



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio retrospectivo sobre el complejo respiratorio ovino en Aragón: patógenos y perfil de resistencias a antibióticos.

Retrospective study about ovine respiratory compex in Aragon: aethiological agents and antibiotic resistance

Autor/es

Rafael Frías Aza

Director/es

Jose María González Saínz
Aurora Ortín Perez
Marta Borobia Frías



Facultad de Veterinaria

2017

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Complejo respiratorio ovino	3
2. Resistencias a antibióticos	9
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
1. Gérmenes	17
2. Variación según la época del año	19
3. Perfil de resistencias en las distintas familias y comparación del perfil de resistencias en los principales agentes	20
4. Asociaciones en el perfil de resistencias entre familias de fármacos	25
5. Evolución de la aparición de resistencias	27
CONCLUSIONES	29
CONCLUSIONS	30
VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS	30
BIBLIOGRAFÍA	31

RESUMEN.

El complejo respiratorio ovino (CRO) es una de las principales patologías que afectan a corderos, especialmente a los mayores de 20 días, además es la patología en corderos en la que más se usan antibióticos para su tratamiento. Actualmente la existencia de resistencias a antibióticos es un asunto de gran preocupación tanto en animales como en humanos. Ante esta situación y la importancia del CRO en corderos, se decidió realizar un estudio retrospectivo desde el año 1997 hasta el 2017 para conocer el perfil de resistencias de los principales agentes del CRO y su evolución en Aragón.

Para la realización de este estudio se tomaron datos de cultivos y antibiogramas realizados durante los últimos 20 años por el Laboratorio Agroambiental de Aragón a partir de muestras de animales muertos con cuadros compatibles con CRO.

Se analizaron 3067 aislamientos con 63 agentes distintos. Los principales agentes asociados a esta patología fueron *Mannheimia haemolytica* (MH), *Pasteurella multocida* (PM), el género *Mycoplasma* (My) y *Bibersteinia trehalosi* (BT). Los datos obtenidos muestran que los aminoglucósidos son la familia que más resistencias presenta (MH 98,30%, PM 88,80% y 95,60%), mientras que la tasa más baja la presentan los fenicos (MH 4,50%, PM 3,10% y BT 3,70%).

Se valoró la presencia de multirresistencias, resistencia a más de un antibiótico, en estos gérmenes para lo que se estudiaron las familias de antibióticos de betalactámicos, quinolonas, sulfamidas, aminoglucósidos y tetraciclinas. Los resultados mostraron que existían multirresistencias con un porcentaje mayor del 32% y que menos de un 5% de los aislamientos de MH, PM y BT fueron sensibles a todo, mientras que la presencia de resistencias a las cinco familias simultáneamente era mayor del 2,42%. Además, se encontraron asociaciones significativas en la aparición de resistencias entre las distintas familias.

Para completar el análisis, se valoró la influencia del paso del tiempo, se observaron cambios significativos en MH, reduciéndose la resistencia a quinolonas y aumentando a sulfamidas, y en PM aumentando la resistencia frente a sulfamidas.

ABSTRACT.

Ovine respiratory complex (ORC) is one of the most important diseases in lambs, especially for the ones with more than 20 days. Furthermore, among all the diseases in lambs, it is the ones in which more antibiotics are required for its treatment.

Nowadays, antibiotic resistance is a major source of concern in animals and humans. Given these circumstances and the importance of CRO in lambs the resolution of carrying out a retrospective study, from 1997 to 2017 to disclose the resistant rate situation and how the principal agents of the ORC in Aragon have changed , was taken. To accomplish this objective, information of isolates and antibiograms done from death by ORC during the last 20 years was taken.

3067 isolates were performed with 63 different agents, the principal one associated with this disease were *Mannheimia haemolytica* (MH), *Pasteurella multocida* (PM)), *Mycoplasma* (My) and *Bibersteinia trehalosi* (BT). The results show the amynoglycosides family with presented highest resistance rate (MH 98.30%, PM 88.80% and BT 95.60%), whereas fencol was the lowest one (MH 4.50%, PM 3.10% y BT 3.70%).

The existence of multi-drug resistances of these agents was analysed. To achieve this betactamis, quinolones, sulfamides, amynoglycosides and tetracyclines families were studied. The results drawn from that study showed the existence of multidrug resistances in above 32.00% of the isolates and also the low sensitivity rates of the MH, PM and BT isolates below 5.00%, whereas the existence of antibiotic resistance to the five families was higher than 2.42%. Moreover, significative associations in the apparition of multidrug resistance were disclosed.

To complete the analysis, the influence of the time in the development of the disease was evaluated. Significant changes in MH were brought into light, with a decrease of the resistance rate to quinolones, an increase of the rate to sulfamides and in PM showed the same growth in resistance rate to sulfamides.

INTRODUCCIÓN.

En España hay registrados 16.523.000 ejemplares de ganado ovino (19% del censo europeo) lo que la coloca detrás de Reino Unido como el segundo país con mayor producción ovina dentro de Europa. Dentro de España, Aragón cuenta con 1.789.439 cabezas de ganado ovino (MAGRAMA 2015), casi en su totalidad de aptitud cárnea, en concreto, produciendo corderos cebados.

Los procesos respiratorios son la principal causa de mortalidad en corderos de más de 20 días de vida y suponen más de la mitad de las bajas que se producen hasta la venta. Su peculiar asociación con la edad del animal les caracteriza como procesos onerosos en comparación a otras posibles causas de muerte a edades más tempranas ya que implican un mayor gasto en alimentación tanto para la madre como para el cordero.

1. Complejo respiratorio ovino.

La primera referencia en la que aparece el término complejo respiratorio ovino (CRO) es relativamente reciente (Lacasta *et al.*, 2008), su uso pone de manifiesto la complejidad de este proceso de carácter plurietiológico que cuenta además con la implicación de factores medioambientales y de manejo. La multitud de posibles interacciones entre los agentes etiológicos, factores ambientales y factores del propio animal dan lugar a una variedad de presentaciones clínicas que abarca desde muertes repentinas sin sintomatología previa hasta lesiones pulmonares subclínicas detectadas en el matadero. El CRO incluye distintos procesos infecciosos que anteriormente en la literatura científica han sido denominados con otros nombres como pasteurelosis, neumonía atípica, neumonía gangrenosa, y procesos respiratorios de origen vírico o parasitario.

1.1 Signos clínicos y lesiones.

Los signos clínicos del CRO que más destacan son: fiebre, taquipnea con o sin dificultad respiratoria, descarga nasal, lagrimeo, debilidad, tos, estornudos (Bell, 2008). Al ser una patología que afecta a una comunidad de animales podemos encontrar desde animales que presenten todos los síntomas hasta corderos con uno solo de ellos. Aunque la sintomatología presentada puede ser clara, la información aportada por las lesiones halladas en la necropsia es mucho más esclarecedora. A partir de estas lesiones se puede establecer una clasificación de los procesos como sobreagudos, agudos o crónicos, aunque los límites no son fáciles de fijar.

La forma sobreaguda o septicémica se hace patente en la explotación por la aparición de muertes repentina, y en la necropsia se aprecian hemorragias a todos los niveles, aunque se concentran en cabeza, cuello y tonsillas. (Donachie, 2000).

Las formas crónicas incluyen desde corderos aparentemente sanos, pero en los que se encuentran lesiones a nivel pulmonar, hasta enfermos crónicos. Estos últimos se caracterizan por tener mal aspecto, poco peso y presentar los signos clínicos ya citados. Las lesiones observadas en esta forma de presentación se localizan en la cavidad torácica y consisten en lesiones pulmonares consolidadas y fibrosis (Jones y Gilmour, 2000).

Las formas agudas son cuadros intermedios entre los anteriores, los animales afectados presentan los signos clínicos clásicos ya descritos. En esta forma las lesiones que se aprecian son congestión y hemorragias en la cavidad torácica, miocardio y la pleura, y la consolidación de lesiones pulmonares en los lóbulos apicales y medio. Atendiendo a las lesiones macroscópicas la forma aguda se distingue de las otras en la presentación hemorragias en comparación con las formas crónicas, y, a su vez, en contraposición a la forma sobreaguda destaca el hallazgo de lesiones pulmonares consolidadas.

1.2 Factores que favorecen la aparición del CRO.

El CRO es una enfermedad multifactorial, en la que están interrelacionados múltiples factores que afectan a su presentación y gravedad. Estos factores se clasifican en: propios del animal, estresantes y medioambientales.

1.2.1 Factores propios del animal.

Dentro de este grupo destacan: genética del animal, sexo, edad de la madre, peso al nacimiento, tipo de parto, madre con poca producción láctea y modificaciones en la frecuencia respiratoria. En estudios realizados sobre mortalidad por neumonía en corderos y los factores relacionados con ella se observó que los machos, nacidos de hembras primíparas y de hembras con problemas en la producción de leche presentaban mayor mortalidad. Además, los animales con un peso al nacimiento dentro de la media de la raza presentaban un menor riesgo de muerte que los que nacían un peso superior o inferior, mientras que los corderos de parto simple tenían más posibilidad de sobrevivir que los de parto múltiple (Southey *et al.*, 2004).

1.2.2 Factores estresantes.

El estrés prolongado o repetido puede tener repercusiones negativas sobre las funciones biológicas del animal. Como respuesta a un estrés agudo se produce una liberación de cortisol que conlleva un cambio en el perfil inmunológico (Caroprese *et al.*, 2010). Esto nos indica que en el ovino de cebo los factores estresantes pueden tener un efecto perjudicial, haciéndoles más susceptibles a presentar CRO. Los factores que más influyen en la generación de este estrés son: destete, cambios de alimentación, manejo e instalaciones durante el cebo y presencia de enfermedades en la explotación.

La presencia de enfermedades concomitantes es uno de los factores más estresantes en los sistemas de cebo ovino. Dentro de estos sistemas las enfermedades que más repercusión tienen son el ectima contagioso, las infecciones agudas por virus border y la coccidiosis. En un estudio sobre la influencia de aparición de signos clínicos de coccidiosis en sistemas de cebo, se encontró que la presencia de coccidiosis aumentaba 1,8 veces el riesgo de presentar CRO. También se observó que en los animales parasitados los síntomas del CRO se manifestaban dos semanas después de presentar síntomas de coccidiosis (González, 2015). En otro estudio se comprobó que los corderos afectados por el virus border presentaban 2,1 veces más riesgo de manifestar los signos clínicos del CRO (González *et al.* 2014).

1.2.3. Factores ambientales.

1.2.3.1 Factores climáticos.

Dentro de estos factores los que más relevancia tienen sobre la aparición de CRO son la temperatura, el viento y las precipitaciones. De estos el más importante en nuestras latitudes es la temperatura, observándose en las épocas calurosas un aumento de la mortalidad (Hervas *et al.* 1996) y también un incremento de lesiones pulmonares en matadero (Luzón, 1999b). En referencia a los otros dos elementos se comprobó su relevancia en un estudio en el que se evaluó el efecto del viento sobre las bajas asociadas al CRO observándose un aumento de muertes asociadas al CRO en los días de viento y que la tipología y orientación de la nave tenían un papel significativo. En este estudio también se demostró que en los días con precipitaciones y/u otros meteoros se producía un menor número de muertes por CRO (Lacasta *et al.* 2008)

1.2.3.2 Factores ambientales ligados a la explotación.

Las malas condiciones de estabulación son consideradas uno de los principales factores de aparición del CRO. Los factores de mayor importancia que dan lugar a esta consideración son: orientación de la nave, acceso a parques, densidad de población, acumulación de gases nocivos, nivel de polvo en suspensión, humedad relativa, temperatura y la presencia de corrientes (Caroprese, 2008).

Las situaciones de estrés térmico en Aragón están ligadas a las altas temperaturas y cuando se superan los 30ºC de temperatura en el interior de la nave se produce una situación de estrés por calor que conlleva un riego de

mortalidad superior al estrés causado por el frío. Por ello se debe aumentar el ritmo de renovación del aire para reducir gases nocivos, la concentración de microorganismos y también la temperatura. Esto último evitará picos de cortisol que provocan bajadas de inmunidad (Sevi *et al.*, 2002). El efecto de este tipo de estrés es más grave en animales que lo sufren de manera repentina o al inicio de la época calurosa, lo que sugiere que existe una aclimatación por parte de los animales (Nienaber & Hahn, 2007). Debido a esto, si bien en las épocas de calor el riesgo de muerte es mayor, este riesgo presenta picos más elevados coincidiendo con las olas de calor.

1.3. Agentes etiológicos implicados en el complejo respiratorio ovino.

Se ha encontrado una gran variedad de agentes asociados al CRO, bacterianos, víricos y parasitarios. Por su importancia cabe destacar los bacteriano, principalmente *Mannheimia haemolytica* (MH), *Pasteurella multocida* (PM), *Bibersteinia trehalosi* (BT) y *Mycoplasma spp.* (My).

En un estudio en el que se analizó en sueros ovinos la presencia de anticuerpos frente a virus se encontró que el 63,60% de los animales muestreados resultaron positivos a *virus respiratorio sincitial*, el 27,30% lo fueron a *reovirus*, y el 24,00% y el 8,10% a *parainfluenza 3* y *adenovirus* respectivamente (Giangaspero *et al.* 1997). Hay varios virus que pueden provocar neumonía en corderos como el *virus respiratorio sincitial*, *reovirus*, *adenovirus* o el *virus border*, y este último podría tener una gran trascendencia en los cebaderos por la alta tasa de infección con la que cuentan (González *et al.* 2014).

Dentro de los agentes etiológicos de tipo bacteriano, MH, PM, BT y My han sido los aislados con mayor frecuencia a partir de muestras tomadas en casos de muertes por CRO (Bell, 2008a; Lacasta *et al.* 2008; González 2015). En los tres estudios la especie más frecuentemente hallada fue MH, y resto de especies difirió en su importancia. En el último estudio citado anteriormente se trabajó sobre un total de 1.126 muestras de corderos de cebo en las que se identificaron 44 especies bacterianas distintas, y como puede observarse en la Figura 1 los crecimientos más frecuentes fueron: MH 24 %, PM 19%, *Escherichia Coli* (EC) 14%, My 14% y BT 9% (González, 2015).

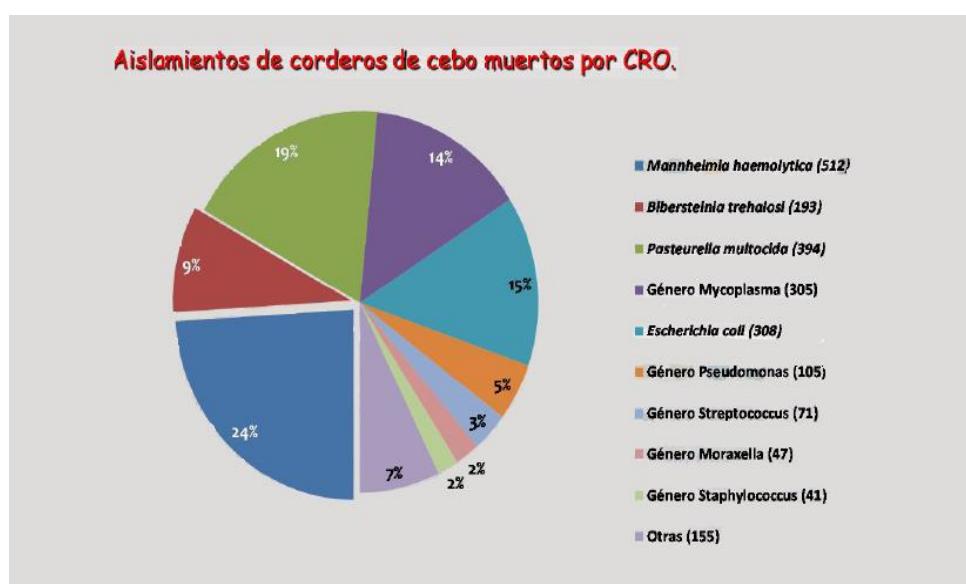


Figura 1. Principales agentes aislados de 1.126 cultivos y 2.131 aislamientos (González, 2015)

Sorprende el hallazgo de EC, aunque este germen no es propio del aparato respiratorio, su presencia ha sido documentada en varios estudios (Luzón, 1999; Lacasta *et al.* 2008) así como también su capacidad para generar neumonías de tipo fibrinoso (Oruç, 2006). El aislamiento de BT se ha producido principalmente en animales de cebo (Lacasta *et al.* 2012).

Dependiendo de la forma de presentación del CRO se han encontrado diferencias con respecto a los agentes aislados en las necropsias de los corderos de cebo muertos. En la forma crónica los gérmenes más frecuentemente aislados en los cultivos fueron PM+MH, en las formas agudas PM+MH+My y en la forma sobreaguda MH y BT en pureza (González, 2015). Los resultados obtenidos en las formas sobreagudas corroboran los datos presentados en estudios anteriores (De las Heras, 2001). Otro aspecto que cabe destacar es que solo el 23% de los crecimientos fueron puros (un único agente y crecimiento masivo). Dentro de estos cultivos, los que predominaron fueron BT (26%), MH (17%) y EC (14%); por el contrario, PM y EC solo representaron 7% y 2% de cultivos puros respectivamente (González, 2015).

1.3.1 *Mannheimia haemolytica* y *Bibersteinia trehalosi*.

Las bacterias MH y BT se corresponden con la antigüamente denominada *Pasteurella haemolytica*. El aislamiento de estos agentes etiológicos es frecuente en animales sanos ya que estos agentes son parte de la microbiota normal del aparato respiratorio ovino (Zecchinon *et al.* 2005). Respecto al momento en que aparecen estas bacterias en el animal un estudio realizado con corderos recién nacidos y sus madres demostró que los corderos nacen libres de ellas. Sin embargo, a las pocas horas de vida las tonsillas estaban colonizadas por MH, cuya procedencia podía ser materna. A las tres semanas de edad, MH fue reemplazada por BT, de tal modo que a los 2-3 meses de edad el 80% de los aislamientos correspondían a este germen. La colonización se relacionó con la interacción de los corderos con otros individuos y con el medio, y también se apreció que a mayor edad mayor diversidad de aislamientos (Al Sultan & Aitken, 1985).

Se han descrito 13 serotipos para MH y cuatro para BT (Blackall *et al.*, 2007). En España, se han encontrado ocho serotipos de MH, entre los que destacan A2, A12 y A1, y dentro de los cuatro serotipos de BT el más frecuentemente detectado es T4 (González *et al.* 2015).

Otros autores han valorado el poder patógeno de los distintos serotipos mediante la realización de infecciones experimentales con los serotipos A1, A2, A6, A7, A8, A9, T10 y A11, procediendo posteriormente a la estimación de los signos clínicos, lesiones, y capacidad de recuperación del agente inoculado. Los serotipos A2, A7 y A9 mostraron lesiones pulmonares más extensas debido a una mayor virulencia, sin embargo, solamente se recuperaron en una proporción mayor a la administrada los serotipos A2 y A7 (Odugbo *et al.* 2004). De este estudio también se deduce que la lesión producida varía en función del serotipo que provocó la infección. En este sentido, en un trabajo posterior se encontró que el serotipo T4 estaba asociado a formas de presentación sobreagudas de CRO, mientras que los serotipos T3 y T15 se asociaron con la presentación aguda de esta enfermedad (González *et al.* 2013).

1.3.2. *Pasteurella Multocida*.

Pasteurella multocida es un germen bastante heterogéneo, ya que se conocen 5 serogrupos capsulares (A, B, D, E y F), que son clasificados a su vez en 16 serotipos (1-16), de acuerdo a distintos antígenos de tipo lipopolisacárido (Dziva 2008). Se ha documentado que las cepas que poseen cápsula son más virulentas que las acapsulares y también que existe una asociación entre serogrupos y huéspedes y enfermedades específicas (Boyce & Adler 2000).

1.3.3. *Mycoplasma spp.*

La aparición de lesiones pulmonares en el ganado ovino está relacionada con una gran variedad de Mycoplasmas. Los que más destacan son *Mycoplasma ovipneumoniae* y *Mycoplasma arginini*, pero otros muchos han manifestado su capacidad para producir neumonías en corderos (Nicholas *et al.*, 2008; Chazel *et al.*, 2010; Kilic *et al.*, 2013). Aunque se sabe que los Mycoplasmas son causantes de neumonías todavía se desconoce su papel en la patogenia del proceso, aunque hay diversas hipótesis. Una de ellas propone que My actúa sobre la respuesta inmune, reduciendo la capacidad de fagocitar de los macrófagos y favoreciendo la infección por otras bacterias como MH y BT (Niang *et al.*, 1998). Por el contrario, otros estudios lo consideran como un agente oportunista debido a la alta tasa de animales sanos de los que se puede aislar este germen. (Nicholas *et al.*, 2008).

En España se identificó *Mycoplasma ovipneumoniae* como el agente más frecuentemente detectado en lesiones pulmonares encontradas en matadero (Moreno 1994). Sin embargo, su importancia fue mucho menor cuando se usó el cultivo como método diagnóstico en animales muertos por CRO (Luzón, 1999; Lacasta *et al.*, 2008; González, 2015). En este último estudio se vio que los cultivos puros eran muy escasos, por debajo del 2% y fue aislado, principalmente en asociación con MH y PM (González, 2015)

1.4 Efectos sobre los corderos.

El CRO da lugar a que los corderos, debido a los signos clínicos y lesiones, presenten una reducción en su bienestar, y provoque pérdidas económicas. Estas se dividen en directas como serían las bajas y los decomisos, e indirectas que incluyen los descensos de los crecimientos, peores índices de conversión, el gasto en tratamientos y una peor calidad del producto vendido. Se ha estimado que en las explotaciones aragonesas el capital perdido como consecuencia del CRO durante el año 1999 supuso un 7% del valor del cordero (González, 2000).

1.4.1 Mortalidad ocasionada por CRO.

La mortalidad asociada al CRO en corderos es elevada, de hecho, junto con los procesos digestivos son los principales causantes de bajas (Luzón, 1999a). Sin embargo, la incidencia de bajas por CRO va aumentando con la edad (Figura 2). Así, se ha descrito que el porcentaje de bajas asociadas al CRO pasaba del 9,60% del total de corderos muertos en la primera semana de vida hasta más del 55,00% en los corderos mayores de 55 días (Lacasta 2006). Este estudio también demostró que el CRO es la principal causa de muerte en corderos a partir de los 20 días de vida.

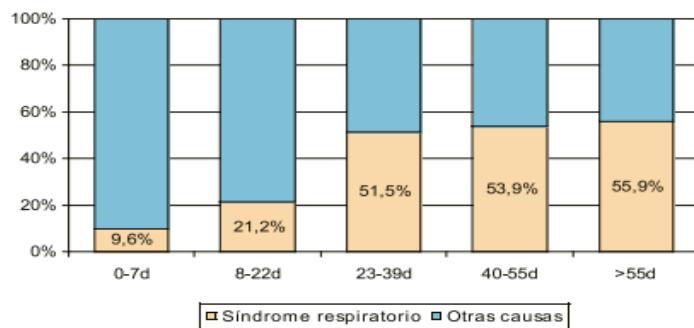


Figura 2. Porcentaje de bajas producidas por el CRO sobre el total de bajas por periodos de edad. (Lacasta 2006)

1.4.2 Decomisos asociados al CRO.

Las lesiones que se observan en los animales que padecen la forma crónica pueden conllevar decomisos de pulmón, costillar e incluso la canal en su totalidad. Según un estudio reciente, corderos que durante el cebo habían manifestado síntomas compatibles con CRO tenían un riesgo 3,1 veces mayor de decomiso de su pulmón frente a aquellos que no presentaron síntomas (González, 2015).

1.4.3 Descensos de crecimientos y aumentos en el periodo de cebo y en el índice de conversión asociados al CRO.

Las lesiones pulmonares asociadas al CRO conllevan retrasos en los crecimientos. Las lesiones pueden ser muy variadas, pero clasificándolas por su gravedad se puede determinar un descenso de los crecimientos que se agudiza conforme aumenta el grado de lesión (Luzón, 1999a). En un estudio realizado con corderos de Rasa Aragonesa, se encontraron descensos significativos tanto en la fase de lactación, con 20 gramos menos de la ganancia media diaria, como en la fase de cebo con 36 gramos por día menos (González *et al.* 2001). El mismo estudio encontró diferencias de 7 días en crías medianas de 73 días, lo que supone un incremento de 9,60% para aquellos animales con lesiones neumáticas en comparación a los animales sin lesión (González *et al.* 2001). A su vez, en una infección experimental, se vio que los corderos afectados por esta patología mostraban un incremento del 25,00% en el índice de conversión en comparación con los corderos sanos (Jones *et al.*, 1982).

1.4.4 Descenso de la calidad del producto final.

En el consejo regulador de la Indicación Geográfica Protegida (IGP) Ternasco de Aragón se observó un rechazo 2,2 veces mayor en canales en las que se había decomisado el pulmón. La causa de rechazo en estos animales fue principalmente la falta de peso y/o grasa (González, 2015).

2. Resistencias a antibióticos.

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de los microorganismos de ciertas especies para sobrevivir o incluso crecer en presencia de una concentración dada de un antibiótico.

La aparición de resistencias, como se puede observar en la Figura 3, es un proceso que ocurre de forma constante tras el descubrimiento de nuevos antibióticos y poco después de la entrada en uso de estos (Clatworthy *et al.*, 2007)

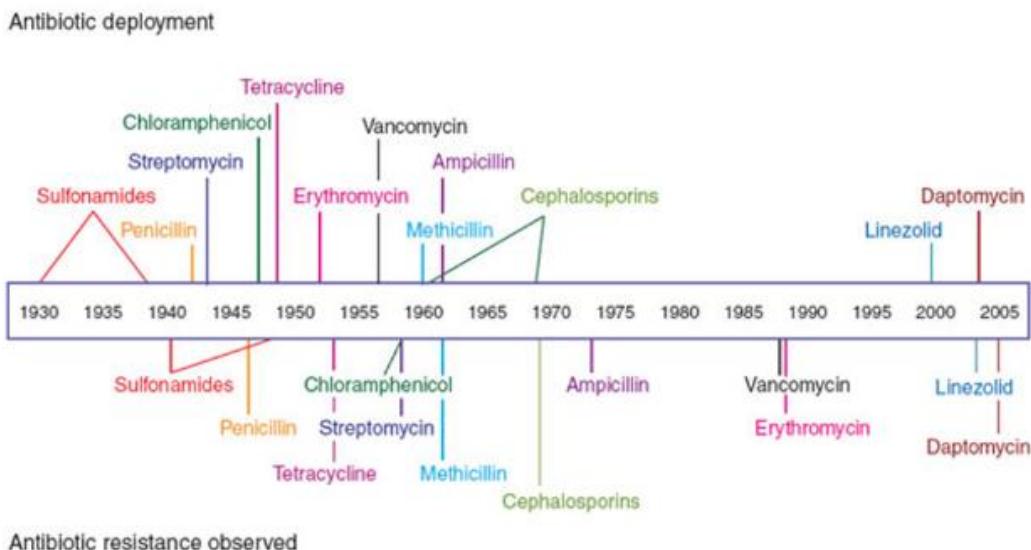


Figura 3. Año de aparición de antibióticos y posterior desarrollo de resistencias a estos antibióticos (Clatworthy *et al.*, 2007).

La aparición de resistencias no solo se ha visto en antibióticos, también ha sido documentada frente a los antiparasitarios, encontrándose implicados un alto porcentaje de agentes parasitarios (Veríssimo *et al.*, 2012).

Recientemente la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Agencia Europea de Medicamentos y el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades han manifestado su preocupación por el aumento de la aparición de resistencias, que relacionan con la interacción de tres eslabones humano, animal y medioambiente. Esta preocupación se ve incrementada por el hecho de que los seres humanos pueden adquirir resistencias a los antibióticos a través del contacto directo o indirecto, por la cadena alimentaria (Singer *et al.*, 2003). Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud incluye a los antibióticos agrícolas como capaces de producir la aparición de resistencia a los antibióticos humanos (World Health Organization, 2015).

Se estima que el consumo de antibióticos en los países de la Unión Europea es 116,40 y 144,00 miligramos por kilogramo de peso en humanos y animales respectivamente (European Medicines Agency [EMA], 2015). El uso de antibióticos en animales se realiza en tres situaciones diferentes: tratamiento curativo de animales enfermos, metafiláctico (para impedir la infección) de un grupo de animales, cuando la enfermedad ha sido detectada en esa población y profiláctico (impedir la enfermedad). Se ha estimado que el consumo anual de antibióticos a nivel mundial es superior a los 57.000.000 kilogramos, pero se ha estimado que para el año 2030 será superior a los 90.000.000 kilogramos (Van Boeckel *et al.*, 2015). Se ha observado que el uso compartido de fármacos como pueden ser las cefalosporinas de tercera y cuarta generación o las polimixinas conduce a una reducción de su eficacia ante infecciones acontecidas en los seres humanos. Este hecho es importante en fármacos como la colistina, que se usa en medicina humana para las cepas multirresistentes. Con la idea reducir la aparición de resistencias se decidió limitar el uso de antimicrobianos (Premanandh *et al.*, 2016). Como consecuencia de esta decisión entre los años 2009 y 2014 se ha producido un descenso del 58,10% en el uso de antibióticos en Holanda (MARAN, 2015).

Las resistencias antibióticas se pueden producir por: transferencia horizontal de genes a través de conjugación, transformación o transducción, paso en serie de las bacterias por medios que contienen el antibiótico (Samuelson *et al.*, 2005) o la exposición continua al antibiótico (Perron *et al.*, 2006). La aparición de resistencias surge como consecuencia de mutaciones por adaptación al medio, ya que permite a las bacterias que las poseen sobrevivir en presencia del antibiótico al que presentan resistencia, estas mutaciones siempre son adquiridas (Lofton *et al.*, 2013). El riesgo de adquirir resistencia a los antibióticos está influenciado por la tasa de aparición de mutaciones, el comportamiento del mutante resistente (probabilidad de que surja, fije, transmita y permanezca dentro de una población) y la fuerza de presión selectiva (Andersson y Hughes, 2011). Una serie de estudios experimentales y clínicos demostraron que la resistencia a antibióticos se puede ver reducida por la existencia de cepas que no contienen la resistencia a los antibióticos. Por lo general, las cepas resistentes son menos eficientes desde el punto de vista metabólico. Así las situaciones en las que no existe la presión selectiva del antibiótico conducen a una desaparición de las cepas resistentes por su menor eficiencia metabólica y con ello la reversión de la resistencia, es decir, la reducción de la tasa de resistencias a un determinado antibiótico (Andersson y Hughes, 2010).

Para la medición de resistencias los métodos más utilizados son el uso de discos de difusión y el método de gradiente de antibióticos (E-test). Los dos métodos se muestran en la Figura 4. El primero de ellos se basa en la colocación de discos con la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico y tras su cultivo medir el halo de inhibición para determinar si existe resistencia. El método de gradiente de antibiótico se basa en la colocación de una tira con distintas concentraciones del antibiótico a estudiar, tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica (Taroco *et al.*, 2006).

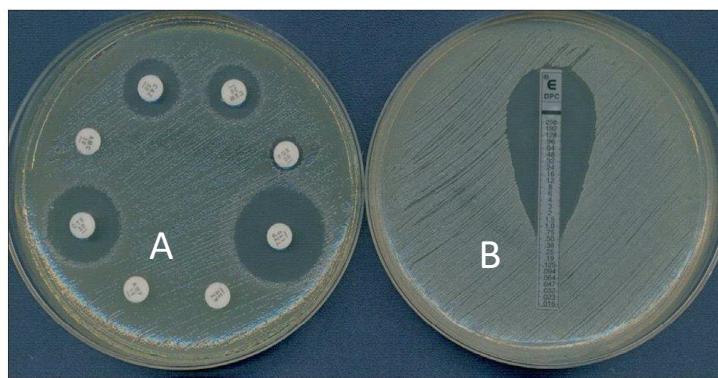


Figura 4. A) Antibiograma por difusión con discos en el que se observa la presencia de halos de inhibición. B) Antibiograma por E-test en el que se observa una elipse de inhibición (Cercenado y Saavedra-Lozano, 2009).

Según los datos aportados por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), en 2013 dos millones de personas en Estados Unidos presentaron una infección en la cual el agente causante era una bacteria resistente y al menos veintitrés mil personas murieron debido a una bacteria resistente en el mismo año (Center for Disease Control and Prevention, 2016). Entre las bacterias en las que se ha producido un aumento de la prevalencia de cepas multirresistentes destacan *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (European Centre for Disease Prevention and Control Antimicrobial resistance surveillance in Europe, 2015). La colistina ha tenido un uso

especialmente importante frente a enterobacterias, por lo que se destinaba a trastornos digestivos, principalmente en la producción porcina (Lu et al., 2010). Actualmente, para el tratamiento de las infecciones producidas por cepas multirresistentes en los seres humanos se utiliza la colistina y desde el 2012 este antibiótico se considera de vital importancia por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2012). Se ha descubierto en EC que el gen mcr-1 confiere resistencia a la colistina, también se comprobó la presencia de este gen en el 14,90% de EC aislados de carne cruda, 20,60% de los EC aislados de cerdos y 1,60% de EC aislados de pacientes hospitalizados (Liu et al., 2016). En un estudio sobre explotaciones porcinas se encontró que el 1,60% de EC aislados del estiércol y el 10,00% de los EC aislados del ambiente eran resistentes a la colistina (Costa et al., 2010). Otro estudio mostró que el 7,20% de los gérmenes *Salmonella* spp. aislados de los alimentos procesados porcinos eran resistentes a la colistina (Figueiredo et al., 2015).

En 2014, se estimó que este porcentaje de resistencia a colistina era <1,00% para aislamientos de pollos de engorde, gallinas, pavos, patos y conejos, y ligeramente mayor pero todavía inferior al 2,50% para aislamientos de lechones con infecciones digestivas y terneros después de que las madres presentaran mastitis (Jarrige et al., 2014)

En corderos, el uso de antibióticos se dirige principalmente a tratar el CRO, suponiendo el 35,00% de los tratamientos en animales jóvenes (Gay et al., 2012). A continuación, se realizará una revisión muy breve sobre las principales familias de antibióticos utilizados y haciendo hincapié en su mecanismo de acción y a aparición de resistencias.

2.1. Principales antibióticos usados.

2.1.1. Betalactámicos.

Ejercen su acción bactericida impidiendo la síntesis de las paredes bacterianas y destruyendo la integridad de las mismas. Se unen a unas enzimas denominadas proteínas de unión a penicilinas, que están implicadas en la síntesis de las paredes bacterianas. Esta unión también provoca paredes celulares defectuosas y osmóticamente inestables (Waxman y Stronmiger, 1983).

La aparición de resistencias a los betalactámicos se debe a tres factores, el principal de ellos es la producción de betalactamasas. Hay dos formas de producción de betalactamasas, la asociada a genes cromosómicos y la ligada a plásmidos. También influyen la permeabilidad de la pared celular y la sensibilidad de las proteínas de unión a penicilinas (Frere et al., 1991).

2.1.2. Sulfamidas.

Esta familia solo es eficaz frente aquellos microorganismos que sintetizan ácido fólico ya que inhiben la biosíntesis de este, sustituyendo erróneamente al ácido para-aminobenzoico (PABA). Esto impide la producción de ARN y la reproducción bacteriana, lo que conlleva un efecto bacteriostático. Las sulfamidas tienen un amplio espectro de actividad ya que afectan a bacterias Gram positivas, Gram negativas y a muchos protozoos (Richard Adams, 2003).

Hay dos teorías respecto a la aparición de resistencias en esta familia, la primera indica que se debe a mutaciones en el material genético de los gérmenes que dan lugar a que no actúen las sulfamidas, tengan poca penetración o haya una hiperproducción de PABA. La otra teoría postula la adaptación enzimática y con ello el consumo de metabolitos distintos (Suman Lopez and Ocampo Camberos, 2006).

2.1.3. Quinolonas.

Esta familia presenta poder bactericida porque actúa sobre la ADN girasa o topoisomerasa II, una enzima implicada en la duplicación del ADN de los microorganismos. Esto provocaría la muerte de las bacterias por una combinación de inhibición metabólica y destrucción del material genético. Además de actuar sobre la topoisomerasa II se ha visto que las quinolonas tienen otro posible punto de unión que es la topoisomerasa IV (Richard Adams, 2003). La aparición de resistencias en esta familia se puede deber a alteración de los poros hidrofílicos (disminución de la permeabilidad de la pared celular), aumento de la excreción de quinolonas de la célula o no poderse unir a los puntos de unión por mutaciones de la ADN girasa. (Richard Adams, 2003).

2.1.4. Tetraciclinas.

Esta familia da lugar a una supresión de la síntesis proteica, por lo que tienen un efecto bacteriostático. Esta supresión se produce por una unión específica a las subunidades 50S y 30S de los ribosomas bacterianos. Bloquean la unión del ARN de transferencia (ARNt) con el ARN mensajero (ARNm) en el complejo ribosómico; de esta forma se evita la elongación de la cadena peptídica impidiendo la formación de proteínas (Suman Lopez and Ocampo Camberos, 2006).

La resistencia surge como consecuencia de la adquisición de genes *tet* (tetraciclina) y/o genes *otr* (oxitetraciclina) (Chopra y Roberts, 2001). Han sido descritos tres mecanismos principales de resistencia a tetraciclinas: eflujo activo, protección ribosomal e inactivación enzimática. Se describen 39 genes *tet* y *otr* que incluyen 25 genes que codifican proteínas de eflujo activo, 11 de proteínas de protección ribosomal y 3 de una enzima inactivante (Roberts, 2005).

2.1.5. Aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos se fijan en la bacteria mediante la unión a proteínas en la membrana celular por diferencia de cargas. Posteriormente, entran en la bacteria a partir del transporte activo oxígeno dependiente, esto altera la permeabilidad de la membrana bacteriana, lo cual explica el sinergismo con los betalactámicos. Una vez en el citoplasma se unen irreversiblemente a las subunidades 30S y 50S de los ribosomas, bloqueando la unión del ARNm y ARNt, por lo que se generan proteínas incompletas y no funcionales. Por la suma de estos dos efectos, los aminoglucósidos tienen carácter bactericida (Suman Lopez and Ocampo Camberos, 2006).

Se conocen tres mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos: disminución de la captación o disminución de la permeabilidad celular, alteraciones de los sitios de unión al ribosoma y producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Wang et al., 2005; Jackson et al., 2013).

2.1.6. Fenicol.

Esta familia de antibióticos interviene inhibiendo la síntesis proteica. Actúan sobre la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos y su actividad peptidiltransferasa, por lo que impide la unión de aminoácidos al impedir la formación del enlace peptídico, y por ende la síntesis de proteínas (Richard Adams, 2003).

Han sido descritos tres mecanismos en la aparición de resistencia a los fenicos: permeabilidad reducida de la membrana, mutación de la subunidad ribosomal 50S y producción de cloranfenicol acetiltransferasa (Civljak *et al.*, 2014).

2.2. Resistencias presentes en MH y PM.

Los gérmenes MH y PM son los principales agentes relacionados con la aparición del CRO por ello nos centraremos específicamente en su tasa de resistencias.

Klima en vacuno de Estados Unidos, encontró que el 72,00% de MH y 50,00% de PM presentaban resistencia a algún antibiótico. Ambas bacterias presentaron más de un 45,00% de resistencia a tres o más antibióticos. También se evidenció que la resistencia conjunta a siete clases de antibióticos (aminoglucósidos, penicilinas, fluorquinolonas, limcosamidas, macrólidos, tetraciclinas y pleuromutilinas) era del 30,00% en MH y del 12,5% en PM, y por lo tanto ninguno de ellos servía para el tratamiento (Klima *et al.*, 2014).

En MH se ha visto que los principales antibióticos a los que presentaba resistencias son oxitetraciclina, ampicilina y amoxicilina-clavulánico. Se ha encontrado una mayor proporción de cepas resistentes en aquellas pertenecientes al serotipo 1. Sin embargo, es susceptible a sulfa-trimetropim, ceftiofur, enrofloxacina y gentamicina (Klima *et al.*, 2011). Este último dato confirma los resultados de otro estudio en el que se refiere, un 90% de sensibilidad frente a gentamicina para este germe (Post *et al.*, 1991). Entre los años 2000 y 2009 se ha visto que ha bajado la susceptibilidad de MH a los fármacos: danofloxacina, tilmicosina, tulatromicina y el florfenicol (Klima *et al.*, 2014).

Los datos anteriormente citados sobre la tasa de resistencias detectadas en PM están en desacuerdo con una reciente encuesta paneuropea que dictamina que este agente presenta una baja frecuencia resistencias (de Jong, 2014). Además, una investigación realizada recientemente en Italia con diferentes especies animales halló bajos niveles de resistencia, con una completa susceptibilidad a ceftiofur y florfenicol, coincidiendo con lo descrito por Berge y colaboradores (Berge *et al.*, 2006). Sin embargo, sólo aproximadamente un tercio de los aislamientos mostraron una total susceptibilidad a la tilosina y a la eritromicina. También se observaron cepas resistentes a tetraciclina (7,5%) y a sulfa-trimetropim (4,8%) y se encontró un número limitado de aislados resistentes a gentamicina (3/180), ampicilina (7/180) y enrofloxacina (3/180) (Cucco *et al.* 2017). En otro estudio, Babetsa y colaboradores detectaron resistencias de PM frente a sulfonamidas, tetraciclinas y estreptomicina. Estos autores señalaron la resistencia a las tetraciclinas era debida a la presencia del gen tetH y tetB y que la resistencias a las familias de las tetraciclinas, tanto en MH como en PM, se puede deber al uso de estas en la profilaxis de las explotaciones de ovino (Babetsa *et al.*, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, el uso principal de antibióticos en los corderos es el tratamiento frente al CRO. Este hecho y la situación existente de alerta ante las resistencias bacterianas nos llevó a estudiar cuál es el perfil de resistencias actual de los gérmenes implicados, en la aparición de este proceso. A partir de estos datos se analizó los antibióticos frente a los que se observaron más resistencias y cuál ha sido la evolución de estas resistencias a lo largo del periodo estudiado.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Teniendo en cuenta la complejidad del CRO y su marcado carácter multifactorial, se ha decidido realizar un estudio retrospectivo para conocer cuáles han sido los agentes de la enfermedad aislados en Aragón durante los últimos años y su importancia.

Además, como se ha comentado en la revisión bibliográfica el tratamiento del CRO es el uso antibiótico más frecuente que se hace en las explotaciones de pequeños rumiantes. Esto hace necesario conocer la eficacia de los antibióticos frente a los agentes implicados en este proceso. Por ello, se decidió estudiar los resultados de los análisis realizados por el Laboratorio Agroambiental de Aragón de los casos compatibles con CRO para conocer los principales agentes bacterianos implicados, su perfil de resistencias y la evolución de estas en el tiempo.

Los objetivos de este trabajo han sido:

- Conocer los principales agentes bacterianos implicados con el CRO y su frecuencia de aparición durante los últimos 20 años en Aragón.
- Analizar las sensibilidades que presentan las bacterias a las diferentes familias de antibióticos y la evolución de estas durante las dos últimas décadas.
- Estudiar la frecuencia de aparición de multirresistencias en los principales agentes etiológicos.
- Valorar la asociación entre las diferentes familias de antibióticos en la aparición de resistencias.

MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Material.

Para realizar este trabajo se ha partido de una recopilación de los informes de los análisis realizados por el Laboratorio Agroalimentario de Aragón a partir de muestras de corderos muertos por cuadros compatibles con CRO. Esta recopilación la podemos dividir en aislamientos de gérmenes en los que se realizó antibiograma (1142) y aislamientos sin antibiograma (1144), analizando en total 2286 cultivos, de los que se produjeron 3067 aislamientos.

2. Metodología.

En primer lugar, se elaboró una hoja de cálculo en la que se incluyeron los datos año, época del año, resultado del cultivo, tipo de cultivo, agente/s aislados, presencia/no presencia de resistencia a distintos antibióticos estudiados

mediante el uso de discos de difusión y valoración del halo de inhibición del crecimiento bacteriano. Estos antibióticos fueron agrupados en distintas familias, incluyendo entre paréntesis las veces que se analizaron:

- Betalactámicos: Penicilina (870), Ampicilina (553), Amoxicilina (1544), Cefuroxima (21), Cefoxitina (3), Augmentine (6), Cefalexina (303) y Cefalexin (448).
- Quinolonas: Enrofloxacina (665), Flumequina (199), Ceftiofour (738), Cefquinome (680), Marbofloxacina (879), Ácido nalixidico, (520) y Ácido oxolínico (143).
- Lincosamidas: Lincomicina-especitonomicina (1007) y Lincomicina (18).
- Sulfamidas: Sulfmida+trimetropim (1364).
- Polimixinas: Colistina (666).
- Aminoglucósidos: Gentamicina (653), Apramicina (273), Neomicina (410), Estreptomicina (568) y Kanamicina (17).
- Tetraciclinas: Oxitetraciclina (375), Doxiciclina (68) y Tetraciclina (831).
- Fenicol: Florfenicol (896).
- Macrólidos: Eritromicina (421), Espiramicina (4) y Tilosina (12).
- Polipéptidos: Bacitracina (39).
- Rifamicina: Rifampicina (42).
- Glicopéptidos: Vancomicina (29).

Toda la información obtenida de los cultivos de los últimos 20 años fue integrada en una misma matriz y procesada con el paquete estadístico SPSS 22.0 con el fin de averiguar la relación estadística entre los agentes etiológicos, resistencias y su evolución en el tiempo.

El estudio se centró en dos temas relacionados entre sí:

- Gérmenes: se valoró cuáles fueron los principales agentes etiológicos y su frecuencia. Además, dentro de esto, se analizó:
 - 1-Asociaciones y formas de presentación.
 - 2-Variación según época del año.
- Antibióticos: se estudió la aparición de resistencias haciendo hincapié en:
 - 1-Comparación del perfil de resistencias en los principales agentes
 - 2-Perfil de resistencias en las distintas familias

3-Asociaciones entre las distintas familias.

4-Evolución del perfil de resistencias en los principales agentes.

El estudio estadístico se centró en la estadística descriptiva, utilizando principalmente cálculo de frecuencias y porcentajes, y el uso de tablas cruzadas para estimar la asociación entre distintas variables. Para la valoración de asociaciones se empleó el estadístico Chi cuadrado con un valor $p<0,050$ para ser considerado como significativo, y se calculó el riesgo relativo siempre que fue posible. Además, para el estudio de la variación de las resistencias a lo largo del periodo estudiado se empleó el subprograma Tree del citado paquete estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Gérmenes.

En las muestras recogidas se obtuvieron 1863 cultivos en los que hubo crecimiento y 422 (18,47%) en los que no se produjeron crecimientos. De todos los cultivos en los que hubo crecimientos, 1084 (58,19%) fueron en pureza mientras que 779 (41,81%) fueron crecimientos de más de un agente. Cabe destacar que en el 26,95% de los cultivos con crecimiento se identificó MH, en el 14,87% PM y BT en el 2,84%.

Con respecto a MH se observó que el 38,05% de los crecimientos fue en pureza, en el 26,10% estaba asociada con PM (MH+PM), en el 2,39% con BT (MH+BT) y con My en el 18,53%. En relación a PM cabe destacar que el 14,80% de los crecimientos fue en pureza, en el 3,25% se encontró asociada a BT (PM + BT) y con My en el 32,49% de los casos. Los crecimientos de BT en pureza fueron del 39,63% y la asociación BT+My fue del 16,98%. Merece la pena resaltar que el 92,59% (175/189) de los crecimientos de My fue de forma mixta y que del total de cultivos con crecimiento solo hubo cuatro (0,002%, 4/1863) que incluyeron simultáneamente los tres agentes principales (MH+PM+BT).

Como resultado de los análisis se obtuvieron 3067 aislamientos y 63 agentes diferentes aislados. Como puede apreciarse en la Figura 5, entre los agentes aislados predominaron, *Escherichia Coli* con una frecuencia del 28,24% de los aislamientos, seguido de *Mannheimia haemolytica* con 16,37 %, *Pasteurella multocida* 9,03%, *Enterococcus* 8,00%, *Trupellera pyogenes* 6,94% y el género *Mycoplasma* con 6,13%.

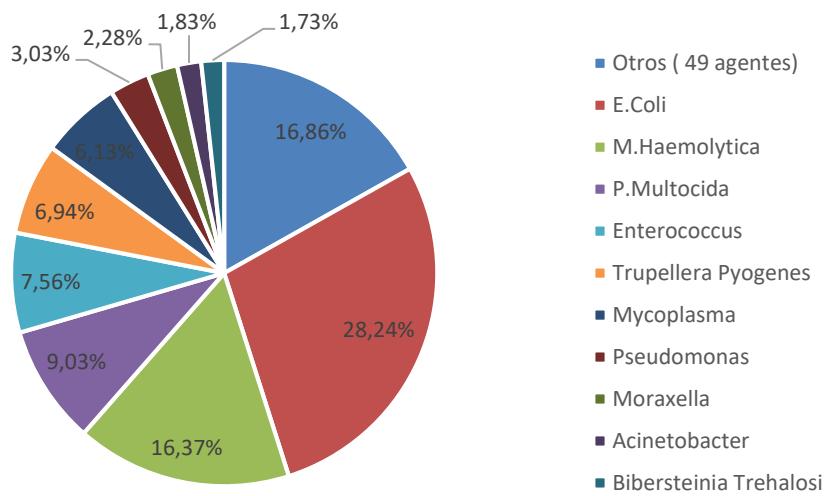


Figura 5. Principales agentes patógenos hallados de 3087 aislamientos.

Estos resultados difirieron de los obtenidos en estudios anteriores, citados en la revisión bibliográfica (Lacasta et al, 2008; González, 2015). Esto pudo estar causado porque las muestras de los análisis fueron tomadas por numerosos veterinarios en condiciones de campo, lo que pudo dificultar las adecuadas medidas higiénicas y de esterilidad necesarias para una correcta toma de muestras. De esta forma se explicaría el elevado porcentaje de aislamientos de *Enterococcus* y EC. Aunque este último agente ha sido descrito en aislamientos respiratorios (Oruç, 2006), las frecuencias de aislamiento obtenidas en este trabajo fueron más elevadas que las descritas en otros estudios (González, 2015).

Ante la elevada probabilidad de agentes que podrían estar actuando como contaminantes durante el proceso de toma de muestras se decidió dividir a los agentes encontrados en dos grupos: agentes respiratorios (*Aspergillus*, *Bibersteinia trehalosi*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, género *Mycoplasma*, *Nocardia*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas*, *Salmonella diarizonae*, *Staphylococcus aureus*, *Trupellera pyogenes* y *Streptococcus suis*) y agentes no respiratorios, el resto. Los agentes respiratorios representaron el 49,36% del total de aislamientos y sus frecuencias individuales de aislamiento se muestran en la Figura 6. Dentro de este grupo MH fue el más frecuente representando el 33,00% de los aislamientos, seguido de PM, My y BT con el 18,00%, 13,00% y 3,00% respectivamente. Estos resultados son semejantes a los descritos por González excepto para Truperella pyogenes y BT (González, 2015). Estas diferencias pueden responder a que en el estudio de González se recogen exclusivamente datos provenientes de corderos de cebo muertos por CRO mientras que en nuestro estudio se incluyeron datos de animales de todas las edades.

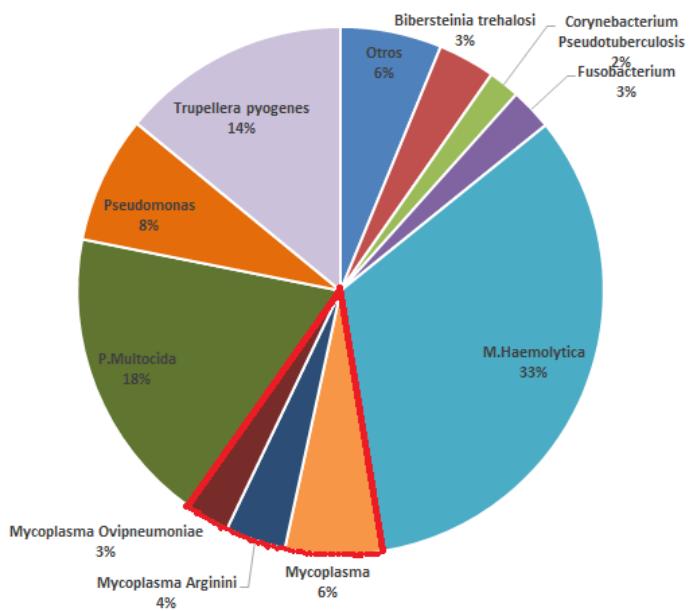


Figura 6. Agentes aislados considerados respiratorios (929 cultivos y 1514 aislamientos. La porción correspondiente al género *Mycoplasma* se ha delimitado por una línea roja, en ella se agrupan diferentes especies que componen este género.

2. Variación según la época del año.

En este estudio también se planteó valorar si se producían variaciones en la frecuencia de aislamiento de los principales agentes respiratorios relacionados con el CRO (MH, PM, BT y My) dependiendo de la época del año en que se tomaban las muestras. En la Tabla 1 se muestran las frecuencias de aislamiento de estos gérmenes, agrupadas por estaciones del año.

Tabla 1. Porcentaje de cultivos respiratorios en los que se ha identificado cada agente según épocas del año, realizado sobre 947 cultivos. Se marca en verde el mínimo de cultivos positivos para esta especie y en rojo el máximo.

	Invierno (277)	Primavera (240)	Verano (253)	Otoño (177)
MH (500)	53,07%	55,00%	53,75%	48,02%
PM (277)	27,08%	30,42%	29,25%	31,07%
BT (52)	6,14%	5,83%	5,14%	4,52%
My (170)	19,13%	21,25%	16,21%	14,12%

No se encontraron diferencias significativas entre las épocas del año para ninguno de los 4 gérmenes. Sin embargo, aunque las diferencias no llegan a ser significativas se aprecia que el otoño fue el periodo de menor frecuencia de cultivos con crecimientos de MH, BT y My, mientras que fue máxima para PM. En invierno se produjo la mayor frecuencia cultivos con identificación de BT mientras que primavera lo fue para MH y My.

3. Perfil de resistencias en las distintas familias y comparación del perfil de resistencias en los principales agentes.

Para este trabajo se han estudiado las resistencias de los gérmenes MH, PM y BT frente a aquellas familias de antibióticos a las que pertenecen los productos registrados para tratar los procesos respiratorios en el ganado ovino. Como se muestra en la Figura 7, en general, BT es el germe que mayor porcentaje de resistencia presentó frente a la mayoría de familias antibióticas (exceptuando sulfamidas, aminoglucósidos y macrólidos), mientras que MH fue el que registró un porcentaje menor. BT se aísla sobre todo en las formas sobreagudas de CRO (De las Heras, 2001), por lo que la alta tasa de resistencias resulta menos importante, ya que aplicar un tratamiento resulta muy complicado debido a la rapidez de la muerte del animal y a la dificultad para apreciar los signos clínicos previos.

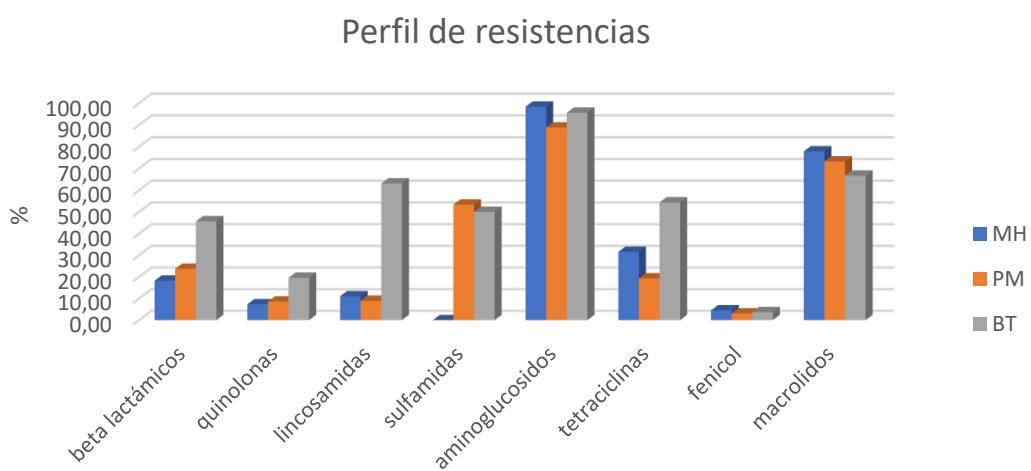


Figura 7. Porcentaje de resistencias para distintas familias de antibióticos en MH, PM y BT.

También se puede apreciar que las familias frente a las que mayor tasa de resistencias se encontraron fueron los aminoglucósidos (MH 98,30%, PM 88,80% y 95,60%) y las tasas más bajas la presentaron frente a los fenicos (MH 4,50%, PM 3,10% y BT 3,70%). MH fue el germe más resistente a aminoglucósidos (98,34%) y a macrólidos (77,78%), mientras que PM fue la más resistente a las sulfamidas (53,30%). En el caso de MH se observó que presentó los mayores porcentajes de resistencias frente a aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas, mientras que las familias más eficaces fueron fenicos, sulfamidas y quinolonas. Con relación a PM, en la Figura 7, los mayores porcentajes de resistencias observados fueron frente a aminoglucósidos, sulfamidas y macrólidos y en contraposición la mayor sensibilidad encontrada fue frente a fenicol, quinolonas y lincosamidas.

Además de las familias, se decidió comparar las tasas de resistencia y tipos de resistencias por antibióticos individuales. En los resultados que se muestren en la Figura 8, podemos ver que BT fue la bacteria que mayor tasa de resistencia presentó a la mayoría de los antibióticos estudiados (salvo estreptomicina y florfenicol). Los antibióticos frente a los que aparecieron más resistencias fueron: estreptomicina (MH 98,60%, PM 91,50% y BT 97,40%), tetraciclina (MH 29,60%, PM 20,30% y BT 58,50%) y penicilina (MH 22,30%, PM 26,20% y BT 45,50%). Mientras que el menor porcentaje de resistencias se observó frente a florfenicol (MH 4,50%, PM 3,10% y BT 3,80%)

y marbofloxacina (MH 4,30%, PM 2,70% y BT 3,40%). Resulta especialmente interesante que, aunque este último no está registrado como medicamento de uso en ovino, si que se aprecia la existencia de resistencias.

Los resultados encontrados, reflejados en la Figura 8, para MH están en contraposición con los datos aportados por Klima y colaboradores sobre ganado bovino en Estados Unidos. Estos autores destacaron la ampicilina y amoxicilina-clavulánico como los antibióticos frente a los que MH presentó más resistencias, y gentamicina y la sulfamida+trimetropim como antibióticos más eficaces. En nuestros resultados ampicilina presento 3,23% (8/248) de resistencia, amoxicilina-clavulánico 3,49% (13/373), gentamicina 85,71% (30/35) y sulfamida +trimetropim 18,11% (65/359). Sin embargo, nuestros resultados concuerdan en el caso del ceftiofur y el florfenicol, ya que los mismos autores los citan como antibióticos frente a los que menos resistencias presentó dicho germe (Klima et al., 2011).

Los datos obtenidos respecto a los antibióticos coinciden con los aportados por Cucco y colaboradores en distintas especies. Estos autores encontraron que eritromicina y tilosina eran los antibióticos menos eficaces frente a PM. En nuestro estudio, la tilosina apenas fue utilizada para este germe si bien la tasa de resistencia fue del 100,00% (2/2) y a la eritromicina del 70,73% (29/41), mientras que el germe presentaba la mayor susceptibilidad frente a florfenicol y ceftiofur. Sin embargo, los resultados obtenidos para la gentamicina no se corresponden con los de nuestro estudio, ya que estos autores la incluyen en el grupo de antibióticos frente a los que se observa una mayor susceptibilidad, mientras que en este estudio la resistencia de PM frente a gentamicina fue del 77,78% (14/18) si bien el número de análisis en nuestro caso fue discreto (Cucco et al., 2017).

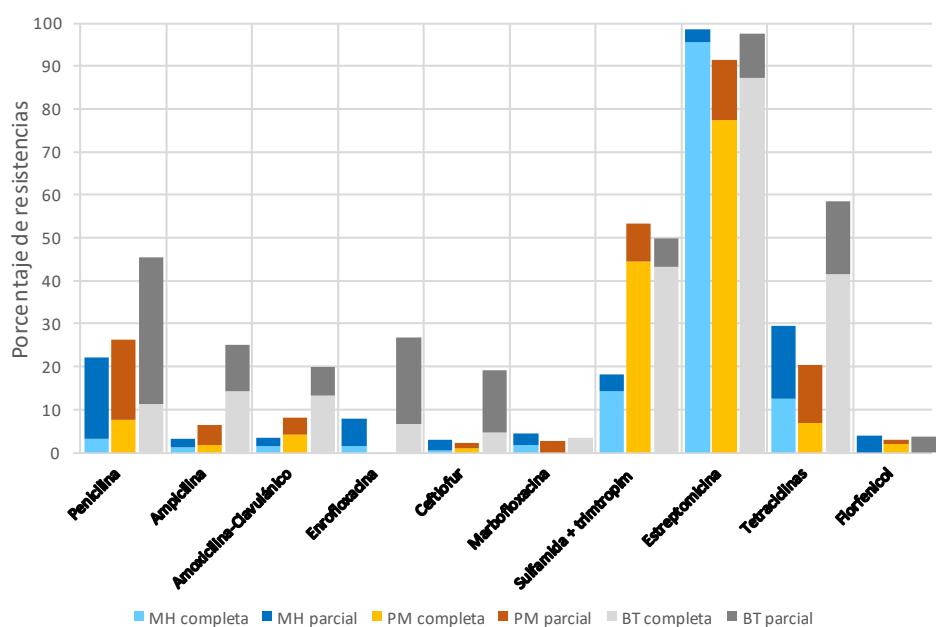


Figura 8. Porcentaje de resistencias y tipo (completa o parcial) frente a los principales antibióticos en MH, PM y BT.

Frente la penicilina la mayoría de resistencias se produjeron de forma intermedia, al igual que frente a enrofloxacina y el florfenicol. Por el contrario, la modalidad de resistencia completa predomina frente a amoxicilina y estreptomicina. Para el resto de fármacos se vio predominio de una u otra forma de resistencia según los agentes.

Llama la atención que PM no presentó resistencias frente a enrofloxacina. También cabe destacar que los tres gérmenes tengan una resistencia cercana al 100% frente a la estreptomicina. Un porcentaje tan alto a este antibiótico fue previamente documentado para MH y PM en un estudio realizado en Etiopia (Marru et al., 2013).

Para completar el estudio de comparación entre los principales agentes implicados en el CRO (MH, PM y BT), se decidió estudiar la frecuencia de multirresistencias frente a algunas de las familias estudiadas anteriormente. En estos agentes se estudiaron las siguientes familias: betalactámicos, quinolonas, sulfamidas, aminoglucósidos y tetraciclinas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

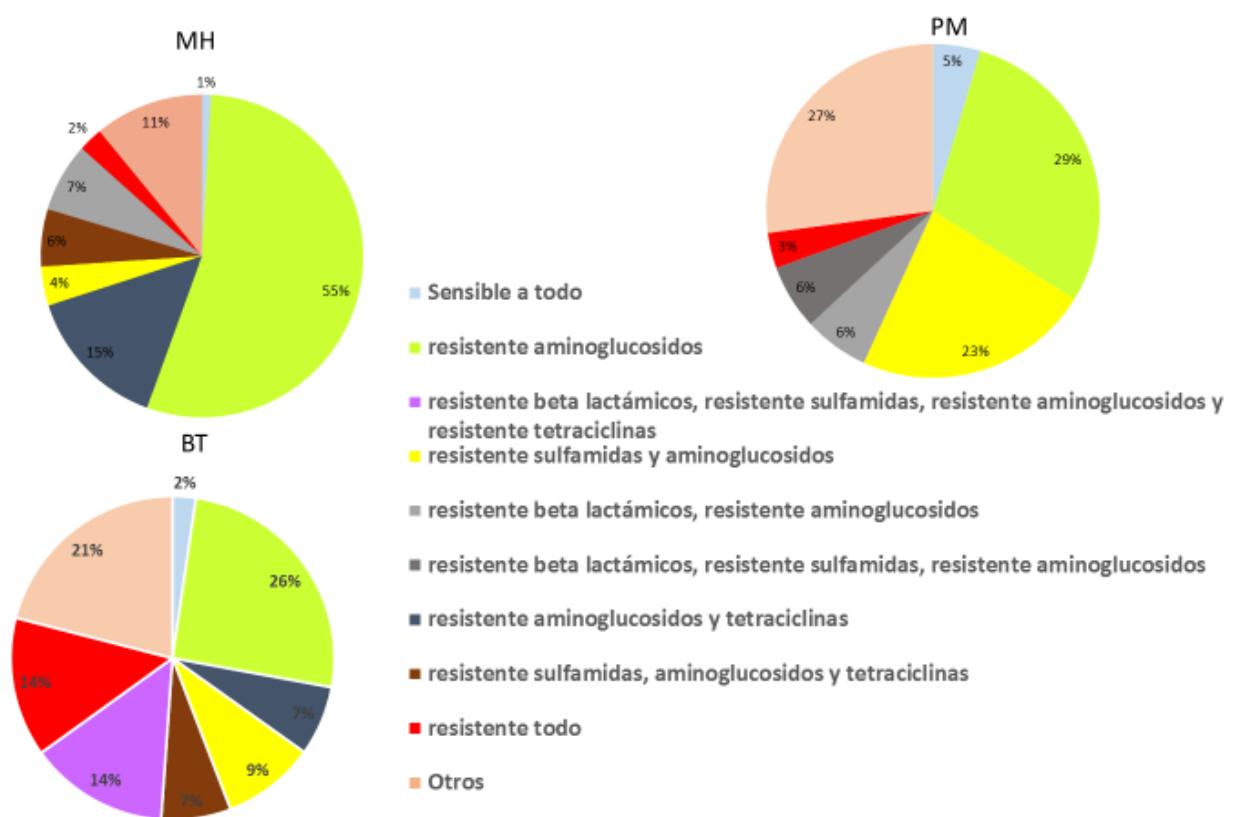


Figura 9. Porcentaje de aislamientos de MH (330 crecimientos), PM (175 crecimientos) y BT (43 crecimientos) según modo de resistencia respecto a los antibióticos estudiados. Los antibióticos estudiados fueron inferiores a los originales dado que contar con información sobre las 5 familias antibióticas estudiadas fue exigido para su inclusión en este apartado.

Con respecto a MH, el aislamiento que con más frecuencia se obtuvo fue el resistente únicamente a aminoglucósidos (55%), seguido del resistente a aminoglucósidos y tetraciclinas (15%). Igualmente cabe destacar que el 1% de los aislamientos fueron sensibles a todas las familias mientras que algo más del doble presentó resistencia a todas ellas simultáneamente.

Solo el 5% de los crecimientos de PM no mostraron ningún tipo de resistencias, mientras que el 2% fue resistente a todas las familias de antibióticos estudiadas. Destaca también que un porcentaje muy importante de los crecimientos de este germen fueron resistentes a los aminoglucósidos (88%) siendo el 29% de los crecimientos resistentes solo a esta familia y el 23% resistente además a las sulfamidas.

Los resultados obtenidos para BT muestran que el porcentaje de crecimientos de este germen sensibles a todos los antibióticos estudiados (2,00%) fue mucho menor que el de resistentes a todos (14%). El mayor porcentaje de resistencia que se encontró fue frente a los aminoglucósidos en exclusividad (26%), seguido de resistentes a todos y resistentes a betalactámicos, sulfamidas, aminoglucósidos y tetraciclinas, (14% para ambos). Cabe destacar que el 96% de los crecimientos de este germen fueron resistentes a los Aminoglucósidos, bien en exclusividad o mostrando además resistencia a otros antibióticos.

Debido a que EC fue el agente más frecuentemente aislado en este trabajo y presenta graves implicaciones con salud pública se decidió estudiar también su perfil de resistencias a antibióticos. En el estudio se incluyeron betalactámicos, quinolonas, lincosamidas, aminoglucósidos y polimixinas. Como puede observarse en la Figura 10, donde se resumen los resultados obtenidos, el 9% de los aislamientos de este germen fue sensible a todas las familias de antibióticos estudiadas mientras que no se produjeron aislamientos de EC resistentes a todos ellos. El aislamiento que se obtuvo con una mayor frecuencia fue el resistente solo a los betalactámicos (21%), seguido del resistente a betalactámicos y aminoglucósidos (13%). Debe resaltarse que el 79% de los crecimientos de EC fue resistente a los betalactámicos.

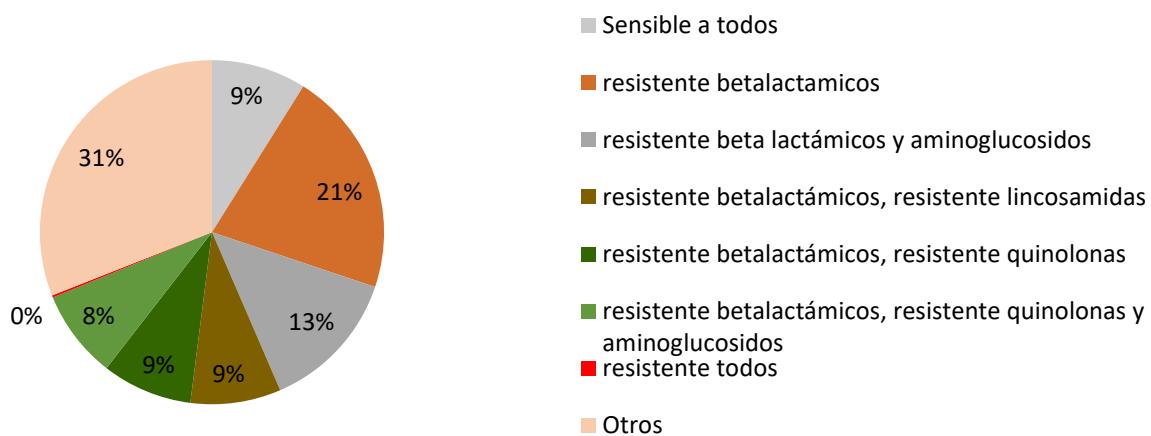


Figura 10. Porcentaje de aislamientos de EC según modo de resistencia respecto a los antibióticos estudiados en 494 crecimientos.

Con respecto a la resistencia de EC a las polimixinas, los resultados de este estudio difieren de los publicados por Liu y colaboradores para la especie porcina. En nuestro estudio, solo el 1,24% (7/565) de EC aislado de los corderos fue resistente a la colistina, mientras que estos autores encontraron el 20,60% de los EC aislados de cerdo (Liu et al., 2016). Esto podría indicar que la resistencia a la colistina es menor en ovino debido a un menor uso del antibiótico en esta especie en forma de premix (Lu et al., 2010).

A la vista de los datos obtenidos, se constata que los aminoglucósidos fue la familia de antibióticos frente a los que se genera un mayor porcentaje de resistencias en los gérmenes estudiados, ya sea de forma única, como en MH con un 55% de resistencias, o apareciendo en forma de multirresistencias. Entre las combinaciones de multirresistencias destaca especialmente la de aminoglucósidos y betalactámicos, que es la que aparece con mayor frecuencia.

En la Figura 11 se resumen gráficamente las frecuencias de resistencias a una o varias de las familias de antibióticos estudiados encontradas para los diferentes gérmenes. Así, el 1% de los crecimientos de MH fue sensible a todas mientras que se encontraron resistencias frente a una, dos, tres o cuatro en el 55%, 26%, 12% y 4%, respectivamente. Solo el 2% fueron resistentes a las cinco familias de antibióticos estudiadas. En el caso de PM el 5% de los aislamientos fue sensible a todas, el 34% fueron resistentes a una, el 35% a dos, el 18% a tres, el 6% a cuatro y el 3% fueron resistentes a las cinco familias de antibióticos estudiadas.

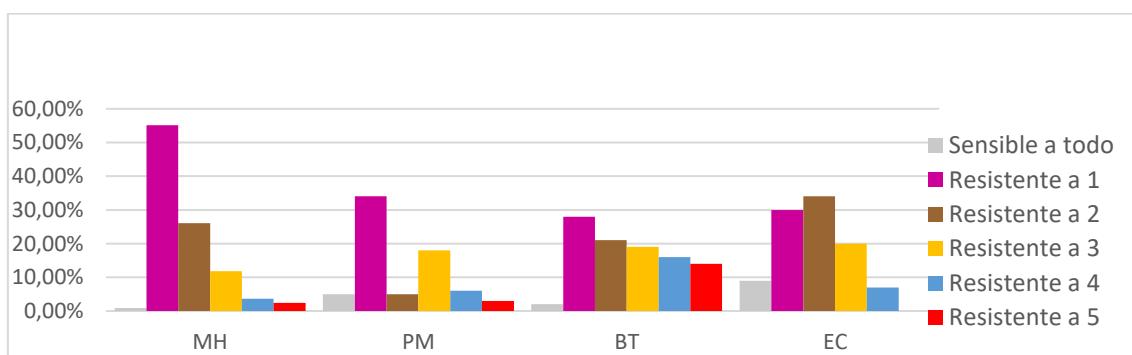


Figura 11. Porcentaje de aislamientos de MH (330), PM (175), BT (43) y EC (494) según número de familias de antibióticos a las que presentan resistencia.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Klima y colaboradores para ganado bovino en Estados Unidos. En nuestro caso se ha detectado un porcentaje de resistencia a al menos una familia de antibióticos (99% MH y 95% PM) que fue superior al que describen estos autores (72% y 50%, respectivamente). En relación a los datos referentes a multirresistencias, en concreto a la presencia de resistencias frente a tres o más familias, en nuestro estudio se encontró un porcentaje para MH del 18% y de 27% para PM, mientras que en ese mismo estudio los otros autores describieron cifras mayores, 45% para ambas bacterias (Klima et al., 2014).). Esto puede deberse en parte a que ellos estudiaron un total de siete familias mientras que nuestro estudio trabajó con cinco familias.

Los datos encontrados en nuestro estudio para BT, como puede apreciarse en la Figura 11, reflejan que el 2% de los aislamientos fue sensible a todas las familias de antibióticos, el 28% fue resistente a una, el 21% a dos, el 19% a tres, el 16% a cuatro y el 14% fueron resistentes a todas.

Con respecto a EC, el 9% de los crecimientos fue sensible a todas las familias de antibióticos, y fueron resistentes a una, dos, tres y cuatro familias el 30%, 34%, 20% 7%, respectivamente. No se encontraron aislamientos resistentes a todas las familias estudiadas. Un dato de interés es que EC fue el germe que presentó un mayor porcentaje de aislamientos sensibles a todas las familias estudiadas presentó, y además, no aparecieron crecimientos de EC con resistencia a todas las familias de antibióticos estudiadas. Esto podría corroborar el papel de contaminante de este

germen en nuestro estudio, ya que como se comentó anteriormente las resistencias antibióticas pueden ser consideradas como un factor de virulencia de las bacterias.

Con todos los datos recogidos en la Figura 10 respecto a MH, PM y BT, se puede concluir que para los tres gérmenes el porcentaje de aislamientos con sensibilidad a todas las familias de antibióticos estudiadas es muy bajo, no superando en ningún caso el 5,00%. Por otro lado, también se ha encontrado que estas bacterias presentaban cepas resistentes a todas las familias que se estudiaron, apareciendo en los tres casos con una mayor frecuencia que la de las cepas sensibles a todas. Teniendo en cuenta que se considera que hay multirresistencias cuando aparecen resistencias a más de un antibiótico (Klima et al., 2014), se puede deducir que en nuestro estudio la aparición de multirresistencias en los gérmenes estudiados es importante, ya que supera el 32,00% en todos los gérmenes relacionados con el CRO.

4. Asociaciones en el perfil de resistencias entre familias de fármacos.

A raíz de lo observado en el apartado anterior, se decidió valorar la existencia de asociaciones entre las distintas familias de antibióticos que dan lugar a la aparición de multirresistencias. Con los datos obtenidos de los perfiles de resistencias encontrados para cada familia de antibióticos, se analizó la presencia de posibles asociaciones entre familias que favoreciesen la presentación de resistencias, calculando el riesgo de aparición de las mismas y se comprobó si eran significativas($p<0,05$). Los resultados se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Riesgo de asociación entre familias de antibióticos según agente patógeno. Las celdas verdes indican $p<0,050$ y las rojas $p<0,001$.

MH	Betalactámicos	Quinolonas	Lincosamidas	Sulfamidas	Polimixinas	Aminoglucósidos	Fenicol	Macrólidos
Betalactámicos		3,27	--	4,34	--	--	5,78	--
Quinolonas			8,14	6,74	--	--	--	--
Lincosamidas				--	--	--	--	--
Sulfamidas				--	--	--	--	4,615
Polimixinas				--	--	--	--	--
Aminoglucósidos					--	--	--	5,78
Fenicol						--	--	--
Macrólidos							--	--

PM	Betalactámicos	Quinolonas	Lincosamidas	Sulfamidas	Polimixinas	Aminoglucósidos	Fenicol	Macrólidos
Betalactámicos		--	--	--	--	--	--	13,5
Quinolonas			--	4,56	--	--	--	--
Lincosamidas				--	--	--	1,36	--
Sulfamidas				--	--	--	--	--
Polimixinas				--	--	--	--	--
Aminoglucósidos				--	--	--	--	--

BT	Betalactámicos	Quinolonas	Lincosamidas	Sulfamidas	Polimixinas	Aminoglucósidos	Fenicol	Macrólidos
Betalactámicos		--	--	4,67	--	--	--	--
Quinolonas			--	9,8	--	--	--	--
Lincosamidas				--	--	--	--	--
Sulfamidas				--	--	--	--	--
Polimixinas				--	--	--	--	--
Aminoglucósidos				--	--	--	--	--
Fenicol					--	--	--	--
Macrólidos						--	--	--

Como se ha comentado en la revisión bibliográfica, la resistencia a los betalactámicos se debe a cambios en la permeabilidad de la pared celular que impide la entrada a los antimicrobianos. Esto provoca que no puedan actuar en sus puntos de unión o dañar la pared (Frere et al., 1991). Este mecanismo de resistencia podría ocasionar que las cepas resistentes a los betalactámicos fuesen igualmente resistentes a otros antibióticos que ejercen su efecto en el interior de la célula como quinolonas, sulfamidas, fenicos y macrólidos.

Según nuestro estudio, si MH era resistente a betalactámicos:

- Se incrementaba **3,27 veces** el riesgo de que también lo fuese a las quinolonas. El cambio de permeabilidad al que se asocia la resistencia frente a los betalactámicos podría actuar evitando la entrada de las quinolonas al interior de la bacteria, lo que supone que no llegue hasta la enzima ADN girasa (Richard Adams, 2003).
- Se incrementaba **4,34 veces** el riesgo de compartir resistencia a sulfamidas. Esto puede ser debido a que las sulfamidas no puedan penetrar en el interior celular y sustituir al PABA (Suman Lopez y Ocampo Camberos, 2006).
- Se incrementaba **5,78 veces** el riesgo de ser también resistente a fenicol probablemente porque este no pueda acceder hasta la subunidad 50s de los ribosomas bacterianos (Civljak et al., 2014).

Igualmente se observó que si PM era resistente a betalactámicos aumentaba **13,50 veces** el riesgo de serlo también a los macrólidos. Una posible explicación a este hecho podría ser, al igual que para los fenicos, que este fármaco no fuese capaz de llegar a la subunidad 50s de los ribosomas de las bacterias.

También se encontraron asociaciones para BT, cuando este germe fue resistente a betalactámicos, se incrementó **4,67 veces** el riesgo de serlo además a las sulfamidas. El mecanismo mediante el cual esto podría suceder sería el mismo que se ha citado para MH.

La resistencia a las quinolonas se produce principalmente por disminución de la permeabilidad celular o mutaciones de la ADN girasa (Richard Adams, 2003). En este estudio se observó que cuando MH era resistente a quinolonas:

- Aumentaba **8,14 veces** el riesgo de serlo frente a lincosamidas. Las quinolonas penetran en el interior celular a través del canal de las porinas (Suman Lopez y Ocampo Camberos, 2006). Cambios en este canal pueden conducir a que las lincosamidas no puedan penetrar en el interior celular y actuar sobre los ribosomas bacterianos y su unidad 50s. Esto no afectaría a los betalactámicos, como se ve en la tabla de asociaciones, ya que ellos se unen a proteínas de unión y no precisan de transporte activo.
- Aumentaba **6,74 veces** el riesgo de ser resistente a las sulfamidas. Esta asociación se puede explicar por la imposibilidad de ambos fármacos de penetrar en el interior celular (Suman Lopez y Ocampo Camberos, 2006). Esto haría que las sulfamidas no actuasen sobre el PABA.

También se deduce de este estudio que cuando MH era resistente a sulfamidas se incrementaba **4,62 veces** el riesgo de que sea resistente a los macrólidos. Que ambos fármacos tengan esta relación es posible de explicar debido a que estos fármacos necesitan del transporte activo dependiente de energía para acceder al interior celular. Cambios

en la membrana que impidan que se realice este transporte activo podrían dar lugar a esta asociación. (Sumanó Lopez y Ocampo Camberos, 2006).

Con respecto a PM, si este era resistente a sulfamidas crecía **1,36 veces** el riesgo de serlo a los fenicos. La razón de que esto suceda podría estar relacionada con alteraciones en los receptores del PABA, por lo que las sulfamidas no podrían sustituirlo lo que originaría una mala formación del ADN y ARN bacteriano, con la consiguiente alteración de los ribosomas bacterianos que impida su unión al fenicol.

Además de esto, se observó que si MH era resistente a aminoglucósidos se incrementa 5,78 veces el riesgo de que fuese resistente a los macrólidos. Ambos antibióticos actúan sobre la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos. Por lo que, una posible causa de esta asociación podría ser la existencia de modificaciones de la subunidad 50S (Wang et al., 2005).

Tanto PM como BT aumentaron el riego de ser resistentes a las sulfamidas (**4,56 y 9,80 veces**, respectivamente) cuando presentaron resistencia a las quinolonas.

5. Evolución de la aparición de resistencias.

En este apartado se ha valorado la existencia de variaciones significativas, a lo largo del periodo de estudio, de los porcentajes de resistencias frente a las familias de antibióticos utilizadas en los distintos gérmenes asociados al CRO.

5.1. Quinolonas.

Como muestra la Figura 12, para MH se encontraron cambios significativos en la tasa de resistencias frente a quinolonas. Se pueden establecer dos periodos según la tasa de resistencias. El límite entre estos periodos se establece en el año 1999. De 1997 a 1999 la tasa de resistencias fue del 16,70%, mientras que del 1999 hasta la actualidad la tasa bajó hasta un 4,60%.

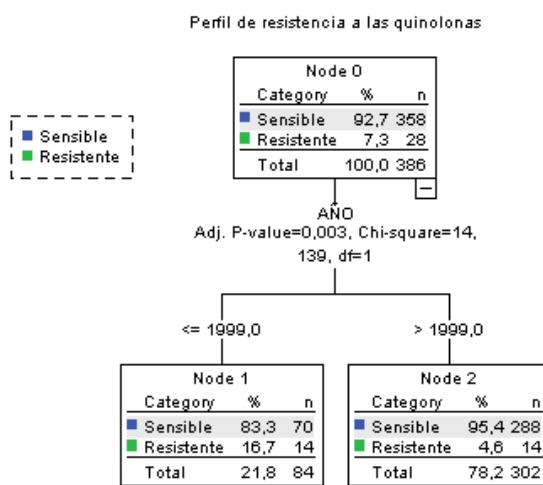


Figura 12. Evolución durante el periodo (1997-2017) de la tasa de resistencias a las quinolonas en MH.

Esta reducción pudo estar asociada a la prohibición del uso de quinolonas en piensos de corderos a partir del año 2000. Este descenso en el uso de dichos antibióticos pudo originar la pérdida de resistencias. Dado que por lo general las cepas resistentes son menos eficientes desde el punto de vista metabólico, como se ha citado en la revisión bibliográfica, esto conduce a una reversión de la resistencia, al no existir la presión selectiva del antibiótico y tener una mejor eficiencia metabólica aquellas cepas no resistentes al antibiótico (Andersson y Hughes, 2010).

5.3. Sulfamidas.

Para MH, se observa un crecimiento significativamente importante en la tasa de resistencias a las sulfamidas. Tal como muestra la Figura 13, se aprecian dos períodos diferenciados en relación a este crecimiento. Entre 1997 y 2011 el porcentaje de resistencias se situaba en el 14,50%, pasando desde este año hasta la actualidad a ser del 41,80%.

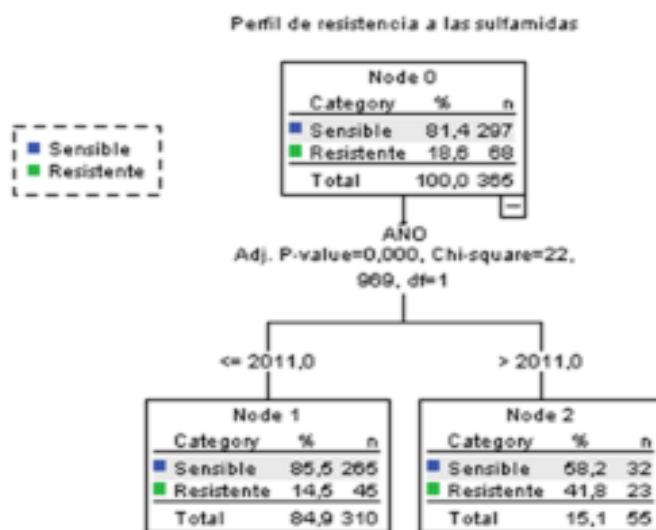


Figura 13. Evolución durante el periodo (1997-2017) de la tasa de resistencias a las sulfamidas en MH.

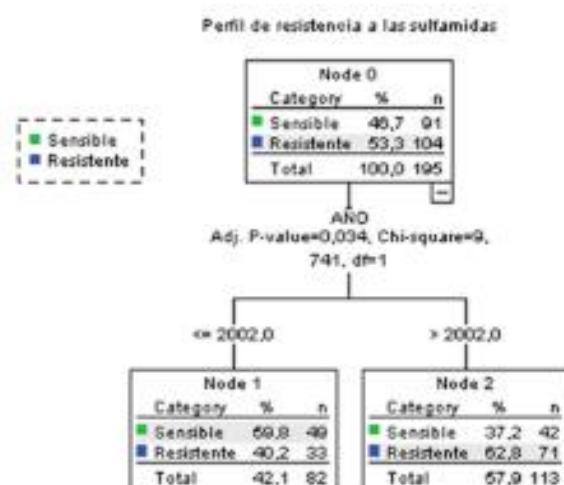


Figura 14. Evolución durante el periodo (1997-2017) de la tasa de resistencias a las sulfamidas en PM.

Con respecto a PM, también se ha producido un incremento de la tasa de resistencias a las sulfamidas. Como muestra la Figura 14, se aprecian dos periodos con diferencias significativas. De 1997 al 2002 la tasa de resistencias se situaba en el 40,20% y desde el año 2002 a la actualidad esta tasa se ha incrementado hasta el 62,80%. Esta evolución podría explicarse por el uso muy extendido en los últimos años de sulfamida+trimetropim, en el pienso medicado para corderos. También podría haber contribuido el incremento del uso por vía parenteral de sulfamidas como parte de tratamientos.

El porcentaje de resistencias para aquellas familias que no tuvieron variaciones significativas en el periodo de estudio fue del 75,50% frente a macrólidos, del 95,10% frente a aminoglucósidos (que representaron la tasa más alta observada), del 29,50% frente a tetraciclinas y del 9,50% frente a lincosamidas.

En el resto de familias antibióticas estudiadas no se han observado variaciones estadísticamente significativas para MH, PM o BT.

Conviene destacar que para aquellas familias de antibióticos en las que se observaron variaciones estadísticamente significativas en la tasa de resistencias se tiene constancia de su uso en piensos medicados para corderos. Es el caso de las sulfamidas, cuyas resistencias aumentaron con el tiempo, las quinolonas en las que se ha producido un descenso posiblemente por su prohibición de su uso en forma premix. Sin embargo, esto no sucede siempre, por ejemplo, el uso de las tetraciclinas en los piensos no ha implicado una variación estadística en su tasa de resistencias.

CONCLUSIONES.

Las conclusiones extraídas del presente estudio se citan a continuación:

- Eliminando los agentes no respiratorios, por su posible implicación como agentes contaminantes, los principales agentes respiratorios encontrados asociados al complejo respiratorio ovino fueron *Mannheimia haemolytica* con el 33,00% de los aislamientos y *Pasteurella multocida*, el género *Mycoplasma* y *Bibersteinia trehalosi* con el 18,00%, 13,00% y 3,00% respectivamente.
- Las familias de antibióticos frente a las que se encontraron más resistencias, en *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Bibersteinia trehalosi*, fueron aminoglucósidos y macrólidos con el 95,10% y 75,50% respectivamente de tasa de resistencias en el conjunto de los tres gérmenes
- En los tres gérmenes principales asociados al CRO se comprobó la aparición de multirresistencias a betalactámicos, quinolonas, sulfamidas, aminoglucósidos y tetraciclinas. Siendo mayor de un 32,00% la tasa de resistencias a más de una familia estudiada y superior al 2,42% la tasa de resistencias a esas cinco familias..
- Se han encontrado asociaciones entre familias de antibióticos que favorecen significativamente la aparición de multirresistencias en *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Bibersteinia trehalosi*.

- En los últimos 20 años la tasa de resistencias en *Mannheimia haemolytica* para las quinolonas ha descendido (posiblemente asociado a la retirada de esta familia de su uso como premix), mientras que para sulfamidas se ha incrementado y en *Pasteurella multocida* se ha observado el mismo incremento para las sulfamidas.

CONCLUSIONS.

The conclusions drawn from this study are cited below:

- Excluding non respiratory agents due to their possible involvement as contaminating agents, the main respiratory agents associated with the Ovine Respiratory Complex (ORC) were: *Mannheimia haemolytica* (MH), *Pasteurella multocida* (PM), *Mycoplasma* (My) and *Bibersteinia threalosi* (BT) (33.00%, 18.00%, 13.00% and 3.00% respectively)
- In cases where MH, PH and BT were involved aminoglycosides and macrolides were the antibiotic families which showed the highest resistance rate (95.10% and 75.50% respectively).
- The study of resistant profile in the main agents associated with ORC to betalactamics, quinolones, sulfamides, aminoglycosides and tetracyclines showed that more than 32.00% fo isolaments were resistant to two o more antibiotics families and more than 2.42% resistent to all of them.
- There were significant associations between antibiotic families which trigger the apparition of new multidrug resistances of MH, PM and BT.
- In the last two decades the resistance rate of MH to quinolones has decreased (could beassociated with the removal of his family of antibiotics from the premix feed use) while the resistance rate to sulfamides in MH and PM has increased.

VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS.

En lo personal he aprendido mucho realizando este trabajo, en especial me he dado cuenta de lo dura y exigente que es la investigación científica. Creo que este trabajo me ha servido para mejorar en muchos aspectos que son importante en la profesión veterinaria y me ha servido también para conocer la realidad del mundo de las resistencias a los antibióticos. Además, me ha servido para adquirir competencias en la búsqueda de información y en el uso de la ofimática, tanto en la elaboración de textos como en el análisis estadístico.

Por último, solo quiero agradecer a todo el mundo que ha colaborado conmigo en el trabajo. En especial a mis tutores por su infinita paciencia y ayudarme siempre que lo necesitaba, el Dr. José María González y las Dras. Aurora Ortín y Marta Borobia, pero también a todo el servicio del SCRUM tanto a los profesores como a los compañeros, al Laboratorio Agroalimentario de Aragón por la aportación de la información necesaria en la realización de este trabajo, a los veterinarios que han recogido muestras a partir de las cuales se pudieron

realizar los cultivos y a más gente a la que supongo no habré nombrado. Como nota positiva, además de todo lo que he aprendido, espero que esta información sea de verdad útil en un futuro para el avance en el conocimiento de este problema.

BIBLIOGRAFÍA.

- Al Sultan I. & Aitken I.D. (1985). The tonsillar carriage of *pasteurella haemolytica* in lambs. *J Comp Pathol*, 95: 193-201.
- Andersson D.I. & Hughes D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 260–271.
- Andersson D.I. & Hughes D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol. Rev.*
- Babetsa M., Sandalakis V., Vougidou C., Zdragas A., Sivropoulou A., Psaroulaki A. & Ekateriniadou L. V. (2012). Tetracycline resistance genes in *Pasteurella multocida* isolates from bovine, ovine, caprine and swine pneumonic lungs originated from different Greek prefectures. *African Journal of Microbiology Research*, 6(17), 3917–3923.
- Bell S. (2008). Respiratory disease in sheep - 1. Differential diagnosis and epidemiology. *In Practice*, 30: 200-207.
- Berge, A. C. B., Sischo W. M. & Craigmill A. L. (2006). Antimicrobial susceptibility patterns of respiratory tract pathogens from sheep and goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(8), 1279–81.
- Blackall P.J., Bojesen A.M., Christensen H. & Bisgaard M. (2007). Reclassification of *Pasteurella trehalosi* as *bibersteinia trehalosi* gen nov, comb nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 666-674.
- Boyce J.D. & Adler B. (2000). The Capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infection and Immunity*, 68, 3463-3468.
- Caroprese A. (2008). Sheep housing and welfare. *Small Ruminant Research*, 76: 21-25.
- Caroprese M., Albenzio M., Marzano A., Schena L., Annicchiarico G. & Sevi A. (2010). Relationship between cortisol response to stress and behavior, immune profile, and production performance of dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 93: 2395-2403.
- Center for Disease Control and Prevention (2016). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Acceso el 23 de agosto de 2017.
- Cercenado E. & Saavedra-Lozano J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada*, 7(4), 214–217. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)71927-4)
- Chazel M., Tardy F., Le Grand D., Calavas D. & Poumarat F. (2010). Mycoplasmoses of ruminants in france: Recent data from the national surveillance network. *Bmc Veterinary Research*, 6.
- Chopra I. & Roberts M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, cations, molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:232-260.
- Civljak R., Giannella M., Di Bella S. & Petrosillo N. (2014). Could chloramphenicol be used against ESKAPE pathogens. A review of in vitro data in the literature from the 21st century. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12, 249–264. [10.1586/14787210.2014.878647](https://doi.org/10.1586/14787210.2014.878647)

- Clatworthy A. E., Pierson E. & Hung D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3(9), 541–548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>.
- Costa M.M., Drescher G., Maboni F., Weber S.S., Schrank A., Vainstein M.H., et al (2010). Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2010;62:30– 6.
- Cucco L., Massacci F.R., Sebastiani C., Mangili P., Bano L., Cocchi M., Luppi A., Ortenzi R., Pezzotti G. & Magistrali C.F. (2017). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* strains isolated from hosts affected by various diseases in Italy. *Veterinaria Italiana* 2017, 53 (1), 21-27. doi: 10.12834/VetIt.661.3256.2
- De Jong A., Thomas V., Simjee S., Moyaert H., El Garch F., Maher K., Morrissey I., Butty P., Klein U., Marion H., Rigaut D. & Vallè M. (2014). Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study. *Vet Microbiol*, 172 (1-2), 202-215.
- De las Heras M. (2001). Las pasteurellas en la patología respiratoria ovina. En Simposium Satélite sobre Pasteurelosis Ovina. SEOC 2001. Sevilla.
- Donachie W. (2000). 2nd. Ed. Enfermedades de la oveja. *Pasteurellosis*. Zaragoza.: Editorial Acribia S.A. 230-238
- Dziva F., Muhairwa A.P., Bisgaard M. & Christensen H. (2008). Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol*, 128, 1-22.
- European Centre for Disease Prevention and Control Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. (2015) In Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net); ECDC: Stockholm, 2015.
- European Medicines Agenc [EMA] (2015). Stockholm/Parma/London:ECDC/EFSA/EMA first join treporton the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food producing animals. *EFSA J.* 13:4006.
- Frere J.M., Joris B., Granier B., Matagne A. & Bourguignon-Bellefroid. (1991). Diversity of the mechanisms of resistance to β-lactam antibiotics. *Res Microbiol* 142:705-710.
- Figueiredo R., Henriques A., Sereno R., Mendonça N., da Silva G.J. (2015). Antimicrobial resistance and extended-spectrum β-lactamases of *Salmonella enterica* serotypes isolated from livestock and processed food in Portugal: an update. *Foodborne Pathog Dis* 2015;12:110–17.
- Gay E., Cazeau G., Jarrige N. & Calavas D. (2012). Antibiotic use in domestic ruminants in france: Results from surveys of practices among farmers and veterinarians. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*, 53: 8-11.
- Giangaspero M., Vanopdenbosch E., Nishikawa H. & Tabbaa D. (1997). Prevalence of antibodies against respiratory viruses (parainfluenza virus type 3, respiratory syncytial virus, reovirus and adenovirus) in relation to productivity in syrian awassi sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 29: 83-91.
- González J.M. (2000). Aspectos económicos relacionados con procesos neumónicos en corderos. En Jornada de actualización de la S.E.O.C. patología respiratoria del cordero Zaragoza 24 Junio. Zaragoza. pp. 5-17.
- González J.M., De las Heras M., Ferrer L.M., Figueras L., Garcia de Jalón J.A. & Lacasta D. (2001). Las neumonías catarrales crónicas influyen negativamente en los índices productivos del cordero tipo ternasco. En XXVI Jornadas Científicas de la SEOC. Sevilla. pp. 742-748.

- González J.M., Lacasta D., Ferrer L.M., Figueras L., Abadie G. & De las Heras M. (2013). Mannheimia haemolytica and bibersteinia trehalosi serotypes isolated from lambs with ovine respiratory complex in spain. Deltion tēs Ellēnikēs Ktēniatrikēs Etaireias = Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 64: 177-182.
- González J.M., Lacasta D., Ferrer L.M., Figueras L., Ramos J.J. & De las Heras M. (2014). Gabinete Técnico Veterinario SI ZS. Natural border disease virus infection in feedlot lambs. Veterinary Record, 174: 69.
- González J.M. (2015). La producción de corderos de cebo en españa. Aspectos sanitarios más relevantes. En XL Jornadas Científicas de la SEOC. Castellón de la Plana. pp. 162-174.
- Hervas J., Mendez A., Gomez-Villamandos J.C., Villalba E., Diaz E., Cano T., Carrasco L., Padro J.M., Fernandez A. & Sierra M.A. (1996). Etiologic and pathologic study of respiratory disease in lambs from intensive breeding facilities in southern spain. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 43: 221-231.
- Jackson J., Chen C. & Busing K. (2013). Aminoglycosides: how should we use them in the 21st century? Curr. Opin. Infect. Dis. 26, 516–525. 10.1097/QCO.0000000000000012.
- Jarrige N., Jouy E., Haenni M., Gay E., Madec J.Y. (2014). Résapath: réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Bilan 2014. ANSES; 2015. Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-Resapath2014.pdf>.
- Jones G.E., Field A.C., Gilmour J.S., Rae A.G., Nettleton P.F. & McLauchlan M. (1982). Effects of experimental chronic pneumonia on bodyweight, feed intake and carcass composition of lambs. Vet Rec, 110: 168-173.
- Jones G.E. & Gilmour J.S. (2000). Mycoplasma respiratory infections. En: Diseases of sheep (Eds., pp. 198-201. Oxford. Blackwell Science.
- Kılıç A., Kalender H., Eroksuz H., Muz A. & Tasdemir B. (2013). Identification by culture, pcr, and immunohistochemistry of mycoplasmas and their molecular typing in sheep and lamb lungs with pneumonia in eastern turkey. Tropical Animal Health and Production, 45: 1525-1531.
- Klima C. L., Alexander T. W., Read R. R., Gow S. P., Booker C. W., Hannon S. & Selinger L. B. (2011). Genetic characterization and antimicrobial susceptibility of Mannheimia haemolytica isolated from the nasopharynx of feedlot cattle. Veterinary Microbiology, 149(3-4), 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.018>.
- Klima C.L., Zaheer R., Cook S.R., Booker C.W., Hendrick S., Alexander T.W. & McAllister T.A. (2014). Pathogens of bovine respiratory disease in north american feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements. Journal of Clinical Microbiology, 52: 438-448.
- Lacasta D. (2006). Influencia de los factores medioambientales en la patología respiratoria del cordero en sistemas de producción semiextensivo de ganado ovino de Aragón., in Departamento de Patología Animal.2006, Universidad de Zaragoza. Facultad Veterinaria.: Zaragoza.p. 227.
- Lacasta D., Ferrer L.M., Ramos J.J., González J.M. & De las Heras M. (2008). Influence of climatic factors on the development of pneumonia in lambs. Small Ruminant Research, 80: 28-32. L
- Lacasta D., González J.M., Ramos J.J., Ferrer L.M., Ruíz de Arcaute M., Garciandia A. & Borobia M. (2012). Complejo respiratorio ovino. Tierras.: 16-20.
- Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., et al (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 2016;16:161–8.

- Lofton H., Pranting M., Thulin E. & Andersson D.I. (2013). Mechanisms and fitness costs of resistance to antimicrobial peptides LL-37, CNY100HL and wheat germhistones. PLoS ONE 8, e68875.
- Lu L., Dai L., Wang Y., Wu C., Chen X., Li L., et al. (2010). Characterization of antimicrobial resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in Eastern China. Acta Trop 2010;113:20–5.
- Luzón J. (1999a). Influencia de las afecciones respiratorias en los principales parámetros productivos de los corderos tipo ternasco., Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria. Zaragoza.
- MAGRAMA (2015). Encuesta ganaderas ovino-caprino.
- MARAN (2015). Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in Netherland in 2014. Available at: <http://www.cvi.wur.nl>
- Moreno B. (1994). Contribución al conocimiento de la neumonía del cordero., Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria., Zaragoza.
- Niang M., Rosenbusch R.F., Andrews J.J., Lopez-Virella J. & Kaeberle M.L. (1998). Occurrence of autoantibodies to cilia in lambs with a 'coughing syndrome'. Veterinary Immunology and Immunopathology, 64: 191-205.
- Nicholas R.A.J., Ayling R.D. & Loria G.R. (2008). Ovine mycoplasmal infections. Small Ruminant Research, 76: 92-98.
- Nienaber J.A. & Hahn G.L. (2007). Livestock production system management responses to thermal challenges. International Journal of Biometeorology, 52: 149-157.
- Odugbo M.O., Odama L.E., Umoh J.U. & Lombin L.H. (2004). The comparative pathogenicity of strains of eight serovars and untypable strains of *mannheimia haemolytica* in experimental pneumonia of sheep. Vet Res, 35: 661-669.
- Oruç E. (2006). The pathologic and bacteriologic comparison of pneumonia in lambs. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 30: 593-599.
- Premanandh J., Samara B.S. & Mazen A.N. (2016). Race against antimicrobial resistance requires coordinated action – an overview. Front. Microbiol. 6:1536. doi: 10.3389/fmicb.2015.01536.
- Perron G.G., Zasloff M. & Bell G. (2006). Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. Proc. Biol. Sci. 273, 251–256.
- Post K.W., Cole N.A. & Raleigh R.H. (1991). In vitro antimicrobial susceptibility of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* recovered from cattle with bovine respiratory disease complex. J Vet Diagn Invest 1991, 3:124–126.
- Richard Adams H. (2003). Farmacología y terapéutica veterinaria. 2nd ed. Zaragoza:ACRIBIA, S.A., p.852, 931,962.
- Roberts M. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol Letters. 245:195-203.
- Samuelson O., Haukland H.H., Jenssen H., Kramer M., Sandvik K., Ulvatne H. & Vor-lund L.H., (2005). Induced resistance to the antimicrobial peptide lactoferricin B in *Staphylococcus aureus*. FEBS Lett. 579, 3421–3426.
- Sevi A., Albenzio M., Annicchiarico G., Caroprese M., Marino R. & Taibi L. (2002). Effects of ventilation regimen on the welfare and performance of lactating ewes in summer. Journal of Animal Science, 80: 2349-2361.
- Singer R.S., Finch R., Wegener H.C., Bywater R., Walters J. & Lipsitch M. (2003). Antibiotic resistance the interplay between antibiotic use in animals and human beings. Lancet Infect Dis. 3, 47–51.

- Southeey B.R., Rodriguez-Zas S.L. & Leymaster K.A. (2004). Competing risks analysis of lamb mortality in a terminal sire composite population. *Journal of Animal Science*, 82: 2892-2899.
- Sumano Lopez H. & Ocampo Camberos L. (2006). Farmacología Veterinaria. 3rd ed. México: McGraw-Hill Interamericana, p.151,210.
- Taroco R., Seija V. & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas de Bacteriología Y Virología Médica, (Cim), 663–672. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., et al. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015, 112:5649-54.
- Veríssimo C. J., Niciura S. C. M., Alberti A. L. L., Rodrigues C. F. C., Barbosa C. M. P., Chiebao D. P. & Molento M. B. (2012). Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 187(1–2), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.013>.
- Wang J., Li J., Chen H.N., Chang H., Tanifum C.T., Liu H., Czyryca P.G. & Chang C.W. (2005) Glycodiversification for the optimization of the kanamycin class aminoglycosides. *J Med Chem*. 2005 Oct 6;48(20):6271-85.
- Waxman D. J. & Strominger J. L. (1983). Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 825–869. 10.1146/annurev.bi.52.070183.004141.
- World Health Organization (2015). Model list of essential medicines: 19th list (updated) August 2015. World Health Organization.
- World Health Organization (2012). Critically important antimicrobials for human medicine. 3rd revision 2011. Geneva, Switzerland: WHO, <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf?ua=1&ua=1>; 2012. Acceso 23 de agosto de 2017.
- Zecchinon L., Fett T. & Desmecht D. (2005). How *mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res*, 36: 133-156.