



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE:

RESUMEN / SUMMARY	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Población ruminal.	4
1.1.1 Bacterias.....	4
1.1.2 Protozoos.	6
1.1.3 Hongos.....	7
1.1.4 Cambios en la flora.....	8
1.2 Florfenicol.....	9
1.2.1 Farmacodinamia.....	9
1.2.2 Farmacocinética	10
2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	13
3.1 Procedimiento de la ruminocentesis.	13
3.2 Valoración laboratorial del líquido ruminal.	14
3.2.1 Valoración del pH:	14
3.2.2 Valoración de la cantidad, tamaño y movilidad de los infusorios ruminales:.....	14
3.2.3 Valoración de la proporción de bacterias Gram positivas y Gram negativas:	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1 Análisis de la cantidad de los infusorios ruminales.....	16
4.2 Análisis del tamaño de los infusorios del líquido ruminal.....	18
4.3 Análisis del movimiento de los infusorios del líquido ruminal.....	19
4.4 Análisis del pH del líquido ruminal.....	20
4.5 Análisis de las bacterias Gram del líquido ruminal.	21
5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.	23
6. VALORACIÓN PERSONAL.....	24
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia el efecto que ejerce el florfenicol sobre la flora ruminal de ovejas gestantes. El objetivo del estudio fue la reproducción de una serie de cuadros clínicos acontecidos a nivel de campo en diferentes rebaños, tras la administración de este antibiótico.

Para intentar reproducir los casos fueron necesarias diez ovejas en último tercio de gestación, de las cuales cinco se utilizaron como control y a las otras cinco se les administró florfenicol por vía intramuscular siguiendo la pauta y dosis terapéuticas. Para poder valorar el efecto del florfenicol sobre la flora del rumen se estudiaron los parámetros y características básicas del líquido ruminal en las diez ovejas. Para ello, se realizó la extracción de líquido ruminal mediante ruminocentesis en cuatro momentos distintos del estudio y se analizó a través de métodos laboratoriales, procediendo a la medición del pH de la muestra, la observación de la cantidad, el tamaño y la movilidad de infusorios mediante microscopía óptica y la realización de extensiones de líquido ruminal teñidas con la tinción de Gram.

Los datos fueron analizados posteriormente con el paquete estadístico *SPSS 20.0* (IBM, Michigan, Illinois). De los resultados obtenidos en las mediciones de pH y en todos los parámetros estudiados de los infusorios, ninguno resultó ser estadísticamente significativo ($p > 0.05$), ni entre los datos de ovejas control y ovejas tratadas, ni en los datos recogidos en las diferentes extracciones de líquido ruminal. Por otro lado, aunque el 60% de las ovejas tratadas experimentaron variaciones en sus poblaciones bacterianas del líquido ruminal, produciéndose un incremento en las bacterias Gram positivas, estas diferencias tampoco resultaron significativas.

Palabras clave: florfenicol, flora ruminal, ovejas gestantes.

FLORFENICOL EFFECT OVER RUMINAL LIQUID IN PREGNANT EWES

SUMMARY

In this work the effect of florfenicol on the ruminal flora of pregnant ewes is evaluated. The objective of the study was the reproduction of the clinical events occurred in three different commercial flocks after administration of the antibiotic in response of an abortion outbreak.

Ten pregnant ewes were necessary to perform the study. Five ewes were used as control group and the other five were treated with florfenicol through the intramuscular route by following the general guidelines of the product. To assess the effect of florfenicol on the ruminal flora, the basic parameters of ruminal fluid were analyzed in all ewes. In order to perform it, the ruminal fluid was extracted through ruminocentesis and pH was measured, as well as the characteristics of the infusoria present in the samples (amount, size, and mobility), by using optical microscopy and preparing smears from the ruminal fluid, stained with Gram stain, to observe the different bacteria population.

Subsequently, the data were analyzed with the statistical package *SPSS 20.0* (IBM, Michigan, Illinois). Neither pH measures nor the rest of the studied parameters concerning infusoria and bacteria were statistically significant ($p>0.05$), between the control and the treated ewes. Although 60% of the treated ewes suffered changes in their ruminal bacterial population, increasing their Gram positive population, neither these differences were not statistically significant.

Keyword: florfenicol, ruminal flora, pregnant ewes

1. INTRODUCCIÓN.

Los ovinos son animales rumiantes y herbívoros, alimentándose fundamentalmente de pastos, forrajes, silos, cereales etc. que contienen componentes como la celulosa, la hemicelulosa o la lignina (polisacáridos insolubles). Los rumiantes, al igual que otros animales, no pueden degradar los enlaces glucosídicos β -1,4 de la celulosa, por ello han desarrollado una compleja microbiota simbiote, que implica una asociación íntima de organismos de especies diferentes para beneficiarse mutuamente en su desarrollo vital. Esta microbiota, incluye bacterias, protozoos, hongos y arqueas (Van Soest, 1994). Esta asociación les ha permitido adaptarse al consumo de vegetales pudiendo hidrolizarlos y de esta forma obtener energía de ellos.

Los rumiantes poseen una cámara fermentativa que está compuesta por tres compartimentos o preestómagos: el retículo, el rumen y el omaso. Éstos se caracterizan por no tener epitelio glandular, a diferencia del abomaso que posee un epitelio excretor y que realiza la misma función que el estómago de los monogástricos.

El rumen es el preestómago de mayor capacidad, conectado en su parte posterior con el retículo mediante el pliegue retículo-ruminal. La parte anterior está conectada a través del esófago con la cavidad oral, existiendo un continuo flujo de material que entra y sale de él mediante el proceso de la rumia.

El rumen posee unas características que permiten que la microbiota que se desarrolle sea abundante y diversa, lo que es fundamental para una correcta fermentación y digestión de los componentes de la dieta de los rumiantes. Igualmente, posee una temperatura que suele encontrarse en un rango entre 38 y 41°C, uno o dos grados por encima de la temperatura corporal (Silva et al., 2007). El flujo de la comida, el agua y la saliva, la cual posee gran cantidad de fosfatos y bicarbonatos que proporcionan propiedades tampón, mantienen el pH del líquido ruminal y la ingesta en valores cercanos a la neutralidad, levemente ácidos (Manson, 1951). Estos valores se encuentran entre 5,5 y 6,9, siendo el pH uno de los factores más variables. A pH 6 las bacterias celulolíticas quedan inhibidas, mientras que a pH 5,5 la función ruminal es anormal debido a la acidosis. Las ovejas pueden producir entre 10 y 15 litros de saliva al día (Czerkawski, 1986). La osmolaridad del rumen se encuentra en valores entre 260 y 340 mOsm, la cual permite que se lleve a cabo una correcta fermentación de los alimentos. Además, el potencial redox se mantiene en valores bajos (-0.4V) y la concentración de oxígeno es prácticamente inexistente, lo que permite el desarrollo de una microbiota anaerobia estricta, aunque también hay presentes bacterias anaerobias facultativas (Silva et al., 2007).

El conjunto retículo-rumen es un ecosistema abierto, lo que permite la entrada continua de sustratos y la salida de microorganismos muertos y desechos. El rumen, además, contiene un medio acuoso que permite que se lleven a cabo todas las reacciones bioquímicas.

Finalmente, es importante saber que el número de microorganismos, así como las funciones que estos desempeñan, están íntimamente asociados tanto con desórdenes metabólicos como con el bienestar de los animales (Bryant, 1959).

Para poder entender con mayor claridad el ecosistema ruminal, a continuación se pasará a describir con mayor detalle los tres tipos de poblaciones que integran su flora.

1.1 Población ruminal.

1.1.1 Bacterias.

La gran mayoría de las bacterias son Gram negativas y el número de bacterias Gram positivas tiende a aumentar con dietas que tienen niveles elevados de energía.

La microbiota del rumen puede ubicarse en tres localizaciones distintas:

1. Adherida a la pared.
2. Asociada a partículas alimentarias (SAB: solid adherent bacteria).
3. Libres flotando en el líquido ruminal (LAB: liquid associated bacteria).

Las bacterias que se desarrollan adheridas a la pared ruminal suelen ser anaerobias facultativas, pueden utilizar el O₂, ya que el epitelio ruminal está bien oxigenado e irrigado (Van Soest, 1994). Además, esta población tiene acceso continuo a los sustratos del fluido ruminal debido a las contracciones rítmicas que ocurren en el complejo retículo-rumen. Igualmente, tienen acceso a los metabolitos que atraviesan el epitelio (McCowan, 1978).

Las SAB Se encuentran adheridas al sustrato que utilizan, y abandonan el rumen cuando estas partículas de alimento reducen suficientemente su tamaño. Pueden constituir entre el 70 y el 75% del flujo microbiano que abandona el rumen, constituyendo así la comunidad microbiana más importante en cantidad y la que mayor actividad fibrolítica desarrolla. Algunos gérmenes frecuentes en este grupo son *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Borrelia spp.* (Martínez, 2009).

Las LAB se encuentran en el líquido ruminal y consumen componentes solubles del mismo. Las más comunes son *Bacteroides spp.*, *Streptococcus spp.* y *Megasphaera spp.* Todas ellas se

caracterizan por una alta velocidad de división celular, lo que permite su mantenimiento en el medio con elevadas tasas de renovación (Czerkawsky, 1988).

Varias investigaciones han demostrado que la unión de los microorganismos ruminales a los sustratos es un requisito previo para la digestión de las partículas de alimentación en el rumen (McAllister, 1994).

Por otro lado, las bacterias también pueden clasificarse en base a los sustratos que emplean y los productos finales de su fermentación, si bien, una misma especie bacteriana puede cumplir más de una función metabólica.

Tabla 1. Agrupación de las especies bacterianas presentes en el rumen de acuerdo al tipo de sustrato de fermentación. (Parra, 2010)

Grupo de bacterias	Característica funcional	Principales productos finales de su metabolismo	Ejemplo
Celulolíticas	Fermentan hidratos de carbono estructurales de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas)	Ácidos grasos volátiles – AGV- (especialmente acetato)	<i>Fibrobacter succinoges</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i>
Amilolíticas	Fermentan hidratos de carbono de reserva de granos (almidón)	AGV (especialmente propionato)	<i>Streptococcus bovis</i> <i>Bacteroides amylophilus</i>
Sacarolíticas	Fermentan hidratos de carbono simples (azúcares vegetales)	AGV(especialmente butirato)	<i>Lactobacillus vitulinus</i> <i>Treponema bryantii</i>
Lipolíticas	Metabolizan las grasas	Acidos grasos libres y AGV (especialmente propionato)	<i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Treponema bryantii</i>
Proteolíticas	Degradan proteína	AGV y amoníaco (NH ₃)	<i>Bacteroides amylophilus</i>
Metanógenas	Producen metano	Metano (CH ₄).	<i>Methanobacterium ruminantium</i> <i>Methanobacterium formicium</i>
Ureolíticas	Hidrolizan la urea	CO ₂ y NH ₃ .	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <i>Bacteroides ruminicola</i>

1.1.2 Protozoos.

Los protozoos conviven en el rumen junto con hongos y bacterias, estando bien adaptados a vivir en ese hábitat, lo que los ha convertido en microorganismos endosimbiontes de los rumiantes (Zapata et al., 2010).

Los protozoos ruminales se encuentran en una concentración, tanto en vacuno como en ovino, en un rango de entre 6×10^4 y 4×10^6 /ml (Hungate, 1996), por lo que constituyen un 50% de la biomasa viable del rumen. Por todo ello, se estima que es la segunda población más abundante del rumen. Su densidad y diversidad está influenciada por factores como la edad, la genética y la dieta.

Los protozoos son anaerobios estrictos y se clasifican fundamentalmente en dos grupos: holotricos y entodiniomorfos. Los holotricos tienen la superficie del cuerpo cubierta de cilios, por lo que son móviles, y de forma ovalada o redondeada. Otra característica es que utilizan carbohidratos no estructurales, fundamentalmente solubles, en su alimentación. Los entodiniomorfos se caracterizan por tener una película rígida, espinas, placas esqueléticas y mechones ciliados en su superficie dorsal (Kumar et al., 2015). Para su alimentación pueden utilizar almidón, almacenándolo en ocasiones en forma de vacuolas, celulosa, hemicelulosa, pectina y azúcares solubles (Van Soest, 1994).

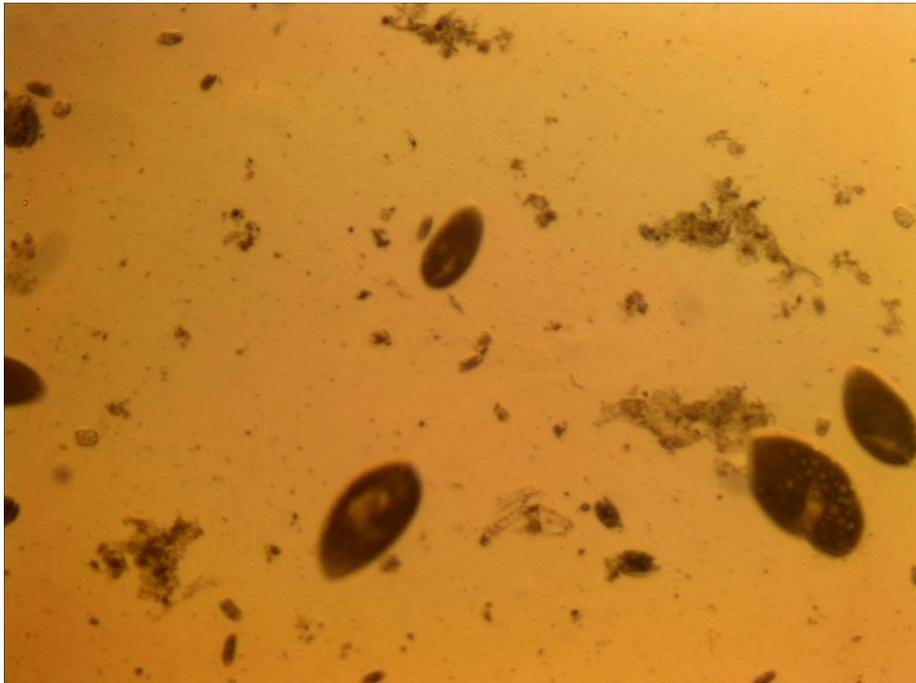


Imagen 1. Infusorios ruminales (Lorente, 2017).

Los rumiantes no poseen protozoos en sus estómagos al nacer, pero los obtienen mediante la regurgitación de los alimentos con contenido ruminal y su mantenimiento en la boca durante la rumia. También, la cría puede recibirlos directamente de la madre mediante la limpieza a través del lamido.

Sin embargo, los protozoos, aunque están presentes en el rumen en condiciones normales, no son imprescindibles para la función ruminal ni para la supervivencia del animal, ya que los animales defaunados pueden sobrevivir sin ellos y los procesos de fermentación siguen igualmente sin su presencia. No obstante, se ha visto que cuando disminuye el número de protozoos, el número de bacterias tiende a crecer (Martínez, 2009).

Los protozoos contribuyen activamente al control de la población bacteriana y a la formación de productos finales de la fermentación (Nsabimana et al., 2003). Desde el punto de vista metabólico, los protozoos se diferencian de las bacterias porque poseen menor capacidad celulolítica y, además, no son capaces de sintetizar proteínas a partir de nitrógeno no proteico (NNP). Otra importante función está relacionada con la ingestión de bacterias amilolíticas y fragmentos de almidón, los cuales son englobados en su interior, protegiéndolos de la fermentación bacteriana y manteniéndolos en su interior hasta que son digeridos por el propio protozoo. Cuando los protozoos mueren o son arrastrados por el bolo alimenticio, hacia el intestino delgado, son digeridos por las enzimas, prolongando la digestión de estos sustratos (Álvarez et al., 2009). De la misma manera, con su muerte en el rumen también aumentan el valor biológico de la proteína, ya que liberan proteína al medio que es utilizada por las bacterias, degradándola en cadenas carbonadas y amoníaco para cubrir sus necesidades.

Por último, cabe mencionar que los protozoos son empleados como indicadores del estado del rumen. Su desarrollo se da preferiblemente a un pH superior a 6, mientras que cuando se dan trastornos digestivos, como acidosis ruminales, éstos presentan menor motilidad y desaparecen progresivamente: en primer lugar los grandes, luego los medianos y finalmente los pequeños (Ramos et al., 2007).

1.1.3 Hongos.

Los primeros hongos ruminales fueron descubiertos por el científico británico Colin Orpis en 1975. Aunque en el rumen también existen hongos aerobios, la gran mayoría son microorganismos anaerobios y suponen entre un 5 y un 20% de la biomasa microbiana total. El hecho de que su descubrimiento fuera algo más tardío al de resto de microorganismos, probablemente se debe a los métodos de trabajo empleados durante mucho tiempo, en los que se retiraba las partículas sólidas del líquido ruminal para el análisis de éste. Gran parte de

los hongos, principalmente los anaerobios, se encuentran adheridos a las partículas sólidas e incluso en el interior de las partículas vegetales (Bauchop, 1985).

Se ha observado que la colonización del rumen por los hongos se da a edades muy tempranas. En corderos de dos semanas de vida, se han encontrado hongos anaerobios incluso cuando estos eran separados de otras ovejas adultas. Esto sugiere que la madre juega un papel importante en la transferencia inicial de estos organismos al cordero, siendo la saliva una vía relevante (Fonty et al., 1987). Sin embargo, también existe intercambio a través de los aerosoles y materia fecal, siendo el pasto una zona de transferencia habitual incluso entre rebaños.

Los hongos están asociados con bacterias y protozoos, aunque las interacciones directas con éstos pueden ser limitadas cuando los hongos desarrollan sistemas rizoides extensos dentro de las partículas de las plantas (Gordon, 1998). Son capaces de hidrolizar y utilizar la celulosa y la hemicelulosa (Martínez, 2009), debido a que producen todas las enzimas necesarias para que se produzca la descomposición de la biomasa de la planta (Kumar et al., 2015). El grado de presencia de estos microorganismos en el rumen también está relacionado con el tipo de dieta de los animales, estando asociados normalmente a dietas con un alto contenido de forraje (Bauchop, 1985).

1.1.4 Cambios en la flora.

Toda la flora ruminal descrita hasta ahora es sensible a los cambios que puedan modificar las características internas del rumen, siendo los cambios de dieta y los procesos patológicos los factores que con mayor frecuencia producen estos cambios.

Aunque son muchos los elementos capaces de provocar estas alteraciones de la flora este trabajo se centra en el efecto de los antibióticos sobre ella, de manera que será lo que se trate con mayor profundidad.

Entre los múltiples estudios que han demostrado la alteración de la microbiota ruminal y de sus procesos debido a la administración de antibióticos, en 1995 Van Nevel et al. demostraron que los antibióticos promotores del crecimiento, como los ionóforos y la amoxicilina disminuyen la lipólisis de un 10 hasta un 20%, pero también se observó la influencia de algunos antimicrobianos sobre diferentes patrones de fermentación, como son la proporción de AGV y la producción de CH₄. Por otro lado, en otro estudio, determinaron el efecto de antibióticos como la bacitracina, terramicina y los ionóforos sobre la eficiencia de crecimiento microbiano (Van Nevel et al., 1990).

En el estudio de Nagaraja et al., realizado en 1987, se demuestra la susceptibilidad o resistencia de las bacterias ruminales a antibióticos promotores del crecimiento. En él se pudo observar que las bacterias productoras de ácido láctico, generalmente, eran más susceptibles. De la misma forma, la mayoría de bacterias productoras de ácido butírico fueron sensibles a los antibióticos, con la única excepción de *Megasphaera elsdenii*, la cual, fue resistente a todos los antibióticos probados en el estudio. También hubo susceptibilidad por parte de las bacterias productoras de ácido fórmico, con la excepción de *Bacteroides ruminicola* y *Bacteroides succinogenes*, que producen ácido acético, ácido fórmico y ácido succínico, las cuales también fueron resistentes.

En general todas las bacterias productoras de ácido láctico, fórmico, butírico o hidrógeno como productos finales fueron susceptibles a los antibióticos, mientras que, las bacterias productoras de ácido succínico o fermentadoras de ácido láctico fueron resistentes.

Así pues, la bibliografía refleja desde hace tiempo una relación lógica entre la administración de antimicrobianos a rumiantes y la posibilidad de que estos desarrollen una disbiosis al producirse un desequilibrio entre sus poblaciones ruminales (Munch-Petersen et al., 1985; Bryant et al., 1965).

Finalmente, también hay descripciones de casos clínicos derivados del uso del florfenicol. En el año 2011, se expuso un caso en el que la administración de este antimicrobiano se relacionaba con una disbacteriosis en terneros. Este antibiótico administrado con la ración produjo una destrucción masiva de la flora bacteriana ruminal (Rojas et al., 2011). En otro estudio, también se describió que la administración de florfenicol a terneros reducía de manera intensa la fauna microbiana, mientras que en terneros que no habían recibido el antibiótico la flora tenía un comportamiento normal (Oultran et al., 2016).

1.2 Florfenicol.

El florfenicol pertenece a la familia de los anfenicoles. En este grupo también se encuentran el cloranfenicol y el tianfenicol (Pérez, 2010).

1.2.1 Farmacodinamia

El florfenicol es un antibiótico de amplio espectro, eficaz contra un amplio número de bacterias Gram positivas y negativas (Pérez, 2010). Está descrito que la actividad antimicrobiana del florfenicol, del cloranfenicol y sobre todo del tianfenicol, es menor frente a algunos microorganismos Gram positivos (Popova et al., 2001).

Estos tres compuestos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas uniéndose a las subunidades 50S y 70S de los ribosomas bacterianos (Cannon et al., 1990). Debido a esta unión se inhibe la enzima peptidiltransferasa, impidiendo la elongación de la cadena polipeptídica. El resultado es la inhibición de la multiplicación bacteriana, ejerciendo una acción bacteriostática (Bregante et al. 2004). Aunque los tres antibióticos comparten el mismo mecanismo de acción, presentan ciertas diferencias que hacen que haya modificaciones en sus efectos clínicos. Por ejemplo, el principal mecanismo de resistencia bacteriana al cloranfenicol y al tianfenicol se debe a la presencia de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en los microorganismos resistentes. La acetilación por la CAT impide la interacción del cloranfenicol con los ribosomas bacterianos, desactivando así el mecanismo de acción antibacteriana. En el florfenicol la presencia de un átomo de flúor en la posición C-3, en lugar de un grupo hidroxilo, hace a este antibiótico eficaz para aquellas bacterias con CAT ya que impide su acetilación. Por lo tanto, varias cepas bacterianas que son altamente resistentes tanto al cloranfenicol como al tianfenicol son sensibles al florfenicol (Pérez, 2010). Según algunos autores, su seguridad y eficacia convierte al florfenicol en el fármaco ideal para sustituir a los dos anteriores (Jianzhong et al., 2004).

Este antibiótico actúa, principalmente, como bacteriostático, aunque estudios in vitro han demostrado que puede actuar como bactericida frente a *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Histophilus somni* (AEMPS, 2012)

1.2.2 Farmacocinética

A continuación se explicará la farmacocinética del florfenicol mediante la revisión de diferentes estudios, ayudándonos a comprender el funcionamiento del fármaco en el organismo.

Existen varios trabajos en los que se estudia la farmacocinética en la especie ovina. Así pues, en el estudio realizado por Ali et al. (2003) se compara la farmacocinética y la tolerancia del florfenicol en distintas especies en función de la vía de administración (intravenosa e intramuscular). En el caso del ovino, siguiendo un modelo bicompartimental y administrando el antibiótico a una dosis de 20 mg/kg, los datos obtenidos para la vía intramuscular consistieron en un pico de concentración de plasma (C_{max}) de 1.04 ± 0.10 $\mu\text{g/ml}$ que se alcanzó (t_{max}) en 1.44 ± 0.16 horas y una vida media terminal ($t_{1/2}$) de 137.0 ± 12.16 minutos. La fracción de absorción del antibiótico (F) fue del $65.82 \pm 6.71\%$. Así pues, los valores de $t_{1/2}$ mediante administración intramuscular del antibiótico fueron de 127-151 minutos, mientras que por vía intravenosa fueron de 71-89 minutos. La administración intramuscular puede, por lo tanto,

proporcionar un extenso periodo con aproximadamente la misma concentración del fármaco en la sangre (Ali B.H et al, 2003).

En el estudio de Soback et al. (1995) se compara la farmacocinética del florfenicol después de su administración por las vías intravenosa, intramuscular e intramamaria en vacas lecheras. Se les administró a todos los animales una única dosis de 20 mg florfenicol/ kg de peso vivo para la inoculación por vía intravenosa, dos semanas más tarde recibieron la misma dosis pero por vía intramamaria y cuatro semanas tras la primera administración, los animales recibieron de nuevo la misma dosis, inyectada en la región del cuello, dividida en dos volúmenes equitativos, mediante vía intramuscular. Entre los resultados se obtuvo una C_{max} por vía intramuscular de 2,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y por vía intramamaria fue de 6,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que se alcanzó (t_{max}) en 3 horas por vía intramuscular y en 6 horas por vía intramamaria. La vida media terminal fue 3,9 veces mayor por vía intramuscular que por vía intravenosa. La fracción de absorción del antibiótico (F) por vía intramuscular fue de $38\pm 18\%$ y por vía intramamaria $54\pm 18\%$.

Los valores de $t_{1/2}$ fueron de 180 minutos para la vía intramuscular, de 231 minutos por vía intramamaria y de 751 minutos por vía intramuscular. Por lo tanto, reafirma los resultados del estudio de Ali B.H et al. (2003), pudiendo decir que el florfenicol tiene una mayor $t_{1/2}$ si es administrado por vía intramuscular que por cualquiera de las otras dos vías, proporcionando un mayor periodo de presencia del fármaco en el organismo.

En el estudio de Jianzhong et al., (2004), comparan la viabilidad y farmacocinética del florfenicol administrado por vía intravenosa e intramuscular en una única dosis de 20 y 30 mg/ kilo de peso vivo en ovejas. Se usó un modelo abierto tricompartmental para describir los datos de la concentración del fármaco en el plasma tras su inoculación intravenosa. Sin embargo, se utilizó un modelo monocompartmental para describir los datos obtenidos por vía intramuscular. Entre los resultados obtenidos para la vía intramuscular se obtuvo una C_{max} de $4,13\pm 0,29$ y $7,04\pm 1,61$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. Una F de 84,09% con la administración de 20 mg/mL y de 85,52% con la administración de 30 mg/mL.

No se han encontrado estudios que expliquen el efecto del fármaco sobre la flora ruminal de las ovejas, ni su distribución en este tejido. Sin embargo, se sabe que ciertas sustancias lipofílicas y alcalinas, como es el caso del florfenicol, tienden a acumularse en lugares cuyo pH es inferior al del plasma y al de su pK_a , como es el rumen, debido al mecanismo conocido como "ion trapping" (Jerzsele, 2012). Esto podría explicar los efectos reportados de este antimicrobiano sobre el rumen.

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.

El objetivo de este trabajo fin de grado es valorar el posible efecto del florfenicol sobre el aparato digestivo, y más específicamente sobre flora ruminal de ovejas en último tercio de gestación.

Este trabajo se planteó después de que fuera remitido al SCRUM (Servicio Clínico de Rumiantes de la Universidad de Zaragoza) un caso de mortalidad en ovejas adultas, presuntamente asociado a dicho antibiótico, el 4 de abril de 2016. Además, se tiene constancia de otras dos explotaciones en las cuales aparecieron ovejas muertas de forma sobreaguda tras la administración de florfenicol a una dosis de 20mg/kg de peso vivo por vía intramuscular durante 3 días, tal y como está indicado en la ficha técnica del producto. En todos los casos el antibiótico fue administrado como tratamiento terapéutico a un problema de abortos que las explotaciones estaban sufriendo, causado por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *abortus-ovis*.

Varios de estos animales se analizaron en la facultad de Veterinaria de Zaragoza, realizándose las necropsias en la sala del departamento de Anatomía Patológica. Todos los animales presentaban el mismo cuadro lesional con hemorragias y congestión generalizada, aunque éste era especialmente relevante en el aparato digestivo. También mostraban una intensa ruminitis con pérdida de integridad de la mucosa y una grave enteritis hemorrágica y se podía observar una necrosis difusa afectando a los hígados.

El contenido ruminal también fue objeto de análisis e igualmente, se analizaron tres muestras de líquido ruminal de animales de la misma explotación que no habían sido tratados con el antibiótico para poder comparar los distintos parámetros ruminales.

Por último, se analizaron 10 muestras de sangre de animales que habían sido tratados y presentaban una sintomatología de atonía ruminal grave, así como otras 10 muestras sanguíneas de animales tratados que no presentaban ninguna clínica.

El estudio de todas las muestras obtenidas en este caso llevó a la conclusión de que los animales padecían una disbiosis ruminal severa. Dentro de las características del líquido ruminal, se observó que las muestras provenientes de animales que padecían un cuadro severo tendían a presentar una cantidad menor de bacterias Gram negativas respecto a las muestras provenientes de animales sanos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para intentar reproducir el caso comentado anteriormente y valorar el efecto del florfenicol sobre distintos parámetros del líquido ruminal de la especie ovina, se llevó a cabo un estudio sobre diez ovejas en último tercio de gestación a las que se les realizaron cuatro ruminocentesis, con el fin de valorar el efecto del fármaco sobre la flora ruminal. Los animales implicados en el estudio fueron hembras adultas con una edad superior a cuatro años. Todas ellas permanecieron el mes previo y el tiempo que duró el estudio en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria. La alimentación que se proporcionó a todas ellas fue idéntica, consistiendo en paja y agua *ad libitum* y pienso concentrado racionado en 600 gramos diariamente.

Tras realizar el diagnóstico ecográfico de gestación, aquellos animales que se encontraban en el último tercio de gestación fueron seleccionados para el estudio y distribuidos en dos grupos:

Cinco ovejas fueron utilizadas como animales control y a las cinco restantes se les administró 20 mg de florfenicol por kilo de peso vivo por vía intramuscular durante 3 días consecutivos. La elección de los animales que formaron parte de cada grupo fue realizada al azar.

A cada animal, tanto del grupo tratado como del grupo control, se le realizaron cuatro extracciones del líquido ruminal, distribuidas en los días 1, 3, 5 y 10, siendo T_0 la extracción anterior a la inoculación del fármaco, T_1 la toma de muestra obtenida el día 3, al finalizar la pauta de tratamiento, T_2 la tercera extracción de líquido ruminal, 48 horas tras la finalización del tratamiento (día 5 del experimento) y T_3 tras una semana de la finalización del tratamiento (día 10 tras el inicio del estudio). Todas las extracciones fueron realizadas a la misma hora del día (17h) para evitar la aparición de diferencias en los resultados debidos al manejo. El día uno la ruminocentesis (T_0) se realizaba antes de la inoculación del fármaco y a continuación, se le administraba el florfenicol por vía intramuscular.

3.1 Procedimiento de la ruminocentesis.

Previamente a la extracción del líquido ruminal todos los animales eran completamente depilados en un área de $5 \times 5 \text{ cm}^2$ (Ramos et al., 2007) del lado izquierdo, por detrás de las costillas, desde mitad del abdomen hacia la parte ventral, zona donde se localiza el rumen. Posteriormente, dicha zona era insensibilizada mediante la aplicación por vía subcutánea de 2 ml de lidocaína al 2% (Anesvet, Laboratorios Ovejero©). A continuación, la

zona era desinfectada con povidona yodada (Braunol®, Braun) y finalmente, se realizaba la ruminocentesis para la extracción del líquido ruminal. Para ello, a unos diez centímetros aproximadamente, por detrás de la última costilla y a mitad del abdomen, se introducía una aguja de 2,1 x 60 mm y 14G conectada a una jeringuilla de 20 cc, en dirección ventrocraneal. La cantidad de líquido ruminal extraída fue, en el 80% del total de las extracciones, superior a 6 ml. Una vez extraído el líquido se aplicaba una jeringa con 5 ml de suero fisiológico estéril. Dicho suero se introducía a la vez que se retiraba la aguja para evitar arrastrar contenido ruminal al abdomen.

3.2 Valoración laboratorial del líquido ruminal.

3.2.1 Valoración del pH:

Tras la extracción de las muestras de líquido ruminal, el primer parámetro en ser estudiado era el pH. Los valores de éste eran obtenidos con un medidor de pH electrónico, el cual se calibraba todos los días utilizando las soluciones tampón proporcionadas por el fabricante. Posteriormente, se procedía a medir el pH de las muestras, introduciendo el electrodo en el líquido ruminal. El electrodo se lavaba con agua destilada entre una medición y otra para evitar mediciones erróneas.

3.2.2 Valoración de la cantidad, tamaño y movilidad de los infusorios ruminales:

En el estudio de los infusorios ruminales se valoraron los parámetros más importantes como son la cantidad, el tamaño y la movilidad de los mismos. Esto, se realizó mediante la observación directa a través de un microscopio óptico. Para la preparación de las muestras se depositó sobre un portaobjetos una gota de líquido ruminal, la cual era cubierta con un cubreobjetos. Las muestras fueron observadas a 40 aumentos. La movilidad fue valorada otorgando a la muestra una puntuación entre 1 y 3, dando el menor valor a las muestras que presentaban una movilidad nula y el mayor en el caso de tener la movilidad adecuada. Respecto al tamaño de los infusorios, éstos eran divididos en pequeños, otorgándoles una valoración de 1, medianos con un valor de 2 y grandes, con un valor de 3 y con las posibles combinaciones de tamaños que podían aparecer en la muestra. Finalmente, para la cantidad de infusorios presentes en la muestra se dieron los valores 1 para muestras con ausencia de infusorios, 2 para muy pocos infusorios, 3 para pocos infusorios y 4 cuando había una cantidad adecuada. Además, en cada muestra se tomaron cuatro fotos de distintos campos para obtener una visión objetiva de la muestra.



Imagen 2. Infusorios de distintos tamaños (Lorente, 2017).

Todos los datos fueron analizados en el programa *SPSS 20.0* (IBM, Michigan, Illinois), donde se agruparon en los parámetros a estudiar (pH, infusorios, bacterias Gram) y se analizaron mediante tablas de contingencia y pruebas Chi cuadrado. Algunos de estos parámetros fueron simplificados para realizar un segundo análisis, reduciendo las variables del parámetro a “normal/alterado” o “bien/mal”.

3.2.3 Valoración de la proporción de bacterias Gram positivas y Gram negativas:

Por último, para poder valorar la relación entre las poblaciones de bacterias Gram positivas y Gram negativas presentes en las muestras, se realizó la tinción de Gram sobre extensiones de líquido ruminal. Para ello, se añadió una gota de líquido ruminal sobre un portaobjetos, extendiéndose por arrastre y posteriormente se fijó mediante calor, para finalmente, proceder a su tinción siguiendo el protocolo habitual.

Todas las muestras fueron identificadas con el número de identificación de la oveja, fecha de extracción de la misma y número de extracción a la que correspondía.

Estas muestras, una vez teñidas, fueron observadas al microscopio a 100 aumentos con aceite de inmersión. Las bacterias Gram positivas aparecen teñidas de un color azul, mientras que las bacterias Gram negativas se observan teñidas de color rosáceo.

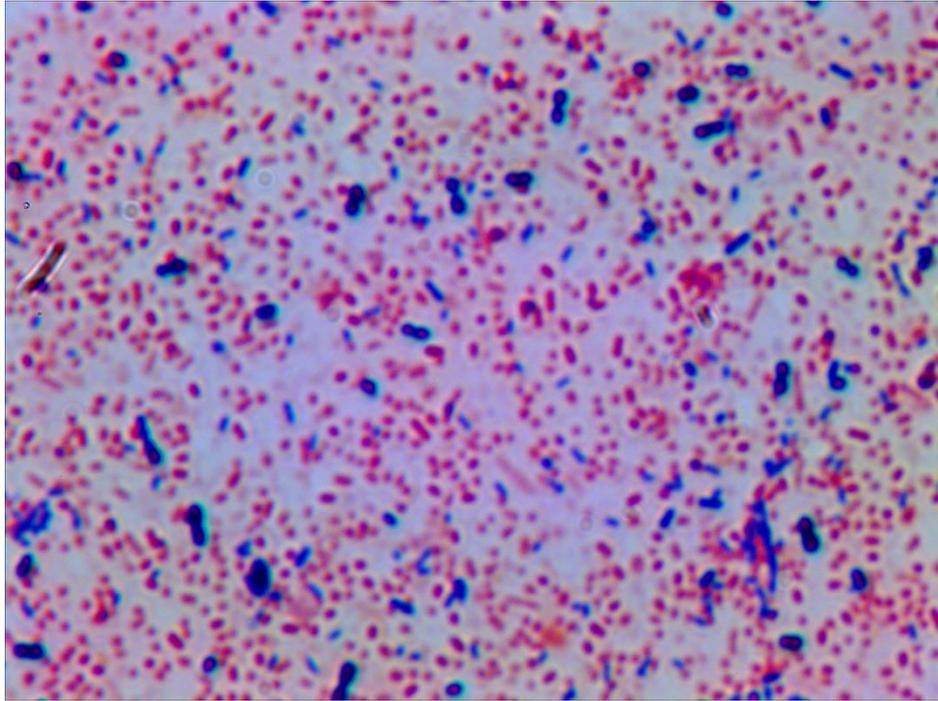


Imagen 3. Tinción de Gram. (Lorente, 2017).

Todos los estudios de los parámetros del líquido ruminal se realizaron en los laboratorios de la unidad de Patología médica del departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Los datos se introdujeron en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel y fueron analizados posteriormente con el paquete estadístico *SPSS 20.0* (IBM, Michigan, Illinois).

A lo largo del estudio se produjeron dos bajas, una en el grupo de las ovejas tratadas, que murió al noveno día y otra en el grupo de las ovejas control, que murió al cuarto día de comenzar el estudio. A ambos animales se les practicó la necropsia, a través del departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria. Una de las ovejas presentó lesiones compatibles con una peritonitis, mientras que la otra presentaba lesiones neumónicas consolidadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Análisis de la cantidad de los infusorios ruminales.

Los resultados obtenidos tras el análisis del líquido ruminal, previamente a la administración de florfenicol (T_0), fueron los siguientes: cuatro de los cinco animales control presentaban muy pocos infusorios y la oveja restante tenía pocos. Mientras que, dos de los animales tratados tenían ausencia de infusorios, otros dos tenían muy pocos y el animal

restante presentaba una cantidad adecuada. Estos resultados pueden estar relacionados con la dieta de las ovejas, basada principalmente en concentrado repartido en una sola toma, con aportes de forraje de baja calidad como la paja, ya que la cantidad de infusorios se ve muy influenciada por las características de la dieta.

Tras la segunda extracción de líquido ruminal (T_1), los resultados en los animales control consistieron en una oveja con ausencia de infusorios y cuatro con muy pocos. En los animales tratados, uno tenía ausencia de infusorios, dos presentaban muy pocos y los otros dos tenían pocos.

Tras la realización de la tercera ruminocentesis (T_2), los resultados de los animales control consistieron en que uno de los animales presentaban muy pocos infusorios, dos pocos y la oveja restante tenía un número adecuado. En los animales tratados, cuatro tenían pocos y uno presentaba un número adecuado de infusorios.

Tras la última extracción de líquido ruminal (T_3), los resultados obtenidos de los animales control fueron, que 3 ovejas tenían muy pocos infusorios y una tenía un número adecuado. En los animales tratados con florfenicol, los resultados fueron 3 ovejas con pocos y una con niveles adecuados.

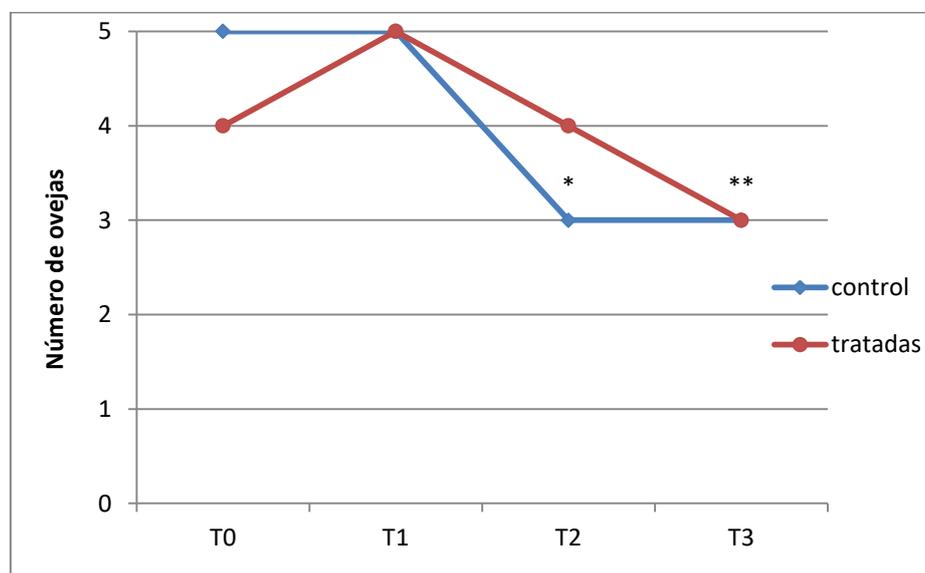


Gráfico 1. Evolución de las ovejas con menor cantidad de infusorios a lo largo del estudio.*Muerte de una oveja del grupo control. **Muerte de una oveja en el grupo tratamiento.

Como conclusión, un animal de cada grupo, tratamiento y control, experimentó una disminución en la cantidad de infusorios a lo largo del estudio.

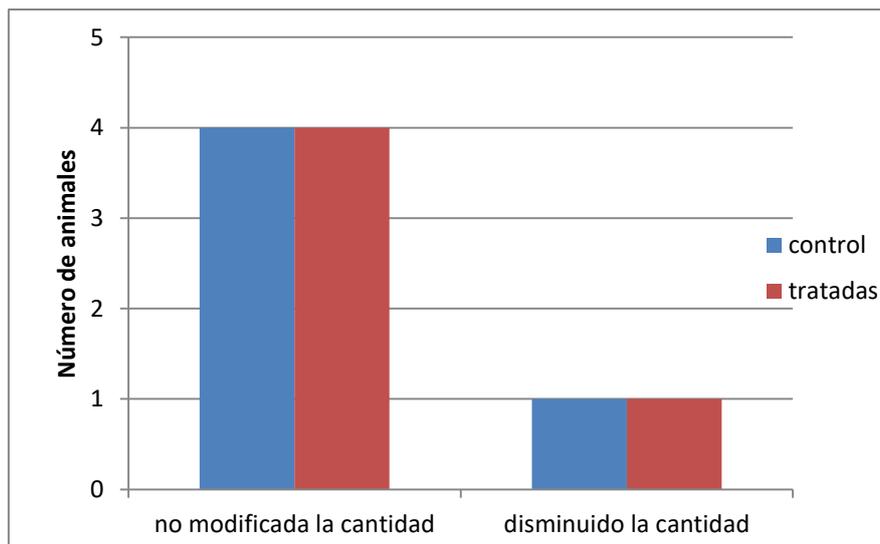


Gráfico 2. Resultado de la modificación de la cantidad de infusorios del líquido ruminal

Ninguno de los resultados obtenidos ofreció diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0,05$).

4.2 Análisis del tamaño de los infusorios del líquido ruminal.

Los resultados del análisis de la T_0 sobre el grupo control mostraron tres animales con infusorios de tamaño pequeño y dos con infusorios de tamaño pequeño y mediano. Sin embargo, en 2 de las ovejas del grupo de tratamiento, se observaban infusorios de tamaño pequeño, una los tenía de tamaño pequeño y mediano y en las otras dos restantes se veían infusorios de los tres tamaños.

Tras la segunda extracción (T_1), los resultados obtenidos mostraban que en tres de las ovejas control los infusorios eran de tamaño pequeño, en una eran pequeños y medianos y en la otra eran pequeños, medianos y grandes. Mientras tanto, en las ovejas tratadas dos poseían infusorios pequeños y las otras tres ovejas tenían infusorios de los tres tamaños.

Tras la tercera extracción (T_2), se observó que 2 de las ovejas control tenían infusorios medianos y grandes, y los otros dos animales poseían infusorios de los tres tamaños. En las ovejas tratadas, dos poseían infusorios pequeños y medianos, otra medianos y grandes y las dos restantes pequeños, medianos y grandes.

Tras la obtención de la última muestra (T_3), todas las ovejas control tenían infusorios de los tres tamaños. En las ovejas tratadas, una tenía medianos y grandes y el resto poseían infusorios pequeños, medianos y grandes.

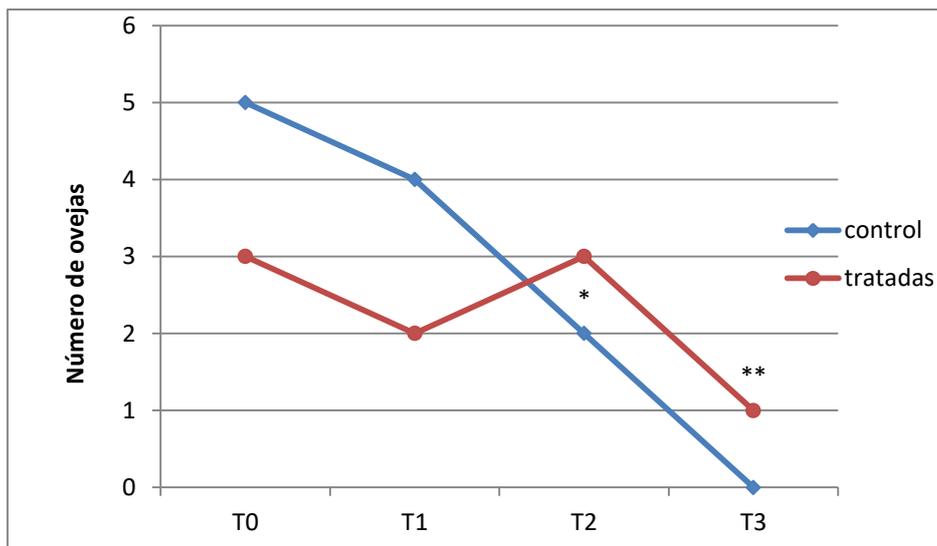


Gráfico 3. Evolución a lo largo de las tomas y el tratamiento de las ovejas que no presentan los tres tamaños de infusorios en las muestras.*Muerte de una oveja del grupo control. **Muerte de una oveja en el grupo tratamiento.

Los resultados obtenidos acerca del tamaño de los infusorios no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

4.3 Análisis del movimiento de los infusorios del líquido ruminal.

En el análisis de la movilidad de los infusorios del líquido ruminal, previamente a la administración del antibiótico (T_0), se observó que el 100% de las ovejas control presentaban una buena movilidad. Por otro lado, una de las ovejas que iban a ser tratadas presentó infusorios con una movilidad nula, mientras que las cuatro ovejas restantes mostraron buena movilidad.

En la segunda toma de muestras (T_1), tras la última administración del fármaco, una de las cinco ovejas control presentaba infusorios con una movilidad nula. Sin embargo, en el grupo ovejas tratadas, una de ellas presentaba una movilidad media de sus infusorios, mientras que en las otras cuatro se observaba una movilidad buena.

Con la tercera extracción de líquido ruminal (T_2), se observó que de las ovejas control, una presentaba movilidad media y 3 animales movilidad buena. En el grupo de tratamiento, sin embargo, los cinco animales presentaron una movilidad buena.

Por último, en la toma T_3 , los ocho animales, tanto control como problema, presentaron una buena movilidad de los infusorios.

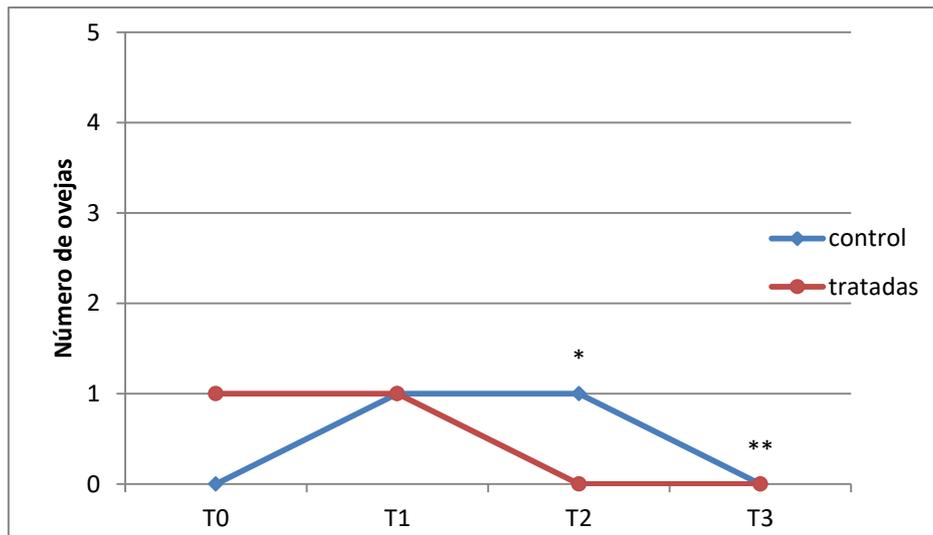


Gráfico 4: Evolución por toma y tratamiento de las ovejas que presentaban menor movilidad en sus infusorios ruminales.*Muerte de una oveja del grupo control. **Muerte de una oveja en el grupo tratamiento.

La movilidad se vio reducida a lo largo del estudio en una de las 5 ovejas del grupo control, mientras que ninguna de las ovejas del grupo de tratamiento presentó una reducción de la movilidad de sus infusorios ruminales.

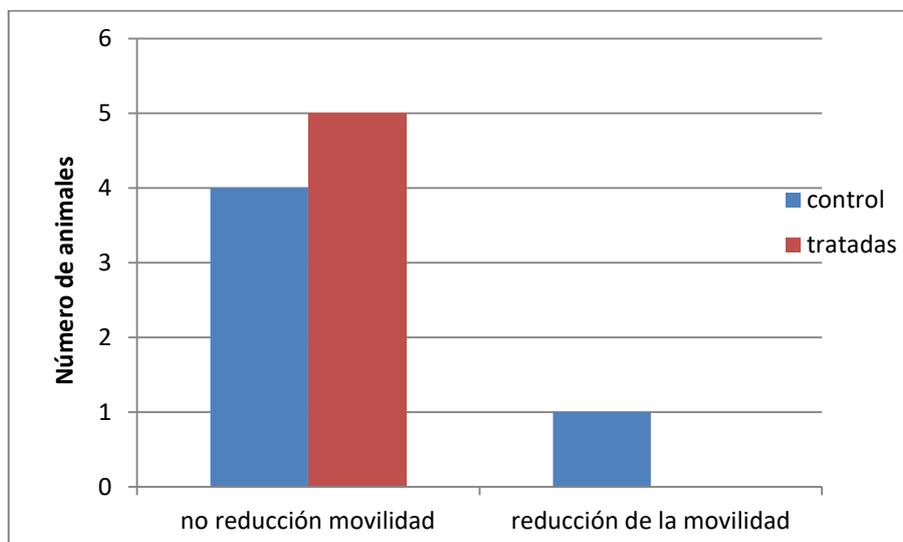


Gráfico 5: Número de animales con variación o no en la movilidad de los infusorios ruminales de acuerdo al tratamiento recibido.

Así pues, el cambio en la movilidad de los infusorios del líquido ruminal no ha ofrecido diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos en ninguna de las muestras examinadas.

4.4 Análisis del pH del líquido ruminal.

Al comienzo del estudio las ovejas control poseían el menor pH, con un valor de 6,08. Este pH fue aumentando a lo largo de los días alcanzando un valor de 6,17. Sin embargo, las

cinco ovejas tratadas con florfenicol comienzan el estudio con un valor medio de pH de 6,16 disminuyendo hasta 6,10 tras la segunda inoculación de florfenicol. Tras la tercera administración del antibiótico (T₂) el pH sube hasta 6,34, alcanzando su máximo valor para disminuir posteriormente hasta 5,99.

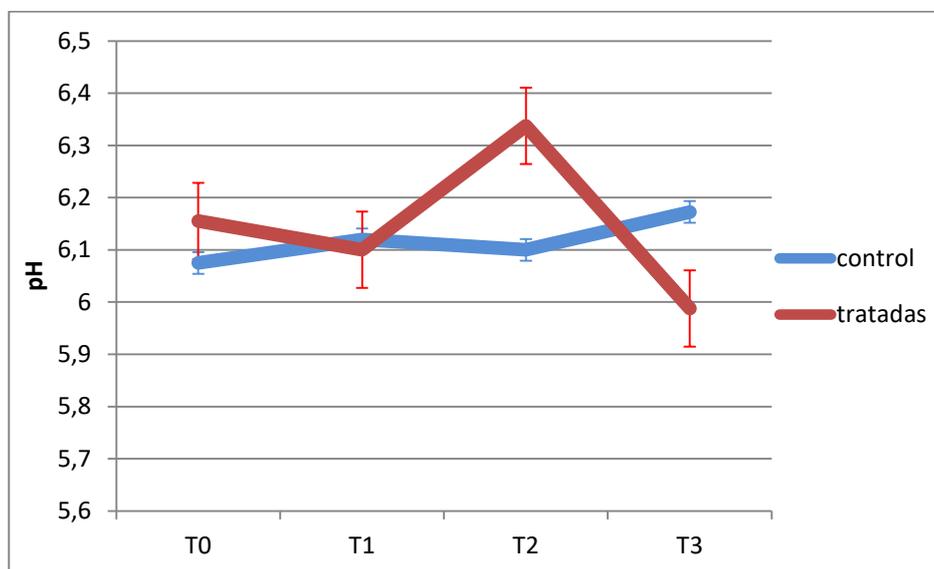


Gráfico 6. Variaciones del pH ruminal a lo largo del estudio.

A pesar de que se observaron diferencias entre los valores de pH de las ovejas del grupo control y las ovejas tratadas a lo largo del estudio, estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

4.5 Análisis de las bacterias Gram del líquido ruminal.

Los resultados obtenidos en las tinciones de Gram realizadas antes de la inoculación de florfenicol (T₀) muestran que el 100% de los animales presentaba un predominio de bacterias Gram negativas al inicio del estudio.

Tras la segunda toma de muestras (T₁) el 100% de las ovejas control tenían un predominio de bacterias Gram negativas. Sin embargo, en una de las ovejas tratadas, se observó un viraje, con un 50% de bacterias Gram negativas y un 50% Gram positivas.

Tras la tercera extracción de líquido ruminal (T₂), 2 de las 4 ovejas control presentaban un predominio de bacterias Gram negativas, mientras que, en las otras 2 se observó que el 50% de las bacterias eran Gram negativas y el otro 50% eran Gram positivas. En tres de las ovejas que habían sido tratadas se vio que presentaban un predominio de bacterias Gram negativas, otra oveja tenía de forma equitativa bacterias Gram positivas y negativas y en el otro animal restante prevalecían las bacterias Gram positivas.

Tras la última toma de muestras (T_3), en 3 de las ovejas control dominaba la presencia de bacterias Gram negativas en las muestras analizadas, mientras que en la oveja restante, las bacterias Gram positivas y negativas se encontraban de forma igualitaria. Por otro lado, 3 de las ovejas tratadas presentaban un predominio de bacterias negativas y en la otra oveja del grupo de tratamiento prevalecían las bacterias Gram positivas.

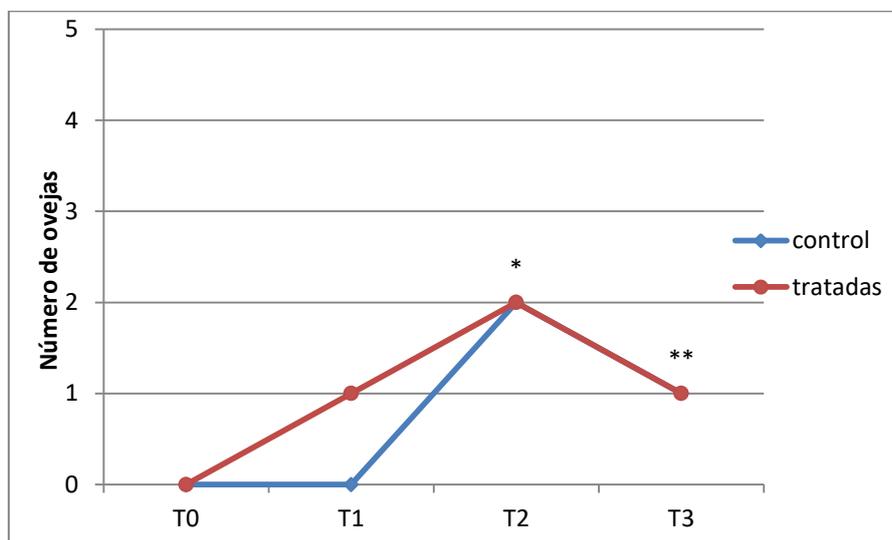


Gráfico 7. Número de ovejas que han presentado viraje en sus poblaciones bacterianas según su tinción de Gram por toma y tratamiento. *Muerte de una oveja del grupo control. **Muerte de una oveja en el grupo tratamiento.

Se puede concluir que, 3 de las ovejas control no han presentado variaciones en las poblaciones bacterianas Gram, mientras que 3 de las 5 ovejas tratadas sí que mostraron cambios a lo largo del estudio. A pesar de que se esperaba encontrar cambios significativos en este parámetro entre las distintas tomas, no ha sido así ($p > 0,05$). A pesar de ello, parece observarse una mayor tendencia al viraje en las poblaciones bacterianas de las ovejas tratadas que en las ovejas control.

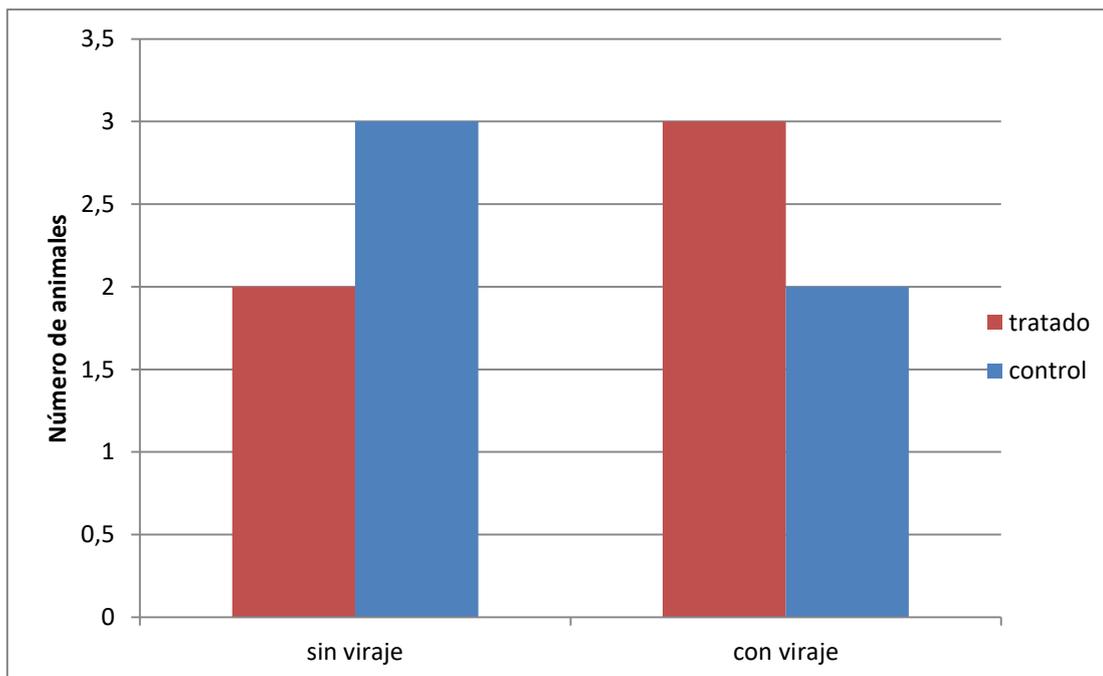


Gráfico 8. Ovejas del grupo control y de tratamiento que han presentado viraje o no en sus poblaciones bacterianas según su tinción de Gram.

5. CONCLUSIONES.

Las conclusiones extraídas de este estudio acerca del efecto del florfenicol sobre la flora ruminal de ovejas gestantes son las siguientes:

- El uso de florfenicol de acuerdo a la pauta recogida en la hoja técnica del producto no ha provocado reacciones adversas destacables en el presente estudio.
- No se observan diferencias significativas entre los parámetros referentes a los infusorios (cantidad, tamaño y movilidad) de animales tratados con florfenicol y animales sin tratar a lo largo del estudio.
- En el estudio realizado no se ha observado que el florfenicol produzca cambios significativos en las mediciones del pH, ni en las poblaciones Gram de las bacterias del líquido ruminal.

CONCLUSIONS.

These are the conclusions extracted from the study about the effect of florfenicol over the ruminal flora of pregnant ewes :

- The use of florfenicol according to manufacturer guidelines of the product has not caused any adverse reaction in the present study.

- Significant differences between infusoria parameters (amount, size and mobility) of control and treated ewes have not been observed.
- Significant changes in pH measurements and in the Gram bacteria population of the ruminal fluid caused by florfenicol treatment have not neither been observed between both groups.

6. VALORACIÓN PERSONAL.

Con la realización de este trabajo he aprendido varias cosas: lo duro y costoso que resulta realizar un estudio basado en datos que deben extraerse con trabajo de campo y lo importante que es ser meticuloso y preciso a la hora de analizar las muestras en el laboratorio, algo en lo que fui mejorando con el tiempo.

He experimentado la sensación de que los resultados obtenidos a lo largo del estudio no sean los esperados, aun así espero que dichos resultados ayuden a otros profesionales o animen a otros compañeros veterinarios a reproducir el estudio con más medios de los que nosotros disponíamos.

Además, quiero agradecer a varias personas su ayuda e involucración conmigo en este trabajo. Primero a mis tutores, Teresa Navarro, Luis Figueras y José M^a González por tener paciencia conmigo, por su gran profesionalidad y por ser unos grandes docentes. A Calasanz Jiménez, por ser un gran becario, además de ayudarme y apoyarme en todo lo necesario a lo largo de mi trabajo de campo, el cual hubiera resultado bastante complicado sin su ayuda.

Por último, quiero agradecer al departamento de Patología Animal por haberme facilitado un laboratorio en el que trabajar y al departamento de Anatomía Patológica por la realización de las necropsias de los dos animales que murieron a lo largo del estudio.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- AEMPS (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios) (2012). Florvex. Resumen de las características del producto. Ficha técnica.
- Ali, B.H.; Al-Qarawi, A.A.; Hashaad, M. (2003). Comparative Plasma Pharmacokinetics and Tolerance of Florfenicol following Intramuscular and intravenous administration to Camels, Sheep and Goats. Veterinary Research Communications. Vol. 27, n°. 6, págs. 475-483.

- Álvarez, A.; Pérez, H.; De la Cruz, T.; Quincosa, J.; Sánchez, A. (2009). Fisiología animal aplicada. Ed. Universidad de Antioquía. Colombia. Págs. 28-35.
- Bauchop, T. (1985). Rumen fungi - their roles and potential for manipulation. Livestock library.com.au. URL: <http://livestocklibrary.com.au/handle/1234/19507>.
- Bregante, M.A; San Andrés, M.I. (2004). Anfencoles/Fenicoles. Farmacología y terapéutica. Panorama Actual del medicamento. Vol. 28, n°. 273, págs. 417-423.
- Bryant, M.P. (1959). Bacterial species of the rumen. Bacteriological Reviews. Vol. 23, págs. 125-159.
- Bryant, M.P; Robinson, I.M.; Lindahl I.L. (1961). A note on the flora and fauna in the rumen of steers fed a feedlot bloat-provoking ration and the effect of penicillin. Applied microbiology. Vol. 9, págs 511-515.
- Cannon, M.; Harford, S.; Davies, J. (1990). A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 26, págs. 307– 317.
- Czerkawski, J.W. (1986). An introduction to rumen studies. Ed. Elsevier.
- Czerkawski, J.W.; Cheng, K.J. (1988). Compartmentation in the rumen. The Rumen Microbial Ecosystem. Ed. Elsevier Science Publishing. NY, USA. Págs. 361-385.
- Fonty, G.; Gouet, P.; Jouany, J.P.; Senaud, J. (1987). Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. Journal of General Microbiology. Vol. 33, págs. 1835-1843.
- Gordon, G.L.; Phillips, M.W. (1998). The role of anaerobic gut fungi in ruminants. Nutrition Research Reviews. Vol. 11, págs. 133-168.
- Hungate, R.E. (1996). The rumen and its microbes. New York: Academic Press. University of California. N°. 24, pág. 533.
- Jerzsele, A. (2012). Comparative Veterinary Pharmacokinetics. Readings in Advanced Pharmacokinetics - Theory, Methods and Applications. Ed. Dr. Ayman Noreddin. <https://www.intechopen.com/books/readings-in-advanced-pharmacokinetics-theory-methods-and-applications/veterinary-pharmacokinetics>

- Jianzhong, S.; Xiubo, L.; Haiyang, J.; Walter, H.H. (2004). Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in healthy sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 27, págs. 163–168.
- Kumar, A.; Nandan, D.; Singh, R. (2015). *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Ed. Springer. India. Págs. 3-17, 79-120.
- Mansson, J.; Phillipson, A.T. (1951). The absorption of acetate, propionate and butyrate from the rumen of sheep. *The journal of physiology*. Vol. 113, N°. 2-3, págs. 129-156.
- Martínez, M.E. (2009). Estudios de simulación del ecosistema ruminal en sistemas in vitro. Aspectos metodológicos. Tesis doctoral. Universidad de León, España.
- McAllister, T.A.; Bae, H.D.; Yanke, L.J.; Cheng, K.; Ha, J. A. (1994). Review of the microbial digestion of feed particles in the rumen. *Agriculture and agri-food Canada, Research centre*. Vol. 7, págs. 303-316.
- McCowan, R.P.; Cheng, K.J.; Bailey, C.B.M.; Costerton, J.W. (1978). Adhesion of bacteria to the epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 35, págs. 149-155.
- Munch-Peterson, E.G. and Armstrong, J. (1958). The influence of orally administered oxytetracycline on the rumen bacteria of sheep. *Australian Journal of Experimental biology and medical science*. Vol. 26, págs. 77-82.
- Nagaraja, T.G.; Taylor, M.B. (1987). Susceptibility and Resistance of Ruminant Bacteria to Antimicrobial Feed Additives. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 53, n°. 7, págs. 1620-1625.
- Nsabimana, E.S; Kisidayova, D.; Macheboeuf, C.J Newbold, J.P. Jouany. (2003). Two-step freezing procedure for cryopreservation of rumen ciliates, an effective tool for creation of a frozen rumen protozoa bank. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69, N°. 7, págs. 3826-3832
- Oultram, J.; Phipps, E.; Teixeira, A.G.V.; Foditsch, C.; Bicalho, M.L.; Machado, V.S.; Bicalho, R.C.; Oikonomou, G. (2015). Effects of antibiotics (oxytetracycline, florfenicol or tulathromycin) on neonatal calves' faecal microbial diversity. *Veterinary Record* 177:598.

- Palma, C.; Ramírez, J.; Benavente, A.; Cazanga, V.; Venegas, M.; Pérez, R. (2011). Pharmacokinetics of florfenicol and florfenicol-amine after intravenous administration in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 35, págs. 508-511.
- Parra, A. (2010). Caracterización nutricional y digestibilidad de forraje orgánico utilizado en la alimentación de bovinos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Agraria, México.
- Pérez, R. (2010). Farmacología veterinaria. Ed. Universidad de la Concepción, Chile. Págs. 334-338.
- Popova, T.; Dimitrov, N. (2001). Florfenicol and thiamphenicol - perspective analogs of Chloramphenicol. *Bulgarian Journal of Agriculture Science*. Vol. 7, págs. 95-100.
- Ramos, J.J.; Ferrer, L.M. (2007). La exploración clínica del ganado ovino y su entorno. Ed. Servet. Zaragoza.
- Rojas, J.M.; D'Esposito, R.E.; Martínez, C.A. (2011). Indigestión ruminal simple por uso de florfenicol oral. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR. Argentina.
- Silva, J.; de Moura, A.; Mauro, E. (2007). Diversidade microbiana no ecossistema ruminal (Microbial diversity in the ecossistema ruminal). *Revista electrónica de Veterinaria* 1695-7504. Vol. 8, Nº. 6. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060703.pdf>.
- Soback, S.; Paape, M.J.; Filep, R.; Varma, K.J. (1995). Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous, intramuscular and intramammary administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 18, Nº. 6, págs. 413-417.
- Van Nevel, C.J.; Demeyes, D.I. (1990). Effect of antibiotics, a deaminase inhibitor and sarsaponin on nitrogen metabolism of rumen contents in vitro. *Animal Feed Science and Technology* Vol. 31, issues. 3-4, págs. 323-348.
- Van Nevel, C.; Demeyer, D.I. (1995). Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen in vitro: inhibition by antimicrobials. *Journal of Dairy Science*. Vol. 78, issue. 12, págs. 2797-2806.

- Van Soest, P.J. (1994). The nutritional ecology of the ruminant. Ed. Cornell University Press. 2ª Ed. Nueva York. Pág. 476.
- Zapata, R.; Polanco, D. (2010). Estructuras de los protozoos ciliados ruminales relevantes para la caracterización morfológica. Ed. Universidad de Antioquía, Colombia.