity in beef-suckler calves. Animal 13, 810-825. doi:10.1017/S1751731118003026

McGuirk, S.M., 2003. Solving Calf Morbidity and Mortality Problems, en: American Association of Bovine Practitioners: 36th Annual Conference. Columbus, Ohio, EE.UU.

McGuirk, S.M., Collins, M., 2004. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 20, 593-603. doi:10.1016/j.cvfa.2004.06.005

McKerr, C., Adak, G.K., Nichols, G., Gorton, R., Chalmers, R.M., Kafatos, G., Cosford, P., Charlett, A., Reacher, M., Pollock, K.G., Alexander, C.L., Morton, S., 2015. An Outbreak of *Cryptosporidium parvum* across England & Scotland Associated with Consumption of Fresh Pre-Cut Salad Leaves, May 2012. PLoS One 10, e0125955. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0125955

McNulty, M.S., 1978. Rotaviruses. J. Gen. Virol. 40, 1-18.

Meale, S.J., Chaucheyras-Durand, F., Berends, H., Guan, L.L., Steele, M.A., 2017. From pre- to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract. J. Dairy Sci. 100, 5984-5995. doi:10.3168/JDS.2016-12474

Mebus, C.A., 1990. Neonatal Calf Diarrhea Virus, en: Dinter, Z., Morein, B. (Eds.), Virus infections of ruminants. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Países Bajos, pp. 297-300.

Mebus, C.A., Stair, E.L., Rhodes, M.B., Twiehaus, M.J., 1973. Pathology of Neonatal Calf Diarrhea Induced by a Coronavirus-Like Agent. Vet. Pathol. 10, 45-64.

Mebus, C.A., Stair, E.L., Underdahl, N.R., Twiehaus, M.J., 1971. Pathology of Neonatal Calf Diarrhea Induced by a Reo-Like Virus. Vet. Pathol. 8, 490-505.

Medrano-Galarza, C., LeBlanc, S.J., DeVries, T.J., Jones-Bitton, A., Rushen, J., Marie de Passillé, A., Endres, M.I., Haley, D.B., 2018a. Effect of age of introduction to an automated milk feeder on calf learning and performance and labor requirements. J. Dairy Sci. 101, 9371-9384. doi:10.3168/JDS.2018-14390

Medrano-Galarza, C., LeBlanc, S.J., Jones-Bitton, A., DeVries, T.J., Rushen, J., Marie de Passillé, A., Endres, M.I., Haley, D.B., 2018b. Associations between management practices and within-pen prevalence of calf diarrhea and respiratory disease on dairy farms using automated milk feeders. J. Dairy Sci. 101, 2293-2308. doi:10.3168/JDS.2017-13733

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Mee, J.F., 2008. Newborn Dairy Calf Management. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 24, 1-17. doi:10.1016/J.CVFA.2007.10.002

Mele, R., Gomez Morales, M.A., Tosini, F., Pozio, E., 2004. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. Infect. Immun. 72, 6061-6067. doi:10.1128/IAI.72.10.6061-6067.2004

Mendonça, C., Almeida, A., Castro, A., de Lurdes Delgado, M., Soares, S., da Costa, J.M.C., Canada, N., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. Vet. Parasitol. 147, 47-50. doi:10.1016/j.vetpar.2007.03.019

Menge, C., 2020. The role of *Escherichia coli* Shiga toxins in STEC colonization of cattle, Toxins. doi:10.3390/toxins12090607

Menge, C., Wieler, L.H., Schlapp, T., Baljer, G., 1999. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro. Infect. Immun. 67, 2209-2217. doi:10.1128/IAI.67.5.2209-2217.1999

MERCASA, 2020. Alimentación en España 2020.

Milnes, A.S., Binns, S.H., Oliver, S.L., Bridger, J.C., 2007. Retrospective study of noroviruses in samples of diarrhoea from cattle, using the Veterinary Laboratories Agency's Farmfile database. Vet. Rec. 160, 326-330. doi:10.1136/VR.160.10.326

Minetti, C., Taweenan, W., Hogg, R., Featherstone, C., Randle, N., Latham, S.M., Wastling, J.M., 2014. Occurrence and Diversity of *Giardia duodenalis* Assemblages in Livestock in the UK. Transbound. Emerg. Dis. 61, e60-e67. doi:10.1111/tbed.12075

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021. Panel Situación Sector Lácteo España.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020a. Indicadores Económicos, Anuario de Estadística 2019.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020b. La Industria de la Alimentación, Anuario de Estadística 2019.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020c. Encuesta ganadera 2020.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020d. El sector de la carne de vacuno en cifras.

Mirhashemi, M.E., Zintl, A., Grant, T., Lucy, F., Mulcahy, G., Waal, T. De, 2016. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species in livestock in Ireland. Vet. Parasitol. 216, 18-22. doi:10.1016/J.VETPAR.2015.12.002

Mirhashemi, M.E., Zintl, A., Grant, T., Lucy, F.E., Mulcahy, G., De Waal, T., 2015. Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. Exp. Parasitol. 151-152, 14-20. doi:10.1016/j.exppara.2015.01.018

Misic, Z., Abe, N., 2007. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. Parasitology 134, 351-358. doi:10.1017/S0031182006001508

Mitchell, E.S.E., Smith, R.P., Ellis-Iversen, J., 2012. Husbandry risk factors associated with subclinical coccidiosis in young cattle. Vet. J. 193, 119-123. doi:10.1016/J.TVJL.2011.09.017

Mitchell, I. de G., Tame, M.J., Kenworthy, R., 1974. Conditions for the production of *Escherichia coli* enterotoxin in a defined medium. J. Med. Microbiol. 7, 395-400.

Mohamed, F.F., Mansour, S.M.G., El-Araby, I.E., Mor, S.K., Goyal, S.M., 2017. Molecular detection of enteric viruses from diarrheic calves in Egypt. Arch. Virol. 162, 129-137. doi:10.1007/s00705-016-3088-0

Mohammed, H.O., Wade, S.E., Schaaf, S., 1999. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. Vet. Parasitol. 83, 1-13. doi:10.1016/S0304-4017(99)00032-1

Mohd Nor, N., Steeneveld, W., Mourits, M.C.M., Hogeveen, H., 2012. Estimating the costs of rearing young dairy cattle in the Netherlands using a simulation model that accounts for uncertainty related to diseases. Prev. Vet. Med. 106, 214-224. doi:10.1016/J.PREVETMED.2012.03.004

Mohler, V.L., Izzo, M.M., House, J.K., 2009. *Salmonella* in Calves. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 25, 37-54. doi:10.1016/j.cvfa.2008.10.009

Monis, P.T., Cacciò, S.M., Thompson, R.C.A., 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol. 25, 93-100. doi:10.1016/j.pt.2008.11.006

Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

M.M., Giannella, R.A., 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infect. Immun. 41, 1340-1351.

Morales, A., Lamprea, A., García, A., Méndez, A., 2017. La necropsia en campo: un servicio agregado en la medicina veterinaria rural. Rev. Med. Vet. 34, 167-180.

Moran, J., 2002. Calf rearing: A practical guide. Landlinks Press, Collingwood, Australia.

Mouricout, M.A., Julien, R.A., 1987. Pilus-Mediated Binding of Bovine Enterotoxigenic *Escherichia coli* to Calf Small Intestinal Mucis. Infect. Immun. 55, 1216-1223.

Moxley, R., 2013a. Enterobacteriaceae: *Escherichia*, en: McVey, D.S., Kennedy, M., Chengappa, M.M. (Eds.), Veterinary Microbiology. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, EE.UU., pp. 62-74.

Moxley, R., 2013b. Family Enterobacteriaceae, en: McVey, D.S., Kennedy, M., Chengappa, M.M. (Eds.), Veterinary Microbiology. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, EE.UU., pp. 53-61.

Moxley, R.A., Smith, D.R., 2010. Attaching-effacing *Escherichia coli* Infections in Cattle. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 26, 29-56. doi:10.1016/J.CVFA.2009.10.011

Mukherjee, A.K., Chowdhury, P., Rajendran, K., Nozaki, T., Ganguly, S., 2014. Association between *Giardia duodenalis* and Coinfection with Other Diarrhea-Causing Pathogens in India. Biomed Res. Int. 2014, 786480. doi:10.1155/2014/786480

Mundt, H.C., Bangoura, B., Rinke, M., Rosenbruch, M., Daugschies, A., 2005. Pathology and treatment of *Eimeria zuernii* coccidiosis in calves: Investigations in an infection model. Parasitol. Int. 54, 223-230. doi:10.1016/j.parint.2005.06.003

Mundt, H.C., Rödder, F., Mengel, H., Bangoura, B., Ocak, M., Daugschies, A., 2007. Control of coccidiosis due to *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in calves with toltrazuril under field conditions in comparison with diclazuril and untreated controls. Parasitol. Res. 101, 93-104. doi:10.1007/s00436-007-0616-6

Murakoshi, F., Takeuchi, M., Inomata, A., Horimoto, T., Ito, M., Suzuki, Y., Kato, K., 2014. Administration of lasalocid-NA is preventive against cryptosporidiosis of newborn calves. Vet. Rec. 175, 353. doi:10.1136/vr.102508

Mushtaq, H., Bakht, J., Khan, I., Ahmad, B., 2021. Antimicrobial efficacy and prevalence of colicinogenic *E. coli* in faecal matter of human, cow and sheep. Int. J. Antimicrob. Agents 57, 106221. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.106221

Naciri, M., Mancassola, R., Yvoré, P., Peeters, J.E., 1993. The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. Vet. Parasitol. 45, 199-207. doi:10.1016/0304-4017(93)90075-X

Naciri, M., Paul Lefay, M., Mancassola, R., Poirier, P., Chermette, R., 1999. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. Vet. Parasitol. 85, 245-257. doi:10.1016/S0304-4017(99)00111-9

Nagy, B., Fekete, P.Z., 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. Int. J. Med. Microbiol. 295, 443-454.

Nagy, B., Fekete, P.Z., 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. Vet. Res. 30, 259-284.

Nagy, B., Tóth, I., Fekete, P.Z., 2005. Adhesins and receptors for colonisation by different pathotypes of *Escherichia coli* in calves and young pigs, en: Holzapfel, W.H., Naughton, P.J., Pierzynowski, S.G., Zabielski, R., Salek, E. (Eds.), Microbial Ecology in Growing Animals. Elsevier Inc., Filadelfia, Pensilvania, EE.UU., pp. 157-190.

Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142-201.

Navarro, F., Miró, E., Mirelis, B., 2010. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 28, 638-645. doi:10.1016/j.eimc.2010.05.002

Naylor, J.M., 2009. Neonatal Calf Diarrhea. Food Anim. Pract. 70. doi:10.1016/B978-141603591-6.10021-1

Naylor, J.M., 1992. Effects of electrolyte solutions for oral administration on clotting of milk. J. Am. Vet. Med. Assoc. 201, 1026-1029.

Naylor, J.M., Forsyth, G.W., 1986. The Alkalinizing Effects of Metabolizable Bases in the Healthy Calf. Can. J. Vet. Res. 50, 509-516.

Naylor, S.W., Gally, D.L., Low, C.J., 2005. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. Int. J. Med. Microbiol. 295, 419-441.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ng, J., Eastwood, K., Durrheim, D., Massey, P., Walker, B., Armson, A., Ryan, U.M., 2008. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in rural New South Wales. Exp. Parasitol. 119, 192-195. doi:10.1016/J.EXPPARA.2008.01.010

Ng, J., Yang, R., McCarthy, S., Gordon, C., Hijjawi, N., Ryan, U.M., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. Vet. Parasitol. 176, 145-150. doi:10.1016/j.vetpar.2010.10.056

Ng, J.S.Y., Eastwood, K., Walker, B., Durrheim, D.N., Massey, P.D., Porigneaux, P., Kemp, R., McKinnon, B., Laurie, K., Miller, D., Bramley, E., Ryan, U., 2012. Evidence of *Cryptosporidium* transmission between cattle and humans in northern New South Wales. Exp. Parasitol. 130, 437-441. doi:10.1016/J.EXPPARA.2012.01.014

Ngeleka, M., Godson, D., Vanier, G., Desmarais, G., Wojnarowicz, C., Sayi, S., Yanyun, H., Movasseghi, R., Fairbrother, J.M., 2019. Frequency of *Escherichia coli* virotypes in calf diarrhea and intestinal morphologic changes associated with these virotypes or other diarrheagenic pathogens. J. Vet. Diagnostic Investig. 31, 611-615.

Nguyen, D.N., Currie, A.J., Ren, S., Bering, S.B., Sangild, P.T., 2019. Heat treatment and irradiation reduce anti-bacterial and immune-modulatory properties of bovine colostrum. J. Funct. Foods 57, 182-189. doi:10.1016/j.jff.2019.04.012

Nguyen, F., Starosta, A.L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., Wilson, D.N., 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. Biol. Chem. 395, 559-575. doi:10.1515/hsz-2013-0292

Nielsen, L.R., 2013. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. Vet. Microbiol. 162, 1-9. doi:10.1016/j.vetmic.2012.08.003

Nielsen, P.P., Jensen, M.B., Lidfors, L., 2008. Milk allowance and weaning method affect the use of a computer controlled milk feeder and the development of cross-sucking in dairy calves. Appl. Anim. Behav. Sci. 109, 223-237. doi:10.1016/J.APPLANIM.2007.01.015

Nouri, M., Constable, P.D., 2006. Comparison of two oral electrolyte solutions and route of administration on the abomasal emptying rate of Holstein-Friesian calves. J. Vet. Intern. Med. 20, 620-626. doi:10.1892/0891-6640(2006)20[620:COTOES]2.0.CO;2

Nourmohammadzadeh, F., Davoudi, Y., Abdollahpour, G., Nouri, A., 2012. The prevalence of rotavirus in neonatal calf diarrhoea, using electron microscopic examination. Comp. Clin. Path. 21, 1231-1234. doi:10.1007/S00580-011-1270-Z/FIGURES/1

O' Leary, J.K., Blake, L., Corcoran, G.D., Sleator, R.D., Lucey, B., 2020. Increased diversity and novel subtypes among clinical *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates in Southern Ireland. Exp. Parasitol. 218, 107967. doi:10.1016/J.EXPPARA.2020.107967

O'Brien, E., McInnes, L., Ryan, U., 2008. *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. Exp. Parasitol. 118, 118-121. doi:10.1016/J.EXPPARA.2007.05.012

O'Handley, R. M., O., M. E., M., T. A., M., D. W., J., M., Royan, G., Cheng, K.J., 1997. Efficacy of fenbendazole for treatment of giardiasis in calves. Am. J. Vet. Res. 58, 384-388.

O'Handley, R.M., Cockwill, C., Jelinski, M., McAllister, T.A., Olson, M.E., 2000. Effects of repeat fenbendazole treatment in dairy calves with giardiosis on cyst excretion, clinical signs and production. Vet. Parasitol. 89, 209-218. doi:10.1016/S0304-4017(00)00200-4

O'Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W., Olson, M.E., 1999. Duration of naturally acquired giardiosis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. J. Am. Vet. Med. Assoc. 214, 391-396.

O'Handley, R.M., Olson, M.E., 2006. Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 22, 623-643. doi:10.1016/j.cvfa.2006.07.002

Odden, A., Enemark, H.L., Ruiz, A., Robertson, L.J., Ersdal, C., Nes, S.K., Tømmerberg, V., Stuen, S., 2018. Controlled efficacy trial confirming toltrazuril resistance in a field isolate of ovine Eimeria spp. Parasites Vectors 2018 111 11, 1-11. doi:10.1186/S13071-018-2976-4

Ogbuigwe, P., Biggs, P.J., Garcia-Ramirez, J.C., Knox, M.A., Pita, A., Velathanthiri, N., French, N.P., Hayman, D.T.S., 2022. Uncovering the genetic diversity of *Giardia intestinalis* in isolates from outbreaks in New Zealand. Infect. Dis. Poverty 11, 1-10. doi:10.1186/S40249-022-00969-X/FIGURES/3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Oikonomou, G., Teixeira, A.G.V., Foditsch, C., Bicalho, M.L., Machado, V.S., Bicalho, R.C., 2013. Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth. PLoS One 8, 63157. doi:10.1371/journal.pone.0063157

Oliver, S.L., Asobayire, E., Dastjerdi, A.M., Bridger, J.C., 2006. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. Virology 350, 240-250. doi:10.1016/j.virol.2006.02.027

Oliver, S.L., Wood, E., Asobayire, E., Wathes, D.C., Brickell, J.S., Elschner, M., Otto, P., Lambden, P.R., Clarke, I.N., Bridger, J.C., 2007. Serotype 1 and 2 Bovine Noroviruses Are Endemic in Cattle in the United Kingdom and Germany. J. Clin. Microbiol. 45, 3050-3052. doi:10.1128/JCM.02015-06

Olson, D.P., Papasian, C.J., Ritter, R.C., 1980. The effects of cold stress on neonatal calves. II. Absorption of colostral immunoglobulins. Can. J. Comp. Med. 44, 19.

Olson, M.E., Goh, J., Phillips, M., Guselle, N., McAllister, T.A., 1999. *Giardia* Cyst and Cryptosporidium Oocyst Survival in Water, Soil, and Cattle Feces. J. Environ. Qual. 28, 1991-1996.

Olson, M.E., O'Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C.A., 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. Trends Parasitol. 20, 185-191. doi:10.1016/j.pt.2004.01.015

Omole, O.O., Nappert, G., Naylor, J.M., Zello, G.A., 2001. Both L- and D-lactate contribute to metabolic acidosis in diarrheic calves. J. Nutr. 131, 2128-2131. doi:10.1093/jn/131.8.2128

Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Cid, D., García, S., Sanz, R., de la Fuente, R., 1998. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1–30-days-old diarrhoeic dairy calves. Vet. Microbiol. 63, 239-248.

Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., García, S., Cid, D., De La Fuente, R., 2000. In Vitro Susceptibility of *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhoeic Dairy Calves to 15 Antimicrobial Agents. J. Vet. Med. Ser. B 47, 329-335. doi:10.1046/J.1439-0450.2000.00356.X

Organización Mundial de la Salud, 2022. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022.

Orr, J.P., 1984. Necrotizing enteritis in a calf infected with adenovirus. Can. Vet. J. 25, 72-4.

Osorio, J.S., 2020. Gut health, stress, and immunity in neonatal dairy calves: the host side of host-pathogen interactions. J. Anim. Sci. Biotechnol. 11, 1-15. doi:10.1186/S40104-020-00509-3/FIGURES/4

Otto, P.H., Clarke, I.N., Lambden, P.R., Salim, O., Reetz, J., Liebler-Tenorio, E., 2011. Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: an experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection. J. Virol. 85, 12013-12021.

Otto, P.H., Rosenhain, S., Elschner, M.C., Hotzel, H., Machnowska, P., Trojnar, E., Hoffmann, K., Johne, R., 2015. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. Vet. Microbiol. 179, 168-176.

Ouwehand, A., Isolauri, E., Salminen, S., 2002. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. Eur. J. Nutr. doi:10.1007/s00394-002-1105-4

Paget, T.A., Jarroll, E.L., Manning, P., Lindmark, D.G., Lloyd, D., 1989. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. J. Gen. Microbiol. 135, 145-154. doi:10.1099/00221287-135-1-145

Palmer, G.H., Bywater, R.J., Stanton, A., 1983. Absorption in calves of amoxicillin, ampicillin, and oxytetracycline given in milk replacer, water, or an oral rehydration formulation. Am. J. Vet. Res. 44, 68-71.

Panciera, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M., 1971. Cryptosporidial Infection in a Calf. Vet. Pathol. 8, 479-484.

Pang, X., Lee, B.E., 2015. Laboratory Diagnosis of Noroviruses: Present and Future. Clin. Lab. Med. 35, 345-362. doi:10.1016/j.cll.2015.02.008

Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., 2013. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. Vet. Microbiol. 165, 190-199.

Pardon, B., Hostens, M., Duchateau, L., Dewulf, J., De Bleecker, K., Deprez, P., 2013. Impact of respiratory disease, diarrhea, otitis and arthritis on mortality and carcass traits in white veal calves. BMC Vet. Res. 9, 1-14. doi:10.1186/1746-6148-9-79/TABLES/6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Park, S.J., Oh, E.H., Park, S.I., Kim, H.H., Jeong, Y.J., Lim, G.K., Hyun, B.H., Cho, K.O., 2008. Molecular epidemiology of bovine toroviruses circulating in South Korea. Vet. Microbiol. 126, 364-371. doi:10.1016/J.VETMIC.2007.07.012

Parreño, V., Béjar, C., Vagnozzi, A., Barrandeguy, M., Costantini, V., Craig, M.I., Yuan, L., Hodgins, D., Saif, L., Fernández, F., 2004. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. Vet. Immunol. Immunopathol. 100, 7-24. doi:10.1016/J.VETIMM.2004.02.007

Paton, J.C., Paton, A.W., 1998. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. Clin. Microbiol. Rev. 11, 450-479.

Peek, S.F., McGuirk, S.M., Sweeney, R.W., Cummings, K.J., 2018. Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract, en: Peek, S.F., Divers, T.J. (Eds.), Rebhun's Diseases of Dairy Cattle. St. Louis, Misuri, EE.UU., pp. 249-356. doi:10.1016/B978-141603137-6.50012-0

Peng, M.M., Wilson, M.L., Holland, R.E., Meshnick, S.R., Lal, A.A., Xiao, L., 2003. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. Parasitol. Res. 90, 175-180. doi:10.1007/S00436-003-0834-5

Pereira, R. V., Siler, J.D., Ng, J.C., Davis, M.A., Grohn, Y.T., Warnick, L.D., 2014. Effect of on-farm use of antimicrobial drugs on resistance in fecal *Escherichia coli* of preweaned dairy calves. J. Dairy Sci. 97, 7644-7654. doi:10.3168/JDS.2014-8521

Perrin, B., Martel, J., Solsona, M., Contrepois, M., Dubourguier, H., Girardeau, J., Guuet, P., Bordas, C., Hayers, F., Quilleriet-Eliez, A., 1981. Fréquence du rotavirus et l'association rotavirus et *Escherichia coli* K99+ chez des veaux de quelques départements français. Ann. Rech. Vétérinaires 12, 259-263.

Petry, F., 2004. Structural Analysis of *Cryptosporidium parvum*. Microsc. Microanal. 10, 586-601.

Pfortmueller, C.A., Kabon, B., Schefold, J.C., Fleischmann, E., 2018. Crystalloid fluid choice in the critically ill: Current knowledge and critical appraisal. Wien. Klin. Wochenschr. doi:10.1007/s00508-018-1327-y

Philipp, H., Schmidt, H., Düring, F., Salamon, E., 2003. Efficacy of Meloxicam (Metacam®) as Adjunct to a Basic Therapy for the Treatment of Diarrhoea in Calves. Acta Vet. Scand. 44, P95. doi:10.1186/1751-0147-44-s1-p95

Philippe, P., Alzieu, J.P., Taylor, M.A., Dorchies, P., 2014. Comparative efficacy of diclazuril (Vecoxan®) and toltrazuril (Baycox bovis®) against natural infections of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in French calves. Vet. Parasitol. 206, 129-137. doi:10.1016/j.vetpar.2014.10.003

Philips, R.., Lewis, L.D., Knox, K.L., 1971. Alterations in body water turnover and distribution in neonatal calves with acute diarrhea. Ann. N. Y. Acad. Sci. 176, 231-243.

Phipps, A.J., Beggs, D.S., Murray, A.J., Mansell, P.D., Pyman, M.F., 2017. Factors associated with colostrum immunoglobulin G concentration in northern-Victorian dairy cows. Aust. Vet. J. 95, 237-243. doi:10.1111/AVJ.12601

Plutzer, J., Karanis, P., 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. Vet. Parasitol. 165, 187-199. doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.003

Plutzer, J., Ongerth, J., Karanis, P., 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int. J. Hyg. Environ. Health 213, 321-333. doi:10.1016/j.ijheh.2010.06.005

Plym-Forshell, L., Ekesbo, I., 1996. Survival of *Salmonella* in Urine and Dry Faeces from Cattle–An Experimental Study. Acta Vet. Scand. 37, 127-131. doi:10.1186/BF03548104/METRICS

Pohlenz, J.F.L., Cheville, N.F., Woode, G.N., Mokresh, A.H., 1984. Cellular Lesions in Intestinal Mucosa of Gnotobiotic Calves Experimentally Infected with a New Unclassified Bovine Virus (Breda Virus). Vet. Pathol. 21, 407-417.

Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S., 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. Microbiol. Spectr. 6, ARBA-0026-2017. doi:10.1097/01.inf.0000141751.73083.7a

Pokorny, N.J., Weir, S.C., Carreno, R. a, Trevors, J.T., Lee, H., 2002. Influence of temperature on *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in river water samples as detected by tissue culture assay. J. Parasitol. 88, 641-643. doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0641:IOTOCP]2.0.CO;2

Popow-Kraupp, T., Aberle, J.H., 2011. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection. Open Microbiol. J. 5, 128-134. doi:10.2174/1874285801105010128

Poulsen, K.P., Foley, A.L., Collins, M.T., McGuirk, S.M., 2010. Comparison of passive transfer of immunity in neonatal dairy calves fed colostrum or bovine serum-based colostrum replacement and colostrum supplement products. J. Am. Vet. Med. Assoc. 237, 949-954. doi:10.2460/javma.237.8.949

Pourasgari, F., Kaplon, J., Sanchooli, A., Fremy, C., Karimi-Naghlani, S., Otarod, V., Ambert-Balay, K., Mojgani, N., Pothier, P., 2018. Molecular prevalence of bovine noroviruses and neboviruses in newborn calves in Iran. Arch. Virol. 163, 1271-1277.

Prasad, B.V. V, Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., Estes, M.K., 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science 286, 287-290.

Pruimboom-Brees, I.M., Morgan, T.W., Ackermann, M.R., Nystrom, E.D., Samuel, J.E., Cornick, N.A., Moon, H.W., 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* 0157:H7 Shiga toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 10325-10329. doi:10.1073/PNAS.190329997

Quigley, J.D., Strohbehn, R.E., Kost, C.J., O'Brien, M.M., 2001. Formulation of colostrum supplements, colostrum replacers and acquisition of passive immunity in neonatal calves. J. Dairy Sci. 84, 2059-2065. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74650-4

Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., Avendaño, C., Del Cacho, E., Lopez-Bernad, F., 2005. Efficacy of two peroxygen-based disinfectants for inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2479-2483. doi:10.1128/AEM.71.5.2479-2483.2005

Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., Del Cacho, E., Clavel, A., Causapé, A.C., 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). Vet. Parasitol. 66, 139-146.

Quílez, J., Torres, E., Chalmers, R.M., Hadfield, S.J., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C., 2008a. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. Appl. Environ. Microbiol. 74, 6026-6031. doi:10.1128/AEM.00606-08

Quílez, J., Torres, E., Chalmers, R.M., Robinson, G., Del Cacho, E., Sanchez-Acedo, C., 2008b. *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. Parasitology 135, 1613-1620. doi:10.1017/S0031182008005088

R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing.

Rachmadi, A.T., Kitajima, M., Watanabe, K., Yaegashi, S., Serrana, J., Nakamura, A., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Katayama, K., Okabe, S., Sano, D., 2018. Free-chlorine disinfection as a selection pressure on norovirus. Appl. Environ. Microbiol. 84, e00244-18. doi:10.1128/AEM.00244-18

Rajurkar, M.N., Lall, N., Basak, S., Mallick, S.K., 2012. A simple method for demonstrating the giardia lamblia trophozoite. J. Clin. Diagnostic Res. 6, 1492-1494. doi:10.7860/JCDR/2012/4358.2541

Ralston, B.J., McAllister, T.A., Olson, M.E., 2003. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. Vet. Parasitol. 114, 113-122. doi:10.1016/S0304-4017(03)00134-1

Ramig, R.F., 2004. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. J. Virol. 78, 10213-10220. doi:10.1128/jvi.78.19.10213-10220.2004

Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist. Updat. 13, 151-171. doi:10.1016/J.DRUP.2010.08.003

Ramo, A., Quílez, J., Vergara-Castiblanco, C., Monteagudo, L., Cacho, E. Del, Clavel, A., 2015. Multilocus typing and population structure of *Cryptosporidium* from children in Zaragoza, Spain. Infect. Genet. Evol. 31, 190-197. doi:10.1016/j.meegid.2015.01.023

Razakandrainibe, R., Diawara, E.H.I., Costa, D., Le Goff, L., Lemeteil, D., Ballet, J.J., Gargala, G., Favennec, L., 2018. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in France. PLoS Negl. Trop. Dis. 12, e0006355. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0006355

Read, C., Walters, J., Robertson, I.D., Thompson, R.C.A., 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. Int. J. Parasitol. 32, 229-231. doi:10.1080/13518040701205365

Read, C.M., Monis, P.T., Thompson, R.C.A., 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect. Genet. Evol. 4, 125-130. doi:10.1016/J.MEEGID.2004.02.001

Renaud, D.L., Rot, C., Marshall, J., Steele, M.A., 2021. The effect of *Cryptosporidium parvum*, rotavirus, and coronavirus infection on the health and performance of male dairy calves. J. Dairy Sci. 104, 2151-2163. doi:10.3168/JDS.2020-19215

USC UNIVERSIDADE

Reschke, C., Schelling, E., Michel, A., Remy-Wohlfender, F., Meylan, M., 2017. Factors Associated with Colostrum Quality and Effects on Serum Gamma Globulin Concentrations of Calves in Swiss Dairy Herds. J. Vet. Intern. Med. 31, 1563-1571. doi:10.1111/JVIM.14806

Reynolds, D.J., Morgan, J.H., Chanter, N., Jones, P.W., Bridger, J.C., Debney, T.G., Bunch, K.J., 1986. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. Vet. Rec. 119, 34-39.

Rice, D.H., Besser, T.E., Hancock, D.D., 1997. Epidemiology and virulence assessment of *Salmonella* dublin. Vet. Microbiol. 56, 111-124. doi:10.1016/S0378-1135(96)01352-1

Rico Fernández, A., 2020. Factores de riesgo en la diarrea infecciosa del ternero neonato: actuación frente a un brote. Universidade de Santiago de Compostela.

Rieux, A., Chartier, C., Pors, I., Delafosse, A., Paraud, C., 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from high-excreting young dairy calves in dairy cattle herds in Western France. Parasitol. Res. 112, 3423-3431. doi:10.1007/s00436-013-3520-2

Ro, Y., Choi, W., Hong, L., Kim, E., Choe, E., Kim, D., 2022. Comparison of the bovine blood gas parameters produced with three types of portable blood gas analyzers. J. Vet. Sci. 23, e60. doi:10.4142/JVS.22050

Robertson, L.J., Lim, Y.A.L., 2011. Waterborne and Environmentally-Borne Giardiasis, en: Luján, H., Svärd, S. (Eds.), *Giardia*: A Model Organism. Springer-Verlag, Viena, Austria, pp. 29-71.

Robinson, P., Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Lewis, D.E., Shahab, I., Lahoti, S., White, A.C.J., 2001. Expression of IL-15 and IL-4 in IFN-gamma-independent control of experimental human *Cryptosporidium parvum* infection. Cytokine 15, 39-46.

Robison, J.D., Stott, G.H., DeNise, S.K., 1988. Effects of Passive Immunity on Growth and Survival in the Dairy Heifer. J. Dairy Sci. 71, 1283-1287. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(88)79684-8

Rodríguez-Martínez, J.M., Cano, M.E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L., Pascual, Á., 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J. Infect. Chemother. 17, 149-182. doi:10.1007/S10156-010-0120-2

Roeder, B.L., Chengappa, M.M., Nagaraja, T.G., Avery, T.B., Kennedy, G.A., 1987. Isolation of *Clostridium perfringens* from neonatal calves with ruminal and abomasal tympany, abomasitis, and abomasal ulceration. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190, 1550-1555.

Rojas-López, L., Marques, R.C., Svärd, S.G., 2022. *Giardia duodenalis*. Trends Parasitol. 38, 605-606. doi:10.1016/j.pt.2022.01.001

Rollin, R.E., Mero, K.N., Kozisek, P.B., Phillips, R.W., 1986. Diarrhea and malabsorption in calves associated with therapeutic doses of antibiotics: absorptive and clinical changes. Am. J. Vet. Res. 47, 987-991.

Royer, S., 2015. Detection et caracterisation moleculaire de *Cryptosporidium* lors de diarrhees chez le le veau non sevre dans une clientelle allaitante. Université Claude-Bernard - Lyon I.

Ruest, N., Couture, Y., Faubert, G., 1995. Pathogenic potential of *Giardia* infection in cattle. Parasitol. Today 5, 184.

Runnels, P.L., Moon, H.W., Schneider, R.A., 1980. Development of resistance with host age to adhesion of K99+ *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. Infect. Immun. 28, 298-300.

Ryan, U.M., Cacciò, S.M., 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. Int. J. Parasitol. 43, 943-956. doi:10.1016/j.ijpara.2013.06.001

Ryan, U.M., Feng, Y., Fayer, R., Xiao, L., 2021a. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021). Int. J. Parasitol. 51, 1099-1119. doi:10.1016/J.IJPARA.2021.08.007

Ryan, U.M., Zahedi, A., 2019. Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary perspective. Adv. Parasitol. 106, 209-254. doi:10.1016/BS.APAR.2019.07.002

Ryan, U.M., Zahedi, A., Feng, Y., Xiao, L., 2021b. An update on zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes in humans. Animals 11, 1-22. doi:10.3390/ani11113307

Rycroft, A.N., 2013. Structure, Function and Synthesis of Surface Polysaccharides in *Salmonella*, en: Barrow, P., Methner, U. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CAB International, Wallingford, Reino Unido, pp. 20-37.

Ryu, J.-H., Kim, S., Park, J., Choi, K.-S., 2020a. Characterization of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from pre-weaned calves in the Republic of Korea. Acta Vet. Scand. 62, 45. doi:10.1186/s13028-020-00543-1

Ryu, J.-H., Shin, S.-U., Choi, K.-S., 2020b. Molecular surveillance of viral pathogens associated with diarrhea in pre-weaned Korean native calves. Trop. Anim. Health Prod. 52, 1811-1820. doi:10.1007/s11250-019-02181-w/Published

Saif, L.J., Redman, D.R., Smith, K.L., Theil, K.W., 1983. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or nonimmunized cows. Infect. Immun. 41, 1118-1131. doi:10.1128/iai.41.3.1118-1131.1983

Saif, L.J., Smith, K.L., Landmeier, B.J., Bohl, E.H., Theil, K.W., Todhunter, D.A., 1984. Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization. Am. J. Vet. Res. 45, 49-58.

Sánchez, R.O., Romero, J.R., Founroge, R.D., 2008. Dynamics of *Eimeria* oocyst excretion in dairy calves in the Province of Buenos Aires (Argentina), during their first 2 months of age. Vet. Parasitol. 151, 133-138. doi:10.1016/J.VETPAR.2007.11.003

Sanderson, K.E., Nair, S., 2013. Taxonomy and Species Concepts in the Genus *Salmonella*, en: Barrow, P.A., Methner, U. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CAB International, Wallingford, Reino Unido, pp. 1-19.

Sandhu, K.S., Gyles, C.L., 2002. Pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the intestine of calves. Can. J. Vet. Res. 66, 65.

Sandine, W.E., 1979. Roles of *Lactobacillus* in the Intestinal Tract. J. Food Prot. 42, 259-262. doi:10.4315/0362-028x-42.3.259

Santin, M., 2020. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Ruminants. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 36, 223-238. doi:10.1016/J.CVFA.2019.11.005

Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. Vet. Parasitol. 155, 15-23. doi:10.1016/J.VETPAR.2008.04.018

Santín, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Vet. Parasitol. 122, 103-117. doi:10.1016/J.VETPAR.2004.03.020

Santín, M., Zarlenga, D.S., 2009. A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish *Cryptosporidium* species of veterinary and public health concern in cattle. Vet. Parasitol. 166, 32-37. doi:10.1016/J.VETPAR.2009.07.039

Santoro, A., Dorbek-Kolin, E., Jeremejeva, J., Tummeleht, L., Orro, T., Jokelainen, P., Lassen, B., 2019. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in calves in Estonia: High prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding and 10 subtypes identified. Parasitology 146, 261-267. doi:10.1017/S0031182018001348

Sawant, A.A., Sordillo, L.M., Jayarao, B.M., 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. J. Dairy Sci. 88, 2991-2999. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(05)72979-9

Sayers, R.G., Kennedy, A., Krump, L., Sayers, G.P., Kennedy, E., 2016. An observational study using blood gas analysis to assess neonatal calf diarrhea and subsequent recovery with a European Commission-compliant oral electrolyte solution. J. Dairy Sci. 99, 4647-4655. doi:10.3168/jds.2015-10600

Schaechter, M., 2009. *Escherichia Coli*, en: Schaechter, M. (Ed.), Encyclopedia of Microbiology. Elsevier Inc., San Diego, California, EE.UU., pp. 125-132.

Schulz, S., Green, C.K., Yuen, P.S.T., Garbers, D.L., 1990. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. Cell 63, 941-948. doi:10.1016/0092-8674(90)90497-3

Schumann, F.J., Townsend, H.G., Naylor, J.M., 1990. Risk factors for mortality from diarrhea in beef calves in Alberta. Can. J. Vet. Res. 54, 366-372.

Scott, P.R., Hall, G.A., Jones, P.W., Morgan, J.H., 2004. Calf Diarrhoea, en: Andrews, A.H., Blowey, R.W., Boyd, H., Eddy, R.G. (Eds.), Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle. Blackwell Science Ltd., Oxford, Reino Unido, pp. 185-214.

Segura, R., Prim, N., Montemayor, M., Valls, M.E., Muñoz, C., 2015. Predominant Virulent IbA10G2 Subtype of *Cryptosporidium hominis* in Human Isolates in Barcelona: A Five-Year Study. PLoS One 10, e0121753. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0121753

Sellers, Z.M., Childs, D., Chow, J.Y.C., Smith, A.J., Hogan, D.L., Isenberg, J.I., Dong, H., Barrett, K.E., Pratha, V.S., 2004. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* stimulates a non-CFTR-mediated duodenal bicarbonate secretory pathway. Am. J. Physiol. Liver Physiol. 288, G654-G663. doi:10.1152/ajpgi.00386.2004

Seppä-Lassila, L., Orro, T., Lassen, B., Lasonen, R., Autio, T., Pelkonen, S., Soveri, T., 2015. Intestinal pathogens, diarrhoea and acute phase proteins in naturally infected dairy calves. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 41, 10-16.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

doi:10.1016/J.CIMID.2015.05.004

Shahrani, M., Dehkordi, F.S., Momtaz, H., 2014. Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran. Biol. Res. 47, 1-13. doi:10.1186/0717-6287-47-28

Shams, Z., Tahamtan, Y., Pourbakhsh, A., 2012. Detection of enterotoxigenic K99 (F5) and F41 from fecal sample of calves by molecular and serological methods. Comp. Clin. Path. 21, 475-478. doi:10.1007/s00580-010-1122-2

Sharma, K., Taku, A.K., Malik, A., Bhat, M.A., Javed, R., Badroo, G.A., Kour, A., 2017. Molecular characterization and antimicrobial profiling of *Escherichia coli* isolates from diarrheic calves. Indian J. Anim. Sci. 87, 1467-1471. doi:10.56093/ijans.v87i12.79782

Sharpee, R.L., Mebus, C.A., Bass, E.P., 1976. Characterization of a calf diarrheal coronavirus. Am. J. Vet. Res. 37, 1031-1041.

Shi, Z., Wang, W., Chen, C., Zhang, X., Wang, J., Xu, Z., Lan, Y., 2020. First report and genetic characterization of bovine torovirus in diarrhoeic calves in China. BMC Vet. Res. 16. doi:10.1186/S12917-020-02494-1

Shull, J.J., Frederick, H.M., 1978. Adverse effect of oral antibacterial prophylaxis and therapy on incidence of neonatal calf diarrhea. Vet Med Small Anim Clin. 73, 924-930.

Signorini, M.L., Soto, L.P., Zbrun, M. V., Sequeira, G.J., Rosmini, M.R., Frizzo, L.S., 2012. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. Res. Vet. Sci. 93, 250-258. doi:10.1016/j.rvsc.2011.05.001

Silverlås, C., De Verdier, K., Emanuelson, U., Mattsson, J.G., Björkman, C., 2010. *Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrhoeal problems. Parasitol. Res. 107, 1435-1444. doi:10.1007/s00436-010-2020-x

Silvestro, L., Caputo, M., Blancato, S., Decastelli, L., Fioravanti, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Caprioli, A., 2004. Asymptomatic carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in farm workers in Northern Italy. Epidemiol. Infect. 132, 915-919. doi:10.1017/S0950268804002390

Sineiro García, F., Santiso Blanco, J.A., Calcedo Ordoñez, V., Lorenzana Fernández, R., 2009. El sector lácteo, escenarios de evolución.

Sischo, W.M., Atwill, E.R., Lanyon, L.E., George, J., 2000. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. Prev. Vet. Med. 43, 253-267.

Sjöling, Å., Wiklund, G., Savarino, S.J., Cohen, D.I., Svennerholm, A.M., 2007. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. J. Clin. Microbiol. 45, 3295-3301. doi:10.1128/JCM.00471-07

Smiley, J.R., Chang, K.O., Hayes, J., Vinjé, J., Saif, L.J., 2002. Characterization of an Enteropathogenic Bovine Calicivirus Representing a Potentially New Calicivirus Genus. J. Virol. 76, 10089-10098. doi:10.1128/jvi.76.20.10089-10098.2002

Smiley, J.R., Hoet, A.E., Tråvén, M., Tsunemitsu, H., Saif, L.J., 2003. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. J. Clin. Microbiol. 41, 3089-3099. doi:10.1128/JCM.41.7.3089-3099.2003

Smith, B.P., 2015a. Salmonellosis in Ruminants, en: Smith, B.P. (Ed.), Large Animal Internal Medicine. Elsevier Inc., St. Louis, Misuri, EE.UU., pp. 830-834.

Smith, D.R., 2012. Field Disease Diagnostic Investigation of Neonatal Calf Diarrhea. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 28, 465-481.

Smith, G., 2015b. Antimicrobial decision making for enteric diseases of cattle. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 31, 47-60. doi:10.1016/J.CVFA.2014.11.004

Smith, G., Berchtold, J., 2014. Fluid therapy in calves. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. Anim. Pract. 30, 409-427. doi:10.1136/inp.i4668

Smith, G.W., 2009. Treatment of Calf Diarrhea: Oral Fluid Therapy. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 25, 55-72. doi:10.1016/j.cvfa.2008.10.006

Smith, H., 2008. Diagnosis, en: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU., pp. 173-208.

Smith, R.P., Clifton-Hadley, F.A., Cheney, T., Giles, M., 2014. Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. Vet. Parasitol. 204, 111-119.

doi:10.1016/j.vetpar.2014.05.022

Smith, T., Orcutt, M.L., 1925. The bacteriology of the intestinal tract of young calves with special reference to the early diarrhea («Scours»). J. Exp. Med. 41, 89.

Smith, H. V., Nichols, R.A.B., Mallon, M., Macleod, A., Tait, A., Reilly, W.J., Browning, L.M., Gray, D., Reid, S.W.J., Wastling, J.M., 2005. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. Vet. Rec. 156, 710-711. doi:10.1136/VR.156.22.710

Smith, H. V., Paget, T., 2007. *Giardia*, en: Simjee, S. (Ed.), Foodborne Diseases. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, EE.UU., pp. 303-336. doi:10.1007/978-1-59745-501-5_11

Snijder, E.J., Horzinek, M.C., 1993. Toroviruses: replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. J. Gen. Virol. 74, 2305-2316.

Snodgrass, D.R., Fitzgerald, T., Campbell, I., Scott, F.M., Browning, G.F., Miller, D.L., Herring, A.J., Greenberg, H.B., 1990. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. J. Clin. Microbiol. 28, 504-507.

Soilán, M., 2014. Criptosporidiosis en rumiantes domésticos de Galicia: análisis genotípico y subgenotípico. Universidade de Santiago de Compostela.

Steele, M.L., Mcnab, W.B., Poppe, C., Griffiths, M.W., Chen, S., Degrandis, S.A., Fruhner, L.C., Larkin, C.A., Lynch, J.A., Odumeru, J.A., 1997. Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens. J. Food Prot. 60, 1341-1346. doi:10.4315/0362-028X-60.11.1341

Stensvold, C.R., Ethelberg, S., Hansen, L., Sahar, S., Voldstedlund, M., Kemp, M., Hartmeyer, G.N., Otte, E., Engsbro, A.L., Nielsen, H.V., Mølbak, K., 2015. *Cryptosporidium* infections in Denmark, 2010-2014. Dan. Med. J. 62, A5086.

Stevens, M.P., Humphrey, T.J., Maskell, D.J., 2009. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 2708-2723. doi:10.1098/rstb.2009.0094

Stewart, S., Godden, S.M., Bey, R., Rapnicki, P., Fetrow, J., Farnsworth, R., Scanlon, M., Arnold, Y., Clow, L., Mueller, K., Ferrouillet, C., 2005. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. J. Dairy Sci. 88, 2571-2578. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72933-7

Stinear, T., Matusan, A., Hines, K., Sandery, M., 1996. Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental water concentrates by reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3385-3390. doi:10.1128/AEM.62.9.3385-3390.1996

Stipp, D.T., Barry, A.F., Alfieri, A.F., Takiuchi, E., Amude, A.M., Alfieri, A.A., 2009. Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assay in faeces of calves from Brazilian cattle herds. Trop. Anim. Health Prod. 41, 1563-1567. doi:10.1007/S11250-009-9347-2

Storz, J., Leary, J.J., Carlson, J.H., Bates, R.C., 1978. Parvoviruses associated with diarrhea in calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 173, 624–627.

Streeter, R.N., Hoffsis, G.F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W.P., Rings, D.M., 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am. J. Vet. Res. 56, 1322-1324.

Strong, W.B., Gut, J., Nelson, R.G., 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. Infect. Immun. 68, 4117-4134. doi:10.1128/IAI.68.7.4117-4134.2000

Sulaiman, I.M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R.H., Trout, J.M., Schantz, P.M., Das, P., Lal, A.A., Xiao, L., 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. Emerg. Infect. Dis. 9, 1444-1452. doi:10.3201/EID0911.030084

Sulaiman, I.M., Hira, P.R., Zhou, L., Al-Ali, F.M., Al-Shelahi, F.A., Shweiki, H.M., Iqbal, J., Khalid, N., Xiao, L., 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. J. Clin. Microbiol. 43, 2805-2809. doi:10.1128/JCM.43.6.2805-2809.2005

Suttle, N.F., Angus, K.W., 1976. Experimental copper deficiency in the calf. J. Comp. Pathol. 86, 595-608. doi:10.1016/0021-9975(76)90068-2

Svärd, S.G., Hagblom, P., Palm, J.E.D., 2003. *Giardia lamblia* - a model organism for eukaryotic cell differentiation. FEMS Microbiol. Lett. 218, 3-7.

Svensson, C., 1998. Prevention of *Eimeria alabamensis* coccidiosis by a long-acting baquiloprim/sulphadimidine bolus. Vet. Parasitol. 74, 143-152. doi:10.1016/S0304-4017(97)00154-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4

Svensson, C., Hultgren, J., 2008. Associations between housing, management, and morbidity during rearing and subsequent first-lactation milk production of dairy cows in southwest Sweden. J. Dairy Sci. 91, 1510-1518. doi:10.3168/JDS.2007-0235

Svensson, C., Lundborg, K., Emanuelson, U., Olsson, S.O., 2003. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. Prev. Vet. Med. 58, 179-197. doi:10.1016/S0167-5877(03)00046-1

Svensson, C., Olofsson, H., 1996. *Eimeria alabamensis* coccidiosis in grazing calves: control by a long-acting baquiloprim/sulphadimidine bolus. Appl. Parasitol. 37, 168-176.

Swan, H., Godden, S.M., Bey, R., Wells, S., Fetrow, J., Chester-Jonest, H., 2007. Passive transfer of immunoglobulin G and preweaning health in Holstein calves fed a commercial colostrum replacer. J. Dairy Sci. 90, 3857-3866. doi:10.3168/jds.2007-0152

Sweeney, R.W., 1999. Treatment of Potassium Balance Disorders. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 15, 609-617. doi:10.1016/S0749-0720(15)30166-3

Swiatek, D.L., Palombo, E.A., Lee, A., Coventry, M.J., Britz, M.L., Kirkwood, C.D., 2010. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. Vet. Microbiol. 140, 56-62. doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.020

Taghipour, A., Sharbatkhori, M., Tohidi, F., Ghanbari, M.R., Karanis, P., Olfatifar, M., Majidiani, H., Khazaei, S., Bahadory, S., Javanmard, E., 2022. Global prevalence of *Giardia duodenalis* in cattle: A systematic review and meta-analysis. Prev. Vet. Med. 203, 105632. doi:10.1016/j.prevetmed.2022.105632

Taha, S., Nguyen-Ho-Bao, T., Berberich, L.M., Gawlowska, S., Daugschies, A., Rentería-Solís, Z., 2023. Interplay between *Eimeria acervulina* and *Cryptosporidium parvum* during In Vitro Infection of a Chicken Macrophage Cell Line (HD11). Life 13, 1267. doi:10.3390/life13061267

Taminelli, V., Eckert, J., Sydler, T., Gottstein, B., Corboz, L., Hofmann, M., 1989. Experimental infection of calves and sheep with bovine *Giardia* isolates. Schweizer Arch. fur Tierheilkunde. 131, 551-564.

Taubert, A., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Jimenez, C.A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2010. Microarray-based transcriptional profiling of *Eimeria bovis*-infected bovine endothelial host cells. Vet. Res. 41. doi:10.1051/vetres/2010041

Taylor, J.D., Rodenburg, M., Snider, T.A., 2017. Comparison of a commercially available oral nutritional supplement and intravenous fluid therapy for dehydration in dairy calves. J. Dairy Sci. 100, 4839-4846. doi:10.3168/jds.2016-12198

Taylor, M.A., Bartram, D.J., 2012. The history of decoquinate in the control of coccidial infections in ruminants. J. Vet. Pharmacol. Ther. 35, 417-427. doi:10.1111/j.1365-2885.2012.01421.x

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2016. Veterinary Parasitology, 4ª. ed. Wiley-Blackwell, Chichester, Reino Unido.

Taylor, R.J., Burrows, M.R., 1971. The Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* Dublin in Slurry on Pasture and the Infectivity of *S.* Dublin for Grazing Calves. Br. Vet. J. 127, 536-543. doi:10.1016/S0007-1935(17)37287-1

Teneberg, S., Willemsen, P.T.J., de Graaf, F.K., Karlsson, K.-A., 1993. Calf small intestine receptors for K99 fimbriated enterotoxeginic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 109, 107-112.

Tenhagen, B.A., Käsbohrer, A., Grobbel, M., Hammerl, J., Kaspar, H., 2020. Antimicrobial resistance in *E. coli* from different cattle populations in Germany. Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere. Nutztiere. 48, 218-227. doi:10.1055/A-1197-5701

Thompson, H.P., Dooley, J.S.G., Kenny, J., McCoy, M., Lowery, C.J., Moore, J.E., Xiao, L., 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. Parasitol. Res. 100, 619-624. doi:10.1007/S00436-006-0305-X/FIGURES/4

Thompson, R.C.A., Monis, P.T., 2004. Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. Adv. Parasitol. 58, 69-137. doi:10.1016/S0065-308X(04)58002-8

Thompson, S.M.R., Black, W.D., 1978. A study of the influence of the method of oral administration of ampicillin upon plasma drug levels in calves. Can. J. Comp. Med. 42, 255-259.

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. Vet. Res. 48,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

42. doi:10.1186/s13567-017-0447-0

Thornton, S.A., West, A.H., DuPont, H.L., Pickering, L.K., 1983. Comparison of methods for identification of *Giardia lamblia*. Am. J. Clin. Pathol. 80, 858-860. doi:10.1093/ajcp/80.6.858

Timmerman, H.M., Mulder, L., Everts, H., Van Espen, D.C., Van Der Wal, E., Klaassen, G., Rouwers, S.M.G., Hartemink, R., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. J. Dairy Sci. 88, 2154-2165. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72891-5

Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M., Euzéby, J.P., 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 521-524. doi:10.1099/ijs.0.63580-0

Todd, C.G., Millman, S.T., McKnight, D.R., Duffield, T.F., Leslie, K.E., 2010. Nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy for neonatal calf diarrhea complex: Effects on calf performance. J. Anim. Sci. 88, 2019-2028. doi:10.2527/jas.2009-2340

Tomazic, M.L., Maidana, J., Dominguez, M., Uriarte, E.L., Galarza, R., Garro, C., Florin-Christensen, M., Schnittger, L., 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. Vet. Parasitol. 198, 382-386. doi:10.1016/J.VETPAR.2013.09.022

Torres-Medina, A., Schlafer, D.H., Mebus, C.A., 1985. Rotaviral and Coronaviral Diarrhea. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 1, 471-493.

Torres, J., Gracenea, M., Gómez, M.S., Arrizabalaga, A., González-Moreno, O., 2000. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. Vet. Parasitol. 92, 253-260. doi:10.1016/S0304-4017(00)00331-9

Torsein, M., Lindberg, A., Sandgren, C.H., Waller, K.P., Törnquist, M., Svensson, C., 2011. Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds. Prev. Vet. Med. 99, 136-147. doi:10.1016/j.prevetmed.2010.12.001

Tråvén, M., Axén, C., Svensson, A., Björkman, C., Emanuelson, U., 2022. Prevalence of Bovine Norovirus and Nebovirus and Risk Factors of Infection in Swedish Dairy Herds. Dairy 3, 137-147. doi:10.3390/dairy3010011

Trefz, F.M., Lorch, A., Feist, M., Sauter-Louis, C., Lorenz, I., 2012a. Metabolic Acidosis in Neonatal Calf Diarrhea-Clinical Findings and Theoretical Assessment of a Simple Treatment Protocol. J. Vet. Intern. Med. 26, 162-170. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.00848.x

Trefz, F.M., Lorch, A., Feist, M., Sauter-Louis, C., Lorenz, I., 2012b. Construction and validation of a decision tree for treating metabolic acidosis in calves with neonatal diarrhea. BMC Vet. Res. 8, 238. doi:10.1186/1746-6148-8-238

Troeger, H., Epple, H.J., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, G.D., Jelinek, T., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.D., 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. Gut 56, 328-335. doi:10.1136/gut.2006.100198

Trojnar, E., Sachsenroder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P.H., Johne, R., 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. J. Gen. Virol. 94, 136-142.

Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Martin, S.W., Leslie, K.E., Peregrine, A.S., 2005. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. Can. Vet. J. 46, 349.

Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Peregrine, A.S., Duffield, T.F., Leslie, K.E., 2011. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. Vet. Rec. 168, 509. doi:10.1136/vr.d1492

Trotz-Williams, L.A., Martin, D.S., Gatei, W., Cama, V., Peregrine, A.S., Martin, S.W., Nydam, D.V., Jamieson, F., Xiao, L., 2006. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. Parasitol. Res. 99, 346-352. doi:10.1007/s00436-006-0157-4

Trotz-Williams, L.A., Martin, S.W., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D. V., Peregrine, A.S., 2008. Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. Prev. Vet. Med. 83, 11-23. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.03.001

Trotz-Williams, L.A., Martin, S.W., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D. V., Peregrine, A.S., 2007. Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. Prev. Vet. Med. 82, 12-28. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.05.003

Trout, J.M., Santín, M., Fayer, R., 2007. Prevalence of

Giardia duodenalis genotypes in adult dairy cows. Vet. Parasitol. 147, 205-209. doi:10.1016/J.VETPAR.2007.05.014

Tsolis, R.M., Adams, L.G., Ficht, T.A., Bäumler, A.J., 1999. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. Infect. Immun. 67, 4879-4885. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01508.x

Tsukano, K., Kato, S., Sarashina, S., Abe, I., Ajito, T., Ohtsuka, H., Suzuki, K., 2017. Effect of acetate Ringer's solution with or without 5% dextrose administered intravenously to diarrheic calves. J. Vet. Med. Sci. 79, 795-800. doi:10.1292/jvms.16-0297

Tsunemitsu, H., Smith, D.R., Saif, L.J., 1999. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. Arch. Virol. 144, 167-175. doi:10.1007/S007050050493

Tung, G., Macinga, D., Arbogast, J., Jaykus, L.A., 2013. Efficacy of Commonly Used Disinfectants for Inactivation of Human Noroviruses and Their Surrogates. J. Food Prot. 76, 1210-1217. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-532

Turan, T., Işıdan, H., Atasoy, M.O., Irehan, B., 2018. Detection and molecular analysis of bovine enteric norovirus and nebovirus in Turkey. J. Vet. Res. 62, 129-135. doi:10.2478/jvetres-2018-0021

Tzipori, S., Sherwood, D., Angus, K.W., Campbell, I., Gordon, M., 1981. Diarrhea in lambs: experimental infections with enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus, and *Cryptosporidium* sp. Infect. Immun. 33, 401-406. doi:10.1128/IAI.33.2.401-406.1981

Tzipori, S., Smith, M., Halpin, C., Makin, T., Krautil, F., 1983. Intestinal changes associated with rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in calves. Vet. Microbiol. 8, 35-43. doi:10.1016/0378-1135(83)90017-2

Uetake, K., 2013. Newborn calf welfare: A review focusing on mortality rates. Anim. Sci. J. 84, 101. doi:10.1111/ASJ.12019

Umpiérrez, A., Bado, I., Oliver, M., Acquistapace, S., Etcheverría, A., Padola, N.L., Vignoli, R., Zunino, P., 2017. Zoonotic Potential and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* in Neonatal Calves in Uruguay. Microbes Environ. 32, 275-282. doi:10.1264/JSME2.ME17046

Upton, S.J., Current, W.L., 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. J Parasitol. 71, 625-629.

Urie, N.J., Lombard, J.E., Shivley, C.B., Kopral, C.A., Adams, A.E., Earleywine, T.J., Olson, J.D., Garry, F.B., 2018. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. J. Dairy Sci. 101, 9229-9244. doi:10.3168/jds.2017-14019

USDA, 2018. Dairy 2014: Health and Management Practices on U.S. Dairy Operations, 2014. USDA–APHIS–VS–CEAH–NAHMS, Fort Collins, Colorado, EE.UU.

Usonis, V., Ivaskeviciene, I., Desselberger, U., Rodrigo, C., 2012. The unpredictable diversity of co-circulating rotavirus types in Europe and the possible impact of universal mass vaccination programmes on rotavirus genotype incidence. Vaccine 30, 4596-4605. doi:10.1016/J.VACCINE.2012.04.097

Valigurová, A., Jirků, M., Koudela, B., Gelnar, M., Modrý, D., Šlapeta, J., 2008. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. Int. J. Parasitol. 38, 913-922. doi:10.1016/j.ijpara.2007.11.003

van Belkum, A., Burnham, C.A.D., Rossen, J.W.A., Mallard, F., Rochas, O., Dunne, W.M., 2020. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. Nat. Rev. Microbiol. 18, 299-311. doi:10.1038/s41579-020-0327-x

van der Poel, W.H.M., van der Heide, R., Verschoor, F., Gelderblom, H., Vinjé, J., Koopmans, M.P.G., 2003. Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. Vet. Microbiol. 92, 297-309.

Van Duijkeren, E., Schink, A.-K., Roberts, M.C., Wang, Y., Schwarz, S., 2018. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Microbiol. Spectr. 6, ARBA-0019-2017. doi:10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0019-2017

van Mol, W., Clinquart, J., Pas, M.L., Bokma, J., Pardon, B., 2022. Pathogen-oriented approaches for neonatal calf diarrhea. Vlaams Diergeneeskd. Tijdschr. 91, 167-181. doi:10.21825/VDT.85202

Vanopdenbosch, E., Wellemans, G., 1989. Birna-type virus in diarrhoeic calf faeces. Vet. Rec. 125, 610.

Vasseur, E., Rushen, J., de Passillé, A.M., 2009. Does a calf's motivation to ingest colostrum depend on time since birth, calf vigor, or provision of heat? J. Dairy Sci. 92, 3915-3921. doi:10.3168/JDS.2008-1823

Vermunt, J.J., 1994. Rearing and management of diarrhoea in calves to weaning. Aust. Vet. J. 71, 33-41. doi:10.1111/J.1751-0813.1994.TB06149.X

Viidu, D.A., Mõtus, K., 2022. Implementation of a pre-calving vaccination programme against rotavirus, coronavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* (F5) and association with dairy calf survival. BMC Vet. Res. 18. doi:10.1186/S12917-022-03154-2

Villabruna, N., Koopmans, M.P.G., De Graaf, M., 2019. Animals as Reservoir for Human Norovirus. Viruses 11, 478. doi:10.3390/v11050478

Vlasova, A.N., Saif, L.J., 2021a. Bovine Immunology: Implications for Dairy Cattle. Front. Immunol. 12, 643206. doi:10.3389/FIMMU.2021.643206/BIBTEX

Vlasova, A.N., Saif, L.J., 2021b. Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. Front. Vet. Sci. 8, 643220. doi:10.3389/fvets.2021.643220

Volpato, A., Fortuoso, B.F., Campigotto, G., Glombowsky, P., Bottari, N.B., Lopes, L.S., Da Silva, A.S., 2018. Secnidazole for control of giardiasis in dairy calves. Exp. Parasitol. 189, 16-18. doi:10.1016/j.exppara.2018.04.008

Von Baum, H., Marre, R., 2005. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. Int. J. Med. Microbiol. 295, 503-511. doi:10.1016/J.IJMM.2005.07.002

Wagner, R.D., Johnson, S.J., Cerniglia, C.E., 2008. In vitro model of colonization resistance by the enteric microbiota: Effects of antimicrobial agents used in food-producing animals. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 1230-1237. doi:10.1128/AAC.00852-07

Walker, P.., Constable, P.D., Morin, D.E., Foreman, J.H., Drackley, J.K., Thurmon, J.C., 1998. Comparison of hypertonic saline-dextran solution and lactated Ringer's solution for resuscitating severely dehydrated calves with diarrhea. J. Am. Vet. Med. Assoc. 213, 113-121.

Wang, R., Wang, H., Sun, Y., Zhang, L., Jian, F., Qi, M., Ning, C., Xiao, L., 2011. Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan, China. J. Clin. Microbiol. 49, 1077-1082. doi:10.1128/JCM.02194-10

Wang, R., Zhao, G., Gong, Y., Zhang, L., 2017a. Advances and perspectives on the epidemiology of bovine *Cryptosporidium* in China in the past 30 years. Front. Microbiol. 8, 1823. doi:10.3389/FMICB.2017.01823

Wang, X., Cai, M., Jiang, W., Wang, Y., Jin, Y., Li, N., Guo, Y., Feng, Y., Xiao, L., 2017b. High genetic diversity of *Giardia duodenalis* assemblage E in pre-weaned dairy calves in Shanghai, China, revealed by multilocus genotyping. Parasitol. Res. 116, 2101-2110. doi:10.1007/s00436-017-5509-8

Wanyiri, J., Ward, H., 2006. Molecular basis of *Cryptosporidium*–host cell interactions: recent advances and future prospects. Future Microbiol. 1, 201-208.

Weaver, D.M., Tyler, J.W., VanMetre, D.C., Hostetler, D.E., Barrington, G.M., 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. J. Vet. Intern. Med. 14, 569-577. doi:10.1111/J.1939-1676.2000.TB02278.X

Wegayehu, T., Adamu, H., Petros, B., 2013. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* species infections among children and cattle in North Shewa Zone, Ethiopia. BMC Infect. Dis. 13, 1-7. doi:10.1186/1471-2334-13-419/TABLES/4

Weiss, M., Horzinek, M.C., 1986. Resistance of Berne virus to physical and chemical treatment. Vet. Microbiol. 11, 41-49.

Weldon, A.D., Moise, N.S., Rebhun, W.C., 1992. Hyperkalemic Atrial Standstill in Neonatal Calf Diarrhea. J. Vet. Intern. Med. 6, 294-297. doi:10.1111/J.1939-1676.1992.TB00354.X

Wetzel, D.M., Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M.S., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2005. Gliding Motility Leads to Active Cellular Invasion by *Cryptosporidium parvum* Sporozoites. Infect. Immun. 73, 5379-5387. doi:10.1128/IAI.73.9.5379

Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., 2022. dplyr: A Grammar of Data Manipulation.

Widdowson, M.A., Rockx, B., Schepp, R., Van Der Poel, W.H.M., Vinje, J., Van Duynhoven, Y.T., Koopmans, M.P., 2005. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. J. Med. Virol. 76, 119-128. doi:10.1002/JMV.20333

Wieler, L.H., Bauerfeind, R., Baljer, G., 1992. Characterization of Shiga-like Toxin Producing *Escherichia coli* (SLTEC) Isolated from Calves with and without Diarrhoea. Zentralblatt für Bakteriol. 276, 243-253. doi:10.1016/S0934-8840(11)80011-3

Wieler, L.H., Sobjinski, G., Schlapp, T., Failing, K.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Weiss, R., Menge, C., Baljer, G., 2007. Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 120, 296-306. doi:10.2376/0005-9366-120-296

Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K.O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J.M., Green, K.Y., Virgin IV, H.W., 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. PLoS Biol. 2. doi:10.1371/journal.pbio.0020432

Woode, G.N., 1990. Breda Virus, en: Dinter, Z., Morein, B. (Eds.), Virus Infections of Ruminants. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Países Bajos, pp. 311-316.

Woode, G.N., 1987. Breda and Breda-like viruses: diagnosis, pathology and epidemiology. Ciba Found. Symp. 128, 175-191.

Woode, G.N., 1982. Etiology of enteric viral infections of calves: pathological and clinical aspects, en: 12th World Congress on Cattle Diseases. Utrecht, Países Bajos, pp. 201-208.

Woode, G.N., Bridger, J.C., 1978. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. J. Med. Microbiol. 11, 441-452.

Woode, G.N., Pohlenz, J.F., Kelso Gourley, N.E., Fagerland, J.A., 1984. Astrovirus and breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. J. Clin. Microbiol. 19, 623-630. doi:10.1128/jcm.19.5.623-630.1984

Woode, G.N., Reed, D.E., Runnels, P.L., Herrig, M.A., Hill, H.T., 1982. Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves. Vet. Microbiol. 7, 221-240. doi:10.1016/0378-1135(82)90036-0

Woode, G.N., Saif, L.J., Quesada, M., Winand, N.J., Pohlenz, J.F., Gourley, N.K., 1985. Comparative studies on three isolates of Breda virus of calves. Am. J. Vet. Res. 46, 1003-1010.

Wray, C., Todd, J.N., Hinton, M., 1987. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* infection in calves: excretion of *S. typhimurium* in the faeces of calves in different management systems. Vet. Rec. 121, 293-296. doi:10.1136/VR.121.13.293

Wu, G., Mafura, M., Carter, B., Lynch, K., Anjum, M.F., Woodward, M.J., Pritchard, G.C., 2010. Genes associated with *Escherichia coli* isolates from calves with diarrhoea and/or septicaemia. Vet. Rec. 166, 691-692. doi:10.1136/vr.b4791

Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. Exp. Parasitol. 124, 80-89. doi:10.1016/j.exppara.2009.03.018

Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H., Lal, A.A., 2001. Identification of 5 Types of *Cryptosporidium* Parasites in Children in Lima, Peru. J. Infect. Dis. 183, 492-497. doi:10.1086/318090

Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R., Lal, A.A., 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1578-1583. doi:10.1128/AEM.65.4.1578-1583.1999

Xiao, L., Feng, Y., 2017. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. Food Waterborne Parasitol. 8-9, 14-32. doi:10.1016/J.FAWPAR.2017.09.002

Xiao, L., Herd, R.P., 1994. Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. Vet. Parasitol. 55, 257-262. doi:10.1016/0304-4017(93)00645-F

Xiao, L., Herd, R.P., McClure, K.E., 1994. Periparturient rise in the excretion of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium* parvum oocysts as a source of infection for lambs. J. Parasitol. 80, 55-59. doi:Doi 10.2307/3283345

Xiao, L., Herd, R.P., Rings, D.M., 1993. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. Vet. Parasitol. 51, 41-48. doi:10.1016/0304-4017(93)90194-R

Xiao, L., Ryan, U.M., 2008. Molecular epidemiology, en: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU., pp. 119-172.

Xiao, L., Saeed, K., Herd, R.P., 1996. Efficacy of albendazole and fenbendazole against *Giardia* infection in cattle. Vet. Parasitol. 61, 165-170. doi:10.1016/0304-4017(95)00802-0

Xiao, L., Zhou, L., Santin, M., Yang, W., Fayer, R., 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. Parasitol. Res. 100, 701-706. doi:10.1007/S00436-006-0337-2

Yamagishi, J., Sato, Y., Shinozaki, N., Ye, B., Tsuboi, A., Nagasaki, M., Yamashita, R., 2016. Comparison of Boiling and Robotics Automation Method in DNA Extraction for Metagenomic

Sequencing of Human Oral Microbes. PLoS One 11, e0154389. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0154389

Yang, X., Guo, Y., Xiao, L., Feng, Y., 2021. Molecular Epidemiology of Human Cryptosporidiosis in Low- and Middle-Income Countries. Clin. Microbiol. Rev. 34, 1-26. doi:10.1128/CMR.00087-19

Younis, E.E., Ahmed, A.M., El-Khodery, S.A., Osman, S.A., El-Naker, Y.F.I., 2009. Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in diarrheic neonatal calves in Egypt. Res. Vet. Sci. 87, 373-379. doi:10.1016/J.RVSC.2009.04.006

Zahedi, A., Field, D., Ryan, U.M., 2017. Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland – first report of Assemblage E. Parasitology 144, 1154-1161. doi:10.1017/S0031182017000439

Zambriski, J.A., Nydam, D. V, Wilcox, Z.J., Bowman, D.D., Mohammed, H.O., Liotta, J.L., 2013. *Cryptosporidium parvum*: Determination of ID 50 and the dose-response relationship in experimentally challenged dairy calves. Vet. Parasitol. 197, 104-112. doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.022

Zhang, K., Wu, Y., Jing, B., Xu, C., Chen, Y., Yu, F., Wei, Z., Zhang, Y., Cui, Z., Qi, M., Zhang, L., 2022. Seasonal monitoring of *Cryptosporidium* species and their genetic diversity in neonatal calves on two large-scale farms in Xinjiang, China. J. Eukaryot. Microbiol. 69, e12878. doi:10.1111/JEU.12878

Zheng, D.-P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology 346, 312-323.

Zonta, W., Mauroy, A., Farnir, F., Thiry, E., 2016. Comparative Virucidal Efficacy of Seven Disinfectants Against Murine Norovirus and Feline Calicivirus, Surrogates of Human Norovirus. Food Environ. Virol. 8, 1-12. doi:10.1007/S12560-015-9216-2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

9. ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO I: Concentraciones de cada antibiótico utilizadas en la tarjeta AST-GN96

Antibiótico	**Concentraciones empleadas (µg/ml)**	**Rango de concentraciones evaluadas* (µg/ml)**	
		≤	≥
Ampicilina	4, 8, 32	2	32
Amoxicilina/ácido clavulánico	4/2, 16/8, 32/16	2/1	32/16
Cefalexina	8, 32, 64	4	64
Cefalotina	2, 8, 32	2	64
Ceftiofur	1, 2	1	8
Cefoperazona	4, 8, 32	4	64
Cefquinoma	0,5, 1,5, 4	0,5	8
Gentamicina	4, 16, 32	1	16
Neomicina	8, 16, 64	2	64
Flumequina	2, 4, 8	1	32
Enrofloxacino	0,25, 1, 4	0,12	4
Marbofloxacino	1, 2	0,5	4
Tetraciclina	2, 4, 8	1	16
Trimeptoprim/Sulfametoxazol	1/19, 4/76, 16/304	20 (1/19)	320 (16/304)

*El sistema realiza una monitorización continua de los patrones de crecimiento de la cepa bacteriana frente a las distintas concentraciones del antibiótico empleadas, y los compara al patrón de crecimiento del microorganismo sin la presencia del antibiótico. A continuación, interpreta y estandariza la información obtenida, lo que le permite determinar el comportamiento de la cepa bacteriana ante concentraciones del antibiótico superiores e inferiores a las utilizadas en el análisis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La diarrea neonatal del ternero es un proceso que genera importantes pérdidas económicas. En su etiología intervienen diversos agentes infecciosos y parasitarios, algunos de ellos zoonósicos, que pueden actuar solos o combinados. El objetivo principal de esta tesis fue establecer la prevalencia de los principales enteropatógenos en terneros con diarrea menores de un mes y estudiar sus posibles asociaciones, así como su relación con la edad del animal y con la consistencia de las heces. Además, se abordaron sus posibles repercusiones para la salud pública mediante la caracterización molecular de los agentes parasitarios y determinación de su potencial zoonósico, y la evaluación de la susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica involucradas en el proceso.