



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio de las vías de transmisión oveja-cordero de *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7) y evaluación de los diferentes tratamientos terapéuticos frente a este agente en ovejas adultas.

Study of sheep-lamb transmission routes of *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) and evaluation of the different therapeutic treatments against this agent in adult sheep.

Autor

David Forcano Labarga

Directores

Luis Pedro Figueras Ara
Inés Rubira Aznar

Facultad de Veterinaria

2019

ÍNDICE

1. Resumen / Abstract	2
2. Introducción	3
2.1. Contexto actual de la patología respiratoria	3
2.2. Descripción y diagnóstico de la rinitis crónica proliferativa	4
2.3. Descripción de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> serotipo 61:k:1,5,(7) como agente implicado en la rinitis crónica proliferativa	7
2.4. Patogenia de la rinitis crónica proliferativa y dinámica de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> serotipo 61:k:1,5,(7)	9
2.5. Tratamientos frente a la rinitis crónica proliferativa	9
3. Justificación y objetivos	10
4. Metodología	11
Bloque I. Estudio de las vías de eliminación de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> serotipo 61:k:1,5,(7) en ovejas diagnosticadas de rinitis crónica proliferativa y en sus corderos durante el parto y postparto	11
Bloque II. Valoración de la eficacia y posología de distintos fármacos en animales enfermos de rinitis crónica proliferativa	15
5. Resultados y discusión	18
Bloque I. Estudio de las vías de eliminación de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> serotipo 61:k:1,5,(7) en ovejas diagnosticadas de rinitis crónica proliferativa y en sus corderos durante el parto y postparto	18
Bloque II. Valoración de la eficacia y posología de distintos fármacos en animales enfermos de rinitis crónica proliferativa	25
6. Conclusiones / Conclusions	29
7. Valoración personal	31
8. Bibliografía	32

1. RESUMEN

La rinitis crónica proliferativa es una enfermedad de vías respiratorias altas descrita en el ganado ovino que afecta a los cornetes ventrales de las fosas nasales y tiene un curso progresivo que finalmente acaba con la vida del animal. Se describe a *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7), microorganismo frecuentemente aislado en la cavidad nasal de las ovejas, como posible agente causal de este proceso; sin embargo, se desconoce su patogenia o implicación en el desarrollo de la enfermedad. Además, esta bacteria también se ha descrito en el ganado ovino como agente implicado en abortos, orquitis y brotes de diarrea en corderos recién nacidos.

Se conocen algunas vías de eliminación de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7), siendo importante su presencia en fosas nasales y heces, y aislándose esporádicamente en vagina. Sin embargo, se desconoce la importancia de otras vías de eliminación, tales como la vía lactógena, y su implicación en la transmisión de la bacteria. En el presente trabajo se van a estudiar estas vías de excreción del microorganismo en ovejas y en sus corderos durante el parto y postparto, analizando más profundamente la vía lactógena como posible forma de infección de los corderos.

Además, la rinitis crónica proliferativa no cuenta con tratamientos registrados hasta el momento, aunque si se han llevado a cabo tratamientos experimentales en anteriores estudios. En la segunda parte de este trabajo, se va a continuar con el estudio y valoración de estos tratamientos mediante el seguimiento clínico de los animales enfermos tras la administración del tratamiento y con la utilización de técnicas de imagen complementarias en los mismos.

1. ABSTRACT

Chronic proliferative rhinitis is an upper respiratory tract disease described in sheep. It affects the ventral nasal turbinates and it has a progressive course with an irreparable and fatal prognosis for the affected animals. *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) is a frequent microorganism isolated in the nasal cavity of sheep, and it has been associated with this disease. However, its pathogenesis and involvement in the development of the chronic proliferative rhinitis is unknown. Besides, this bacterium has also been described in sheep as an agent involved in abortions, orchitis and diarrhoea in newborn lambs.

Some elimination routes of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) are already known, being important its presence in the nasal cavity and in faeces; and isolated sporadically in the vagina. Nevertheless, the relevance of other different elimination routes is unknown, such as the lactogenic and its involvement in the bacterium transmission. In the present study, the previous excretion routes of this agent will be studied in ewes and their lambs during and after the lambing, analysing the lactogenic route as a possible way of infection for the lambs.

Although currently there are not registered treatments for chronic proliferative rhinitis, experimental treatments were carried out in previous studies. The second part of this work will continue with the study and assessment of these previous treatments. For this purpose, clinical monitoring of sick animals after the administration of the drugs and a complementary evaluation with imaging techniques will be done.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Contexto actual de la patología respiratoria.

La patología respiratoria es una de las principales causas de pérdidas económicas y de mortalidad del ganado ovino. La mayoría de los agentes causales de estas enfermedades están presentes en la flora saprófita del organismo sin causar ningún tipo de patología. Sin embargo, cuando el sistema inmune del animal se ve comprometido, ya sea por enfermedades concurrentes o por cambios en el ambiente, se favorece el desarrollo de patologías por parte de estos microorganismos comensales (Lacasta et al. 2008).

Algunos de los factores predisponentes de la patología respiratoria son el hacinamiento y el aumento de la densidad de los animales, la mala ventilación de las infraestructuras o los cambios climáticos bruscos. Todos estos factores comprometen el sistema inmune de los animales permitiendo que los microorganismos saprófitos del tracto respiratorio proliferen y alcancen nuevas localizaciones en el organismo (González, 2015).

La patología respiratoria más frecuente tanto en ovejas adultas como en corderos es el complejo respiratorio ovino (CRO) (González, 2015). Además, existen otros procesos respiratorios de vías bajas como el Maedi/Visna o las neumonías verminosas, y de vías respiratorias altas como la oestrosis, todos ellos de gran importancia debido a su alta prevalencia colectiva y a su repercusión en los rendimientos productivos de las explotaciones.

Por otro lado, existen procesos de una menor prevalencia tanto de vías respiratorias bajas, como el adenocarcinoma pulmonar ovino (APO); como de vías respiratorias altas, como el adenocarcinoma nasal enzoótico (ANE) o la rinitis crónica proliferativa (RCP) (Rubira et al., 2017a), objetivo de estudio de este trabajo, que aunque en menor grado dada su prevalencia, también van a repercutir en la rentabilidad de las explotaciones por la tasa de letalidad que poseen.

2.2. Descripción y diagnóstico de la rinitis crónica proliferativa.

La rinitis crónica proliferativa es una enfermedad de vías respiratorias altas de tipo inflamatorio y proliferativo que afecta a los cornetes ventrales de la cavidad nasal del ganado ovino (Brodgen et al., 1994; Lacasta et al., 2012; Meehan et al., 1992). En su desarrollo está implicada *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7), microorganismo saprófito de las fosas nasales y presente en gran parte de la población ovina (Bonke et al., 2012; Brodgen et al., 1994; Figueras, 2017; Lacasta et al., 2012; Meenhan et al., 1992). Sin embargo, se desconoce su implicación en el desarrollo de la enfermedad. A partir de ahora, con motivo de simplificar la lectura de este trabajo, la rinitis crónica proliferativa se abreviará como RCP, y su agente implicado, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7), se abreviará como SED.

La clínica de la enfermedad es leve en las fases iniciales y se acentúa conforme el proceso inflamatorio progresa, apreciándose disnea inspiratoria acompañada de ronquidos muy característicos. Los animales afectados presentan secreción nasal seromucosa (Figura 1-A) uni o bilateral dependiendo de la localización del proceso inflamatorio (Lacasta et al., 2012). Estos signos clínicos se ven agravados por la casi completa obstrucción de las fosas nasales, causada por la presencia de tejido proliferativo en su interior, que en los casos muy avanzados de la enfermedad se hace visible a través de los ollares (Figura 1-B). Igualmente, en los casos avanzados, puede llegar a deformarse la zona más rostral de la cavidad nasal (Figura 1-C) debido al aumento de tamaño del cornete ventral afectado (Ferrer et al. 2002; Figueras, 2017; Lacasta et al. 2012).

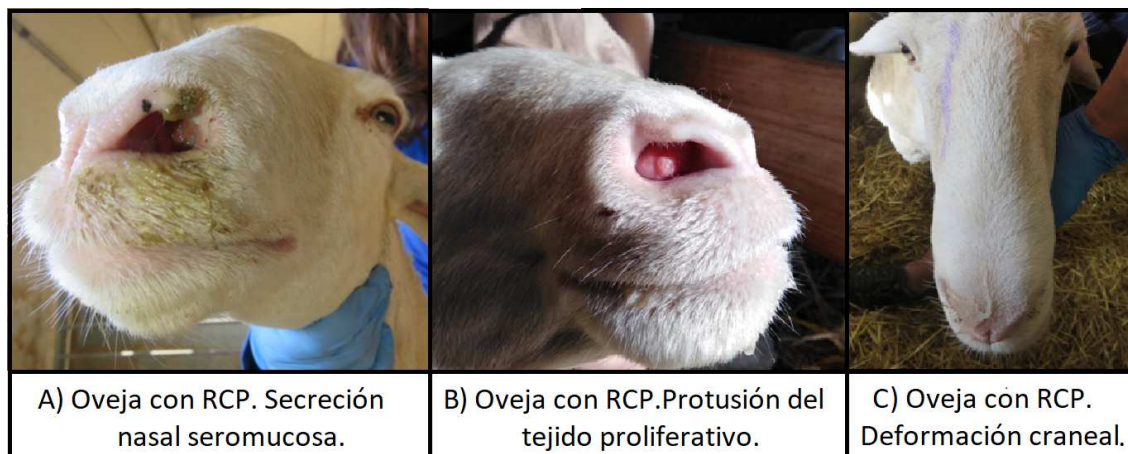


Figura 1. **Imagen A:** Secreción nasal seromucosa en los ollares de una oveja afectada de RCP. **Imagen B:** Tejido proliferativo protuyendo por los ollares de una oveja enferma de RCP. **Imagen C:** Deformación craneal en la zona rostral de la cara de una oveja con RCP.

La RCP presenta un curso lento y progresivo pudiendo llegar a obstruir totalmente la cavidad nasal, produciéndose finalmente la muerte del animal, en la mayoría de los casos por complicaciones con otras patologías, normalmente respiratorias (Brodgen et al, 1998). Además, la evolución clínica de la enfermedad va acompañada de una importante pérdida de condición corporal del animal debido a la alta demanda energética para sobrellevar esta enfermedad y otras patologías secundarias (Lacasta et al. 2012).

En la exploración clínica del animal existen métodos de diagnóstico por imagen que pueden facilitar el diagnóstico de la enfermedad como la termografía, la radiografía, la tomografía computarizada o la ecografía, aunque este último método resulta menos fiable (Rubira, 2017b). Asimismo, el diagnóstico laboratorio permite poner de manifiesto la presencia de SED en las fosas nasales, bien por cultivo microbiológico o bien por PCR.

La confirmación definitiva de la RCP se realiza con el examen anatomopatológico de las lesiones. Un corte longitudinal del cráneo permite visualizar inflamaciones permanentes del cornete ventral (Figura 2-A) y engrosamientos focales de la mucosa nasal fácilmente reconocibles que acaban derivando en proliferaciones de tejido de una morfología polipoide característica (Figura 2-B) (Ferrer et al. 2002; Lacasta et al. 2012). Este proceso inflamatorio puede darse de manera unilateral, cuando hay un solo cornete ventral afectado, o bilateral, cuando los cornetes ventrales de ambas fosas nasales están afectados. En ocasiones, cuando se trata de un proceso unilateral avanzado, la compresión ejercida por el cornete afectado puede llegar a desviar el septo nasal (Lacasta et al. 2012).

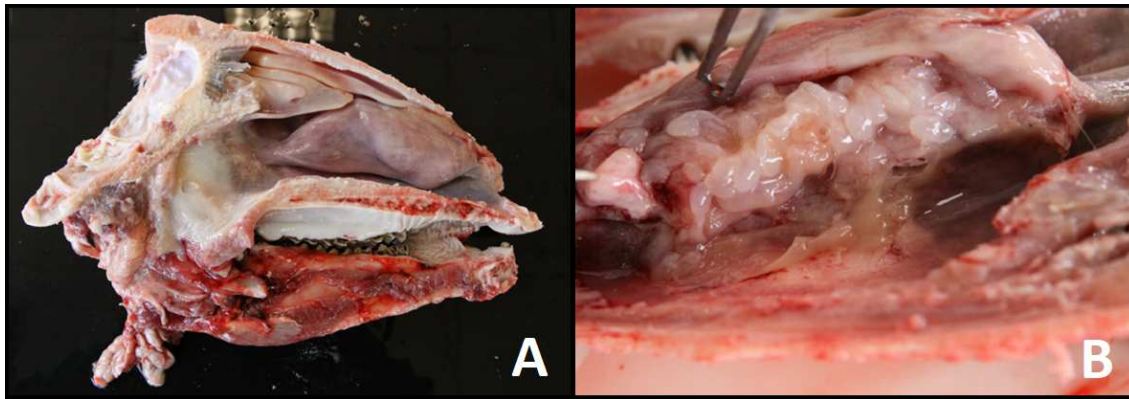


Figura 2. **Imagen A:** Inflamación crónica y proliferativa del cornete nasal ventral en una oveja con RCP. **Imagen B:** Inflamación crónica y proliferativa con formación de pólipos en el cornete nasal recubiertos de moco.

Microscópicamente se observa la mucosa nasal engrosada con múltiples formaciones de pólipos recubiertos por un epitelio respiratorio hiperplásico con varias capas de células epiteliales desorganizadas en cuyo citoplasma hay vacuolas con un contenido eosinofílico (Figura 3-A). La tinción de Gram revela la presencia de numerosos bacilos Gram negativos en el interior de las células epiteliales que se corresponde con el material eosinofílico de la tinción de HE (Figura 3-B) (Lacasta et al., 2012).

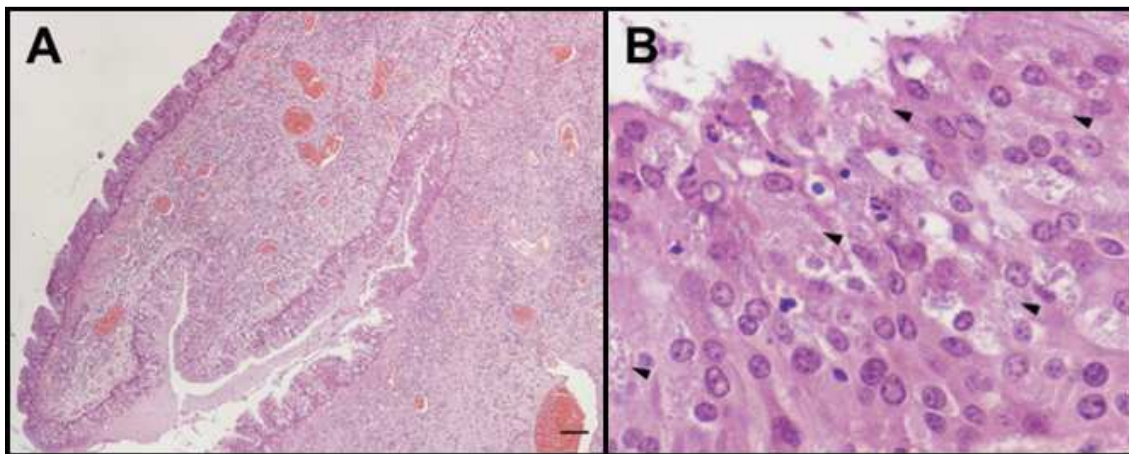


Figura 3. Imágenes histológicas del tejido nasal afectado. **Imagen A:** Mucosa nasal engrosada con formación de pólipos. **Imagen B:** Bacilos Gram negativos en el interior de las células epiteliales (flechas). (Lacasta et al., 2012).

Finalmente, con la prueba de la inmunohistoquímica se confirma la presencia de *Salmonella* en el interior de las células epiteliales y algunos macrófagos, en la zona de proliferación (Figura 4) (Lacasta et al., 2012).

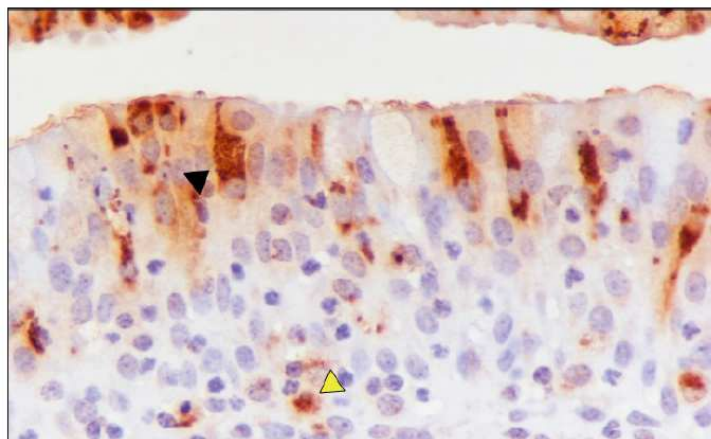


Figura 4. Formaciones de 1 μ m de diámetro mediante testaje con anticuerpos del género *Salmonella* en el interior de las células epiteliales (**Flecha negra**) y macrófagos (**Flecha amarilla**) (Lacasta et al., 2012).

A pesar de que no existan datos globales respecto a la prevalencia y distribución de la RCP, en los últimos años se está diagnosticando esta enfermedad en distintos países (Lacasta et al., 2011; Regenscheit et al., 2015; Wolf y Schefers, 2017).

En conclusión, la RCP es una enfermedad de baja prevalencia que aparece de forma individual en las explotaciones ovinas. Sin embargo, las recientes descripciones de casos de esta patología en varios países y el desconocimiento de su patogenia, la está haciendo importante para varios grupos de investigación en la actualidad.

2.3. Descripción de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7) como agente implicado en la rinitis crónica proliferativa.

El género *Salmonella* se ha relacionado tradicionalmente en el ganado ovino con patologías del aparato digestivo y reproductor por lo que, en los estudios de prevalencia realizados, las heces y el aparato reproductor son las localizaciones más evaluadas. No obstante, desde hace más de dos décadas, se ha comprobado que SED es un microorganismo habitual del tracto respiratorio del ganado ovino (Brodgen et al., 1994; Meenhan et al., 1992).

En la bibliografía se cita a SED como agente adaptado al ganado ovino (Greenfield et al., 1973; Soren et al., 2015) y que habita en el tracto respiratorio superior de las ovejas, aislándose en las fosas nasales de animales sanos y comportándose normalmente como portador asintomático (Brogden et al. 1994; Figueras, 2017; Meenhan et al., 1992; Pritchard, 1990; Soren et al., 2015; Zweifel et al., 2004). Además, esta bacteria también se aísla en las

fosas nasales de todos los animales con clínica de RCP (Bonke et al., 2012; Brodgen et al., 1994; Lacasta et al., 2012; Meehan et al., 1992; Regenscheit et al., 2017; Wolf y Schefers, 2017). Todo esto implica que cuando el animal presenta aislamiento de SED positivo en las fosas nasales, hay que evaluar al mismo tiempo la presencia de signos clínicos característicos para poder diagnosticar la RCP.

La primera descripción de RCP asociada a SED fue en Estados Unidos en 1992 (Meenhan et al., 1992). Posteriormente, SED se aisló en animales con clínica de RCP en varios rebaños de ovejas de raza Rasa Aragonesa en Aragón (Lacasta et al., 2011), en ovejas de raza Texel en Suiza (Regenscheit et al., 2015) y en Estados Unidos (Wolf y Schefers, 2017).

Como se ha comentado, se identificó SED mediante una técnica de inmunohistoquímica en el interior de células epiteliales y macrófagos de las fosas nasales. Los mecanismos mediante los cuales SED se introduce en estas células son desconocidos, aunque se sospecha de situaciones de inmunodepresión (Lacasta et al., 2012). Apesar de los trabajos citados anteriormente, se tiene poca información sobre la etiopatogenia, el mecanismo de transmisión o la implicación de este microorganismo en el desarrollo de la enfermedad (Figueras, 2017).

La patología respiratoria producida por SED ha sido muy estudiada; sin embargo, también se ha relacionado este microorganismo con procesos gastroentéricos en animales jóvenes (Alvseike y Skjerve, 2002; Chatzopoulos et al., 2016; Davies et al., 2001; Harp et al., 1981; Long et al., 1978), abortos y nacimiento de corderos mortinatos o prematuros (Davies et al., 2001; Greenfield et al., 1973; Long et al., 1978), y con dos casos de orquitis y epididimitis en carneros (Celeghini et al., 2013; Ferreras et al., 2007).

Por último, en estudios recientes sobre la prevalencia de SED en Aragón se ha descrito que este microorganismo es una bacteria endémica en los rebaños de ganado ovino, siendo el 90% de los rebaños muestreados positivos a SED. Asimismo, la presencia del agente en los rebaños estudiados es muy variable, siendo portadores entre el 0,00% y el 80,00% de los animales analizados (Figueras, 2017).

2.4. Patogenia de la rinitis crónica proliferativa y dinámica de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7).

Algunas vías de eliminación de SED, como la digestiva o la respiratoria, ya han sido parcialmente estudiadas (Brodgen et al., 1994; Figueras, 2017; Hannam et al., 1986, Lacasta et al., 2017), sin embargo, se desconoce la importancia de otras como la transmisión vertical, así como la patogenia del microorganismo. En el trabajo de Figueras en 2017, ovejas gestantes positivas a SED pero asintomáticas de RCP mostraron una excreción discontinua de la bacteria en heces desde un mes antes del parto hasta dos meses después del mismo, y sus corderos presentaron aislamientos positivos en fosas nasales y heces ya en su primera semana de vida. Además, los animales gestantes presentan una mayor prevalencia o excreción de SED que los no gestantes (Bonke et al., 2012), lo que podría favorecer su transmisión a los corderos.

Demostrado el comportamiento intracelular de SED y su localización en el interior de macrófagos (Brodgen et al., 1994; Lacasta et al., 2012; Meehan et al., 1992), y basándose en la patogenia de otras bacterias como *Brucella abortus*, la cual tiene la capacidad de sobrevivir y replicarse en el interior de los macrófagos (Baldwin and Winter, 1994; Roop et al., 2009), eliminándose además, a través del calostro (Philippon et al., 1971), permite plantear la hipótesis de que SED pueda estar presente en el interior de los macrófagos calostrales, infectándose los corderos recién nacidos al tomar el calostro y convirtiéndose en portadores asintomáticos (Figueras, 2017).

2.5. Tratamientos frente a la rinitis crónica proliferativa.

Actualmente la RCP no cuenta con tratamientos registrados, si bien es cierto que se han realizado estudios recientes buscando un posible tratamiento para esta patología con el objetivo de plantear y orientar a futuras investigaciones sobre este tema. Entre los años 2014 y 2017 se administraron siete tratamientos diferentes a un total de cinco animales con RCP confirmada (Rubira, 2017b). Estos tratamientos se basaban en los resultados de los antibiogramas; indicación de los medicamentos para procesos respiratorios, ya que la RCP se engloba dentro de este grupo; duración de la actividad de la sustancia activa en el organismo; propiedades antiinflamatorias; proximidad a las lesiones del punto de inoculación; y capacidad de penetración intracelular. Las sustancias activas y vías de administración utilizadas fueron: espiramicina vía intramuscular, espiramicina inyectada en el cornete ventral (intracornete), oxitetraciclina vía intracornete, florfenicol combinado con flunixin meglumine administrado

intracornete, florfenicol combinado con flunixin meglumine vía intramuscular y dos tratamientos con marbofloxacin intramuscular con modificaciones en la duración de los mismos. De todos estos tratamientos, los que mejores resultados obtuvieron fueron el florfenicol combinado con flunixin meglumine administrado vía intracornete y la marbofloxacin aplicada vía intramuscular.

El florfenicol es una molécula de amplio espectro antimicrobiano, tanto frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, como es el caso de *Salmonella* spp. (Zhang et al., 2011), pero posee poco tiempo de permanencia en sangre, lo que impide que se alcancen concentraciones bactericidas adecuadas si no se repite la dosis (Ali et al., 2003).

El otro antibiótico que resultó más efectivo en el estudio de Rubira en 2017b fue la marbofloxacin, antibiótico perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas. Fue administrado por vía sistémica basándose en estudios de medicina humana en los que se elegía como opción de tratamiento frente a *Salmonella tiphy*, causante de la fiebre tifoidea (Jurado et al., 2010) y frente a *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 47:kz35 en un caso de sinusitis asociado a reptiles (Horvath et al., 2016). Además, las fluoroquinolonas poseen gran actividad frente a las bacterias Gram-negativas y tienen la capacidad de hacer frente a patógenos intracelulares al ser capaces de penetrar en el interior de células y macrófagos (Hooper, 1998).

Con estos dos tratamientos las ovejas mostraron una importante mejora de su estado de salud, aunque se seguía aislando SED en las fosas nasales y la mejoría clínica era solo transitoria. A pesar de ello, con el estudio de Rubira en 2017b se establecieron algunos principios para encontrar un tratamiento para la RCP.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La RCP es una enfermedad que está siendo estudiada con gran interés en los últimos años, sin embargo, todavía se desconocen muchos factores sobre su etiopatogenia. Además, esta enfermedad, probablemente esté siendo infradiagnosticada debido a su escaso conocimiento y a la eliminación precoz de las ovejas enfermas de los rebaños por el progresivo empeoramiento de su estado de salud, el cual se debe a otras patologías secundarias que enmascaran a la RCP como causa primaria.

El desconocimiento de la patogenia y del comportamiento de SED en el organismo, como pueden ser las vías de eliminación del mismo, hace que sea necesaria la realización de

más estudios como el que se ha llevado a cabo para este trabajo de fin de grado, cuyos objetivos son:

- I. Estudio de las vías digestiva, respiratoria, lactógena y trasplacentaria en ovejas con RCP, como posibles fuentes de eliminación de SED durante el parto y postparto.
- II. Valoración de las distintas vías de eliminación de SED en ovejas con RCP como posible forma de infección para sus corderos.
- III. Estudio de la eliminación de SED en heces y fosas en los corderos hijos de ovejas con RCP.

Por otro lado, en este trabajo se pretende continuar con el estudio de los fármacos utilizados hasta el momento para complementar el tamaño muestral del estudio anterior y así aumentar la representatividad de los resultados de estos tratamientos. Por ello, se plantea un cuarto objetivo:

- IV. Continuar con la valoración y búsqueda de tratamientos efectivos frente a la RCP.

Una vez expuestos los objetivos de este trabajo, los estudios realizados se van dividir en dos bloques que, a partir de este momento y para simplificar la estructura del texto se escribirán al inicio de cada apartado. Los dos bloques son:

- Bloque I. Estudio de las vías de eliminación de SED en ovejas diagnosticadas de RCP y en sus corderos durante el parto y postparto.
- Bloque II. Valoración de la eficacia y posología de distintos fármacos en animales enfermos de RCP.

4. METODOLOGÍA

Bloque I. Estudio de las vías de eliminación de SED en ovejas diagnosticadas de RCP y en sus corderos durante el parto y postparto.

Los animales utilizados en este estudio han sido diagnosticados de RCP por su sintomatología clínica, confirmándose la presencia de SED en fosas nasales y heces mediante microbiología. Estos animales fueron remitidos por los directores de este TFG al Servicio Clínico de Rumiantes (SCRUM) de la Universidad de Zaragoza con el fin de confirmar y estudiar su patología. Para respaldar el diagnóstico, y estudiar más a fondo esta enfermedad en los animales, se llevaron a cabo técnicas de imagen complementarias: la termografía y la

tomografía computarizada. Tras su realización, se logró confirmar tres casos de RCP en un periodo de dos años.

- a) Termografía (Cámara de infrarrojos FLIR® E6): Permite obtener una escala gradual de colores dependiendo de la temperatura de las diferentes zonas examinadas, progresando desde el blanco y rojo como colores más cálidos, hasta el verde y azul como colores más fríos, pasando a su vez por tonos anaranjados y amarillos para indicar zonas de temperatura intermedia. Esto permite localizar focos de calor y determinar si se deben a causas fisiológicas o patológicas (Figura 5). En cada animal se tomaron cuatro proyecciones: dorso-ventral, frontal, lateral derecha y lateral izquierda, a unos 30 cm de distancia del objetivo. Para su realización, el animal debe ser inmovilizado por simple sujeción, si bien no debe tocarse la cabeza para no interferir en los registros de temperatura.

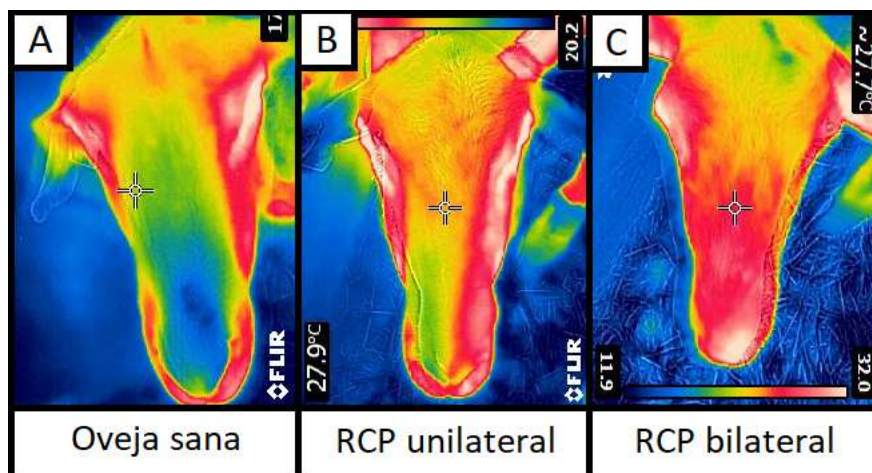


Figura 5. **Imagen A:** Termografía tomada a una oveja sana. Presenta correcta ventilación, por lo que la temperatura de las fosas nasales permanece fría quedando registrado con color azul. **Imagen B:** Termografía tomada a una oveja con RCP unilateral. La inflamación de un solo cornete impide el paso del aire tan solo por la fosa nasal afectada. **Imagen C:** Termografía tomada a una oveja con RCP bilateral. La inflamación crónica impide el correcto paso del aire y por ello aumenta la temperatura de las fosas nasales quedando registrado como zonas de color rojo.

- b) Tomografía computarizada (TC): Se realiza con previa sedación del animal con xilacina hidrocloreuro (Xilagesic 2%®) a la dosis recomendada por la ficha técnica de 0,20 mg/kg, intubación y monitorización. Esta prueba se llevó a cabo en el Centro Clínico Veterinario de Zaragoza, entidad que cedió las imágenes y vídeos para su interpretación, uso docente en la Universidad de Zaragoza y utilización en el presente trabajo (Figura 6).

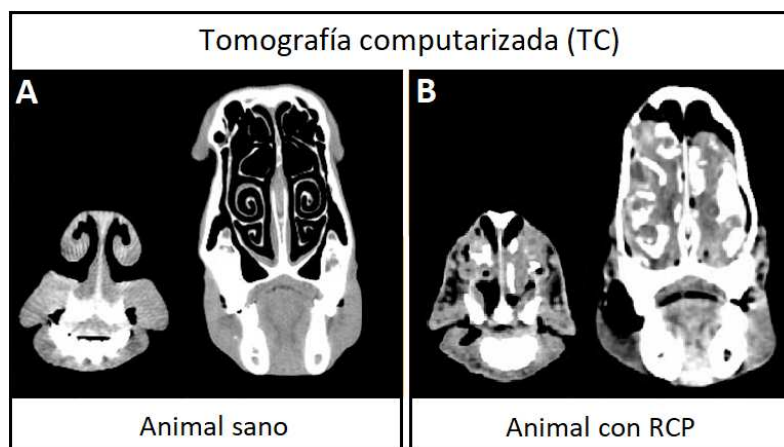


Figura 6. **Imagen A.** Fosas nasales de una oveja sana. **Imagen B.** Fosas nasales de la oveja 172, afectada de RCP bilateral y utilizada para este trabajo. Se observa como el tejido proliferativo obstruye la luz de la cavidad nasal. Imágenes obtenidas por TC en el Centro Clínico veterinario de Zaragoza y cedidas por el Dr. Luis Miguel Ferrer Mayo.

Para la realización de este trabajo han sido necesarios animales enfermos de RCP, situación complicada de partida ya que es una enfermedad poco frecuente. A su vez, estos animales han tenido que estar o quedar gestantes durante los dos años que ha durado el trabajo. Además, su gestación debía desarrollarse con éxito para poder llevar a cabo los estudios planteados. Por último, los corderos debían de ser viables y no sufrir ninguna patología durante la crianza que comprometiera su vida y desarrollo. De igual manera, las madres, dada la conocida predisposición de los animales enfermos de RCP de sufrir otras patologías secundarias, debían permanecer vivas durante el tiempo que duró el estudio.

De este modo, partiendo de los tres animales diagnosticados de RCP, y teniendo en cuenta los factores citados anteriormente, se planteó una programación de dos partos por oveja durante un periodo de dos años. Para lograr que las tres ovejas diagnosticadas de RCP quedaran gestantes y así poder cumplir los objetivos planteados, se administraron tratamientos hormonales mediante la colocación a cada oveja de una esponja intravaginal de acetato de flugestona 20 mg (CHRONOGEST®) durante 14 días, en combinación con PMSG (FOLIGON®), inyectando 480 UI por animal el día de la retirada de la esponja. A las 36 horas tras la administración, se introdujeron varios machos durante 30 días para lograr la fecundación por monta natural. Finalmente, tras la retirada de los machos, se realizaron ecografías para confirmar o descartar la gestación.

Para la correcta y completa toma de muestras, se elaboró un protocolo desde el momento del parto hasta los 30 días posteriores, en el que se recogieron muestras de diferentes localizaciones tanto de las ovejas como de los corderos, con una frecuencia regular para todos

ellos, con el objetivo de valorar las vías de eliminación digestiva, respiratoria, placentaria y lactógena. Todas las muestras fueron identificadas según el número del animal de origen, la localización y el número de toma de muestras correspondiente.

El protocolo seguido para la recogida de muestras se describe a continuación y se resume en la Tabla 1:

- Día 0, 0 horas post-parto: Las muestras tomadas de la madre fueron: hisopo de fosas nasales, hisopo de vagina, placenta en una bolsa estéril, guante con heces y tubo estéril de 15 ml. de calostro, tomado de manera aséptica limpiando con gasas húmedas el pezón y desinfectándolo con yodo. Las muestras tomadas de los corderos fueron: hisopo de fosas nasales e hisopo rectal.
- Día 0, 12 horas post-parto: Las muestras tomadas de la madre fueron: hisopo de fosas nasales, hisopo vaginal, guante con heces y tubo estéril de 15 ml.; y de los corderos: hisopo de fosas nasales e hisopo rectal.
- Día 3: Las muestras tomadas de la madre fueron: hisopo de fosas nasales, hisopo vaginal, guante con heces y tubo estéril de 15 ml. de calostro; y de los corderos: hisopo de fosas nasales e hisopo rectal y si era posible, guante con heces.
- Se continuó con la toma de muestras en las mismas localizaciones cada tres días hasta el día 9, momento en el que la recogida de las mismas pasó a hacerse semanal hasta un mes después del parto, instante en el que finalizó la toma de muestras.

Día post-parto		Día 0, 0 h	Día 0, 12 h	Día 3	Día 6	Día 9	Día 15	Día 22	Día 30
Muestras	Madre	Placenta							
		Vagina	Vagina	Vagina	Vagina	Vagina	Vagina	Vagina	Vagina
		Calostro	Calostro	Leche	Leche	Leche	Leche	Leche	Leche
		FN	FN	FN	FN	FN	FN	FN	FN
		Heces	Heces	Heces	Heces	Heces	Heces	Heces	Heces
	Corderos								
		FN	FN	FN	FN	FN	FN	FN	FN
		Heces	Heces	Heces	Heces	Heces	Heces	Heces	Heces

Tabla 1. Protocolo de toma de muestras. Se especifican los días y las muestras tomadas en los mismos.

Igualmente, para los cuidados del recién nacido se elaboró un protocolo que consistía en la desinfección del ombligo, valoración de la cantidad y calidad de calostro, presencia de reflejo de succión en los corderos y, finalmente, pesaje e identificación de los mismos.

En el primer parto todas las muestras fueron remitidas dentro de las 24 horas siguientes a su obtención al Laboratorio Agroambiental de Zaragoza (LA-DGA) para realizar los

correspondientes cultivos microbiológicos. Posteriormente, Laboratorios Exopol desarrolló una PCR específica para SED, por lo que en los dos siguientes partos se tomaron las muestras por duplicado, tanto para el Laboratorio Agroambiental de Zaragoza para hacer cultivos microbiológicos, como para Laboratorios Exopol para realizar cultivos microbiológicos y PCR. Para la prueba de PCR se consideraron positivas aquellas muestras cuyo valor de Cq fue ≤ 38 .

Los medios de cultivo y las condiciones en las que se incubaron las muestras fueron diferentes en cada laboratorio. Por un lado, en Exopol las muestras se sembraron tanto en medios de cultivos generales: agar Sangre (OXOID PB5039A) y agar MacConkey 3 (OXOID PO5002A); como en medios específicos para *Salmonella* spp.: Placas de agar XLD (OXOID PO5057A) y medio líquido Rappaport Vassiliadis (OXOID CM 0866). La incubación de las placas de agar se realizó a 37°C durante 18-24 horas en aerobiosis y el caldo Rappaport Vassiliadis se incubó a 42°C durante 18-24 horas en aerobiosis y posteriormente se resembró en agar Xilosa Lisina Desoxicólico (XLD).

Por otro lado, en el Laboratorio Agroambiental de Zaragoza las muestras fueron cultivadas en Agua de Peptona Tamponada (APT) y en agar de *Salmonella Shigella* (SS) y fueron incubadas a 37°C durante 24-48 horas en aerobiosis. Cuando no se observaban presuntas colonias de *Salmonella* tras 24 horas de incubación se transfería 1 ml. de APT a caldo Muller Kauffmann Tetrathionate-noboviocin (MKTTn), se incubaba a 37°C durante 24 horas en aerobiosis y a continuación se resembraba en agar XLD y SS.

Bloque II. Valoración de la eficacia y posología de distintos fármacos en animales enfermos de RCP.

Durante los dos años que ha durado el presente trabajo se han realizado y valorado tres tratamientos, todos ellos realizados sobre la misma oveja, ya que se decidió tratar únicamente a aquellos animales en los que la patología se agravaba y ponía en riesgo su vida. Este animal, fue la oveja con número de crotal 600, que también ha participado en el estudio sobre la transmisión de SED en el parto y post-parto.

Tomando como referencia el anterior estudio, se aplicaron tres tratamientos con los dos antibióticos que mejores resultados obtuvieron en el mismo: la marbofloxacin y el florfenicol, realizando previamente antibiogramas obtenidos a partir de las muestras de fosas nasales de la oveja 600 y, de este modo, comprobar el efecto bactericida de estos antibióticos frente a esta cepa concreta de SED (Figura 7).

BOLETÍN DE ANALISIS			
Muestra según declara el	H NASAL	Especie: OVINA	Nº de muestras: 2
Contenida en : Tubo de plástico Identificación: 1-09, 2-600			
Datos de la explotación de procedencia de la muestra:			
PATOLOGÍA MÉDICA ZARAGOZA (ZARAGOZA) ES502970000662			
Fecha de inicio del análisis:	08 de abril de 2019	Fecha final del análisis:	15 de abril de 2019
DETERMINACIONES REALIZADAS			
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS:			
Las siembras en medios ord y esp han producido crecimiento de <i>S. enterica</i> subespecie <i>diarizonae</i> en las dos muestras.			
ANTIBIOGRAMA:			
Salmonella spp.: Lincosp.: S. Eritro.: R. Amoxi.: S. Oxitet.: S. Florfe.: S. Sulfami-Trime.: S. Colistina: S. Tilosina: R. Neomicina: F. Marbofloxa: S.			

Figura 7. Antibiógrama realizado a partir de una muestra de fosas nasales de la oveja 600.

A continuación se exponen las pautas aplicadas en cada uno de los tratamientos:

Primer tratamiento: El 24 de marzo de 2018, se administró marbofloxacin (Odimar 100mg/ml Solución inyectable®) a dosis de 1ml/50kg de P.V. cada 24 horas, durante 15 días por vía intramuscular.

Segundo tratamiento: Dado el empeoramiento clínico de la oveja 600, el día 24 de octubre de 2018, se decidió aplicar un segundo tratamiento. En esta ocasión, se administró florfenicol combinado con flunixin meglumine en un mismo producto (RESFLOR®). Además, y siguiendo las pautas establecidas por el anterior trabajo, se modificó la vía de administración del fármaco inyectándolo de manera local, directamente en el cornete ventral a través de la incisura naso-incisiva tras haber rasurado, limpiado y desinfectado previamente la zona con yodo, tal y como se muestra en la Figura 8. El tratamiento se dispuso en dos fases separadas por tres días de descanso. En cada una de ellas se realizó una aplicación de 1 ml/cornete cada 24 horas durante 3 días. Este animal presentaba la RCP de forma bilateral, por lo que se administró el fármaco en ambos cornetes ventrales.

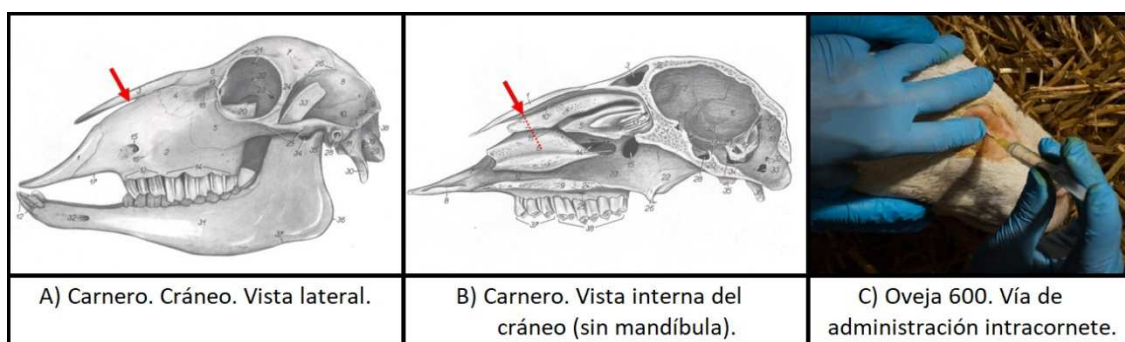


Figura 8. Imágenes (A y B) del cráneo de un carnero (Popesko, 1998). **Imagen A. Flecha roja:** incisura naso-incisiva. **Imagen B. Línea de puntos:** Dirección de la inyección en la aplicación de los tratamientos. **Imagen C:** Administración intracornete de RESFLOR® en la oveja 600.

Tercer tratamiento: Debido a que el estado de salud del animal volvió a agravarse, se aplicó un tercer tratamiento el día 5 de junio de 2019. El tratamiento fue similar al primero respecto al antibiótico y pauta empleada, sin embargo se añadió flunixin meglumine por sus efectos antiinflamatorios. De este modo, se administró marbofloxacin (Odimar 100mg/ml Solución inyectable®) a dosis de 1ml/50kg de P.V. cada 24 horas, durante 15 días por vía intramuscular; y flunixin meglumine (NIXYVET 50 mg/ml solución inyectable®) en dos fases de 5 días separadas por 5 días de descanso. En cada fase se administró, siguiendo la posología de la ficha técnica para bovino, una dosis de 2ml/45 kg de P.V. por vía intravenosa durante 5 días.

Antes de empezar a administrar cada fármaco se tomaron muestras de las fosas nasales con hisopos para realizar cultivos microbiológicos y tener datos de referencia al inicio del ensayo. Esta toma de muestras se repitió tras finalizar cada tratamiento para analizar la presencia de SED antes y después del mismo y, de esta manera, poder valorar la eficacia de cada uno de los tratamientos.

Para realizar la valoración de la eficacia de los tratamientos y la recogida de muestras y datos se planteó un protocolo para los tres tratamientos que se resume en la tabla 2. En este protocolo se consideró “día 0” a aquel en el que se comenzaba el tratamiento, de modo que cuando se hace referencia a un día determinado este debe ser contabilizando desde el inicio del tratamiento, debiéndose considerar en cada caso la pauta del mismo.

El día 0 y a intervalos regulares de 3 o 5 días, en función de la duración de cada tratamiento, se realizó una exploración clínica completa del animal mediante la toma de temperatura rectal con termómetro, la palpación de los nódulos linfáticos regionales y la auscultación cardíaca y respiratoria con fonendoscopio para valorar el tipo y grado de disnea de los animales. La exploración clínica se completó con la toma de imágenes termográficas (Cámara de infrarrojos FLIR® E6) dorso-ventrales y latero-laterales de la cabeza del animal para su interpretación posterior. Además, se grabaron vídeos de las ovejas afectadas, método sencillo para analizar su grado de disnea y su progresión; y se tomaron fotografías de las zonas lesionadas para valorar la deformación craneal y la evolución del tejido proliferativo.

PROTOCOLO PARA LA VALORACIÓN DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS										
Día post-inicio del tratamiento		Día 0: Inicio tto.	Día 5	Día 10	Día 15: Fin tto.	Día 25	Día 35	Día 45	Día 55	Día 65
Técnicas utilizadas	Hisopo FN	✓			✓					
	Exploración clínica	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Termografía	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Fotografía	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Videos	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tabla 2. Técnicas utilizadas y días en las que se llevaron a cabo para la valoración de los tres tratamientos. La duración de cada tratamiento fue diferente, por lo que se tomó como referencia el primer tratamiento.

Una vez finalizado el tratamiento se continuó el seguimiento del animal, con los mismos métodos, recogiendo datos cada diez días. Con todo esto, se ha pretendido valorar en cada uno de los tratamientos planteados la evolución de los signos clínicos, la duración de la mejora clínica y el tiempo transcurrido hasta la reaparición de los síntomas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bloque I. Estudio de las vías de eliminación de SED en ovejas diagnosticadas de RCP y en sus corderos durante el parto y postparto.

Para la realización de este apartado, se partió de tres ovejas diagnosticadas de RCP, dos de ellas de raza Rasa Aragonesa y una de raza Assaf, cuyas prolificidades son 1,3 corderos/parto y 1,8 corderos/parto respectivamente (MAPA, 2018). Durante los dos años de duración de este trabajo, y teniendo en cuenta el estado de salud de los animales, se programaron dos partos por oveja. Con todos estos datos, la previsión del estudio era obtener 9 corderos de los 6 partos.

Sin embargo, una vez finalizado este periodo, únicamente se pudieron valorar 3 partos de dos ovejas diferentes, la oveja 172 y la oveja 600, de las que se obtuvieron 6 corderos. A pesar de los tratamientos hormonales aplicados, una de las ovejas no quedó gestante por lo que no pudo ser incluida en este trabajo; mientras que, la oveja 600 alcanzó el objetivo establecido de dos partos en dos años y por último, de la oveja 172 tan solo se obtuvo un parto, ya que murió durante la segunda gestación. De esta manera, en el presente trabajo se pudieron valorar un parto doble de la oveja 172 y dos partos dobles de la oveja 600.

Se debe resaltar que en el parto de la oveja 172, que tuvo lugar el 24 de marzo de 2018, no se pudo seguir estrictamente el protocolo debido a que el animal padeció una mamitis gangrenosa al tercer día post-parto, lo que derivó en un deterioro de su estado de salud. El animal se trató con penicilina G procaína combinada con dihidroestreptomicina (PENIVET SUSPENSIÓN®) a dosis de 0,5ml/10 kg de P.V. durante 10 días y con cánulas de bencilpenicilina intramamarias (Mamyzin Secado suspensión intramamaria®) a dosis de 2,5 ml. en cada mama durante 10 días. Este hecho provocó la interrupción de la toma de muestras al inicio del tratamiento por considerar la posibilidad de que los resultados no fueran representativos por la interferencia con los antibióticos utilizados sobre los aislamientos de SED, y por razones de bienestar animal. Como consecuencia de esta patología, los corderos fueron separados de su madre el día 3 de vida y se alimentaron, desde ese momento, con lactancia artificial, si bien el calostro lo tomaron de la madre. A pesar de ello, se continuó con el protocolo de toma de muestras en ambos corderos.

En los resultados de todas las muestras tomadas del parto de la oveja 172, y resumidos en la tabla 3, la muestra de placenta resultó positiva para el cultivo de SED, sin embargo, los aislamientos en vagina durante el resto del estudio fueron negativos. Finalmente, lo más destacable fue que tanto la muestra de calostro como la única muestra de leche obtenida de esta oveja, resultaran negativas.

Por otra parte, en el cordero 225 se observó una excreción intermitente de SED a través de las heces desde el momento del parto, evidenciando una temprana colonización del tracto digestivo por parte de este agente. En el cordero 226 los aislamientos en heces fueron siempre negativos a partir del día 3. Estos resultados pueden deberse al menor número de bacterias presentes en las muestras una vez pasados varios días tras la infección, tal y como citan algunos autores (Alvseike and Skjerve, 2000).

Días post-parto		d=0	d=3	d=6	d=9	d=15	d=22	d=30
Fecha toma muestras		24/03/2018	27/03/2018	30/03/2018	02/04/2018	09/04/2018	16/04/2018	21/04/2018
OVEJA 172	Vagina	-	-	-	-	-	-	-
	Calostro	-						
	Leche		-					
	Placenta	+						
	FN	+	+	+	+	+	+	+
	Heces	+						
CORD. 225	FN	+	-	-	-	-	-	-
	Heces	+	+	+	-	+	+	+
CORD. 226	FN	+	-	-	-	-	-	-
	Heces	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 3. Resultados de los cultivos microbiológicos de las muestras de la oveja 172 y sus corderos. El signo – indica que el aislamiento de SED ha sido negativo en esa localización y fecha concretas, mientras que el signo + indica un aislamiento positivo de SED en esa localización y fecha.

El primer parto de la oveja 600 tuvo lugar el 24 de octubre de 2018 sin ninguna complicación, cuyos datos se recogen en la tabla 4. En ambos corderos se observó una eliminación intermitente de SED durante todo el muestreo tanto en fosas nasales como en heces, situación que puede deberse al bajo nivel de excreción del microorganismo en el momento de obtención de la muestra, ya que las bacterias de este género presentan un comportamiento discontinuo en su excreción en el ganado ovino y caprino (Alvseike et al., 2000; Bonke et al., 2012; Duffy et al., 2009; Sandberg et al., 2003). Otra razón por la que los aislamientos obtenidos fueron intermitentes podría ser que la muestra recogida por los hisopos fuera insuficiente (Alvseike et al., 2000; Alvseike and Skjerve, 2000; Sandberg et al., 2002; Zweifel et al., 2004).

Por otro lado, se presentan discordancias entre los resultados obtenidos por el Laboratorio Agroambiental y los de Laboratorios Exopol, ya que para una misma muestra los resultados eran distintos. Una explicación a esta falta de correspondencia sería la utilización de medios de cultivo y condiciones de incubación diferentes de las muestras en cada laboratorio (Alvseike y Skjerve, 2000).

Días post-parto		d=0,0h		12h	d=3		d=6	d=9		d=15		d=22		d=30		
Fecha		24/10/18			27/10/18		30/10/18	02/11/18		08/11/18		15/11/18		23/11/18		
Prueba		Cult	PCR	Cult	Cult	PCR	Cult	PCR	Cult	PCR	Cult	PCR	Cult	PCR	Cult	PCR
OVEJA 600	Vagina (Exopol)	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vagina (LA-DGA)	-			-		-		-		-		-		-	
	Calostro(Exopol	-	-													
	Calostro (LA-DGA)	-														
	Precipitado calost(LA-DGA)	-		-												
	Sobrenadante calostro (LA-DGA)	-		-												
	Leche (Exopol)				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leche (LA-DGA)				-		-		-		-		-		-	
	FN (Exopol)	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FN (LA-DGA)	+			+		+		+		+		+		+	
	Heces (Exopol)	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Heces (LA-DGA)	-			+		+		+		+				+	
CORDERO 284	FN (Exopol)	-	-		-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	FN (LA-DGA)	-			-		+		-		+				+	
	Heces (Exopol)	-	-		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Heces (LA-DGA)	-			+		-		-		+				-	
	Sangre		-													
CORDERO 285	FN (Exopol)	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FN (LA-DGA)	-			-		-		-		+				+	
	Heces (Exopol)	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Heces (LA-DGA)	-			+		-		-		-				-	
	Sangre (Exopol)		-													

Tabla 4. Resultados de los cultivos microbiológicos y PCR de las muestras de la oveja 600 y sus corderos 284 y 285.

El segundo parto de la oveja 600, y último analizado para este trabajo, tuvo lugar el día 5 de junio de 2019 y presentó complicaciones. Este animal padeció una neumonía gangrenosa en el parto, patología frecuentemente asociada a la RCP y consecuencia secundaria de la misma, tal y como cita Brodgen et al. en su trabajo de 1998. Este hecho, a pesar del tratamiento y el aumento en la ración diaria, hizo que la oveja llegara en una condición corporal inapropiada al parto. Quizá en parte a todo lo explicado, el parto de este animal fue distócico requiriendo asistencia veterinaria. Ambos corderos sobrevivieron y se pudo continuar con el protocolo de toma de muestras correctamente, aunque fueron criados con lactación artificial debido a la carencia total de vínculo materno-filial. No obstante, los corderos tomaron el calostro de su madre tras ser obtenido por ordeño y ofrecido en biberón y se mantuvieron en el mismo recinto que su madre durante todo el estudio.

En los resultados obtenidos de este parto y recogidos en la tabla 5, los corderos presentaron tan solo un aislamiento positivo en las fosas nasales dentro de las primeras horas

de vida. Esto puede ser debido a la ausencia de vínculo materno-filial anteriormente citada, ya que al no existir un riesgo de exposición a SED tan elevado, las probabilidades de infección de los corderos disminuyen. Este motivo también justificaría la ausencia total de resultados positivos en las heces de los dos corderos corroborando lo planteado por Figueras en 2017. En su estudio sobre aislamientos de SED en corderos de madres portadoras de la bacteria se obtuvo que el 100% de los corderos con aislamiento positivo en la muestra de heces procedían de partos dobles, y por lo tanto habían permanecido en las jaulas de ahijamiento manteniendo un estrecho contacto con su madre tras el parto.

Días post-parto		d=0, 0h		d=0, 12h		d=3		d=6		d=9		d=15		d=22		d=30	
Fecha		05/06/2019				08/06/2019		11/06/2019		14/06/2019		20/06/2019		27/06/2019		05/07/2019	
Prueba		Cult	PCR	Cult	PCR	Cult	PCR	Cult	PCR	Cult	PCR	Cult	PCR	Cult	PCR	Cult	PCR
OVEJA 600	Vagina (Exopol)	-	-														
	Vagina (LA-DGA)	-															
	FN (Exopol)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FN (LA-DGA)	+		+						+		+				+	
	Heces (Exopol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Heces (LA-DGA)	+		+						+		+				+	
	Calostro (Exopol)	-	-	-	-												
	Calostro (LA-DGA)	-		-													
	Leche (Exopol)											-	-				
	Leche (LA-DGA)											-					
	Placenta(LA-DGA)	-															
CORD. 388	FN (Exopol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FN (LA-DGA)	-		+						-		-				-	
	Heces (Exopol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Heces (LA-DGA)	-		-						-		-				-	
CORD. 389	FN (Exopol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FN (LA-DGA)	+		-						-		-				-	
	Heces (Exopol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Heces (LA-DGA)	-		-						-		-				-	

Tabla 5. Resultados de los cultivos microbiológicos y PCR de las muestras de la oveja 600 y sus corderos 388 y 389.

Una vez comentados los datos de cada parto por individual, al analizar los resultados de los tres partos en conjunto, se observó el continuo aislamiento de SED en las fosas nasales de las ovejas. Estos resultados son acordes a los datos obtenidos en anteriores trabajos, en los que se ha demostrado que en todos los casos de RCP se aísla este microorganismo (Bonke et al., 2012; Brodgen et al., 1994; Lacasta et al., 2012; Meehan et al., 1992; Regenscheit et al., 2017; Wolf y Schefers, 2017).

Respecto a los aislamientos de SED en heces se observó que en las ovejas de los tres partos existió excreción continua de este agente a través de esta localización, evidenciando la

importancia de la vía fecal en la diseminación de SED y en la contaminación del entorno donde cohabita con sus corderos, aumentando el riesgo de infección de los mismos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores sobre la prevalencia de SED en heces, en los que se evidencia la importante excreción de este agente a través de esta localización y, por tanto, su relevancia en la diseminación de la bacteria (Figueras, 2017; Milnes et al. 2008; Soren et al. 2015; Zweifel et al. 2004). Sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos por Bonke et al. en 2012, en su estudio de prevalencia en matadero, donde los aislamientos de SED en heces de ovejas adultas es del 0%, aunque en el mismo estudio justifican estos resultados por la baja cantidad de las muestras analizadas y sus deficientes condiciones de conservación. Al igual que en los resultados de los corderos del segundo parto, resulta reseñable la presencia de discordancias en los resultados de las muestras de heces enviadas al Laboratorio Agroambiental y los obtenidos de Laboratorios Exopol, probablemente debido, tal y como se ha indicado anteriormente, a las diferencias de los medios de cultivo y condiciones de incubación utilizadas en cada laboratorio (Alvseike y Skjerve, 2000).

Se lograron obtener muestras de placenta de dos partos para la realización de cultivos microbiológicos. En una de ellas no se aisló SED, mientras que en la otra, procedente del parto de la oveja 172, sí se aisló la bacteria. Este resultado podría explicar por qué algunos autores describen a este microorganismo como agente causal de abortos y de nacimientos de corderos mortinatos o prematuros (Davies et al., 2001; Greenfield et al., 1973; Long et al., 1978). Sin embargo, el hecho de que los aislamientos en vagina en los tres partos fueran negativos durante todo el estudio y que todos los corderos fueran perfectamente viables indica más una contaminación de la muestra, probablemente al entrar en contacto con el suelo y con material fecal. Además, esto pone de manifiesto la resistencia de SED en el medio ambiente y el alto riesgo de contaminación en caso de presencia de esta bacteria (Milnes et al., 2008; Zweifel et al., 2004).

De igual modo, los aislamientos negativos en vagina confirman los resultados de Figueras en 2017 y Hannam et al. en 1986 en los que se observa que la eliminación de la bacteria a través de esta localización no es muy importante. Estos resultados asocian SED con un bajo poder patógeno sobre el aparato reproductor de las ovejas gestantes.

Para concluir con los resultados observados en las ovejas, y como uno de los objetivos principales del trabajo, se estudió la presencia de SED en calostro y leche. Todos los cultivos de las muestras obtenidas resultaron negativos, tanto en leche como en calostro, que junto con los resultados negativos de PCR para estas muestras, indica que la bacteria no estaba presente

en estas localizaciones ni extracelular ni intracelularmente ya que, según los técnicos del Laboratorio Agroambiental de Zaragoza, el procesado de las muestras destruye las células presentes lo que dejaría libre al microorganismo o sus antígenos. Según estos resultados, se concluye que aunque SED tiene un comportamiento intracelular en los macrófagos de las fosas nasales de los animales enfermos de RCP (Brodgen et al., 1994; Lacasta et al., 2012; Meehan et al., 1992), la bacteria no se comporta igual en el caso de los macrófagos u otras células calostrales; como se ha descrito en otras bacterias como *Brucella abortus* (Baldwin and Winter, 1994; Roop et al., 2009; Philippon et al., 1971).

Por otra parte, se observó que todos los corderos fueron positivos a SED en alguna localización en las primeras horas de vida, ya sea en fosas nasales o en heces, situación que coincide con los estudios realizados por Figueras en 2017 donde se evidencia que tanto el contacto con SED como la infección tienen lugar en las primeras horas de vida. Estos aislamientos a una edad tan temprana indican que el primer contacto de los corderos con SED puede tener lugar a través de los ollares o por vía oral al estar en contacto con material contaminado.

Además, a pesar de que los corderos presentaron la bacteria en el aparato digestivo, demostrado por la excreción intermitente de SED a través de las heces, no mostraron cuadros digestivos, situación que difiere con anteriores estudios en los que se asociaba SED a procesos gastroentéricos en animales jóvenes (Alvseike y Skjerve, 2002; Chatzopoulos et al., 2016; Davies et al., 2001; Harp et al., 1981; Long et al., 1978).

Finalmente y en conclusión, los resultados obtenidos de los seis corderos, tanto de fosas nasales como de heces, y los resultados de las muestras de calostro y leche obtenidos de las tres ovejas de este estudio indican que los corderos se infectan o al menos están en contacto con la bacteria en las primeras horas de vida y que dicho contacto o infección no es por la vía lactógena, quedando solo como posibles vías de infección la vía digestiva o la vía respiratoria. Ambas vías están confirmadas por dos trabajos de infección experimental, tanto la digestiva (Hannam et al., 1986) como la respiratoria (Brodgen et al., 1994; Figueras, 2017). En ambos estudios la eliminación de la bacteria es discontinua en las localizaciones estudiadas, al igual que en el presente trabajo, sin embargo su frecuencia es mucho más elevada probablemente como consecuencia de las dosis infectantes utilizadas.

Bloque II. Valoración de la eficacia y posología de distintos fármacos en animales enfermos de RCP.

Los tres tratamientos aplicados se han valorado según la mejora de la sintomatología, la utilización de técnicas de imagen y el aislamiento de SED en cultivos microbiológicos.

El primer tratamiento estudiado fue la administración de marbofloxacin por vía intramuscular durante 15 días. Antes de comenzar el mismo, el animal presentaba una grave disnea inspiratoria con acusados ronquidos e hinchazón de los carrillos durante la espiración, presentaba abundante flujo nasal mucoso y se podía apreciar la proliferación de tejido a través de los orificios nasales de ambos lados (Figura 9-A). Además, en las imágenes termográficas previas se observó que el animal presentaba un elevado aumento de temperatura en ambas fosas nasales debido a la deficiente ventilación de la zona causada por la RCP bilateral que padecía (Figura 10-A).

Una vez finalizado el tratamiento se observó cierta mejora en la sintomatología. Sin embargo, el cultivo de la muestra de fosas nasales tomada en ese momento siguió siendo positivo a SED. La mejora de la sintomatología fue en aumento hasta el día 31, momento en el que apenas se observó secreción nasal (Figura 9-B) y la disnea era muy leve. Del mismo modo, se observó que la inflamación de los cornetes ventrales y el tejido proliferativo habían disminuido notablemente. Esto se confirmó a través de las termografías apreciándose una reducción de la temperatura de las fosas nasales, consecuencia de la disminución de la inflamación y de la mejora de la ventilación de la cavidad nasal (Figura 10-B,C,D).

El día 55 se observó una reaparición de los signos clínicos y en la termografía se apreció un nuevo aumento de la temperatura de la zona (Figura 10-E). Definitivamente, el día 70 se confirmó la ineficacia de este tratamiento tanto por la sintomatología, como por la termografía (Figura 10-F) y se reactivó la RCP volviendo a observarse el tejido proliferativo a través de los ollares (Figura 9-C).

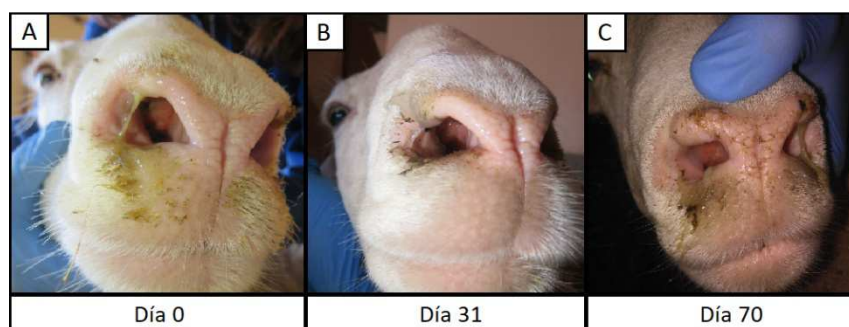


Figura 9. Evolución del tejido proliferativo de la fosa nasal derecha en la oveja 600 durante el primer tratamiento.

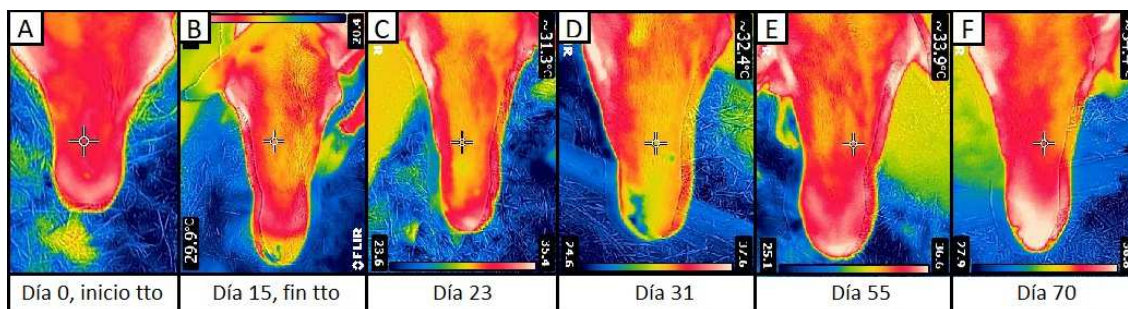


Figura 10. Termografías de proyección dorso-ventral realizadas para valorar el primer tratamiento de la oveja 600.

Debido al progresivo deterioro de la salud del animal, y pese a haber experimentado una mejoría clínica transitoria inicialmente, se decidió administrar un segundo tratamiento con florfenicol combinado con flunixin meglumine en dos fases separadas de 3 días cada una. Además, se administró este fármaco por vía intracornete en lugar de por vía parenteral para lograr un mayor efecto en la zona lesionada, ya que en el trabajo de Rubira en 2017b su aplicación a través de esta vía apenas mostró mejora en el estado de salud del animal. Esto probablemente se debió a que el florfenicol posee poco tiempo de permanencia en sangre, impidiendo que se alcancen concentraciones bactericidas adecuadas si no se repite la dosis (Ali et al., 2003).

El día 0 la oveja presentaba la clínica característica de la RCP muy marcada, con una fuerte disnea inspiratoria con ronquidos y abundante flujo nasal mucoso; siendo incluso necesario que el animal abriera la boca para expulsar el aire consecuencia de la importante obstrucción de las fosas nasales. En las imágenes termográficas obtenidas en este tratamiento y para su valoración debe tenerse en cuenta que en las zonas de aplicación del fármaco aparecen dos áreas muy bien delimitadas de elevada temperatura (Figura 11-C y D), debido a la falta de pelo por el rasurado y, en consecuencia, a la modificación de la capacidad de aislamiento de la piel. Estas áreas podrían dar lugar a confusión.

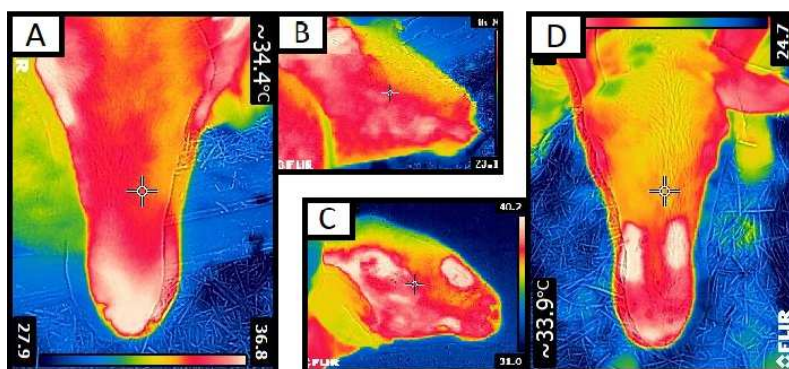


Figura 11. **Imagen A y B.** Oveja 600 sin rasurar, justo antes de comenzar el tratamiento. **Imagen C y D.** Oveja 600 rasurada a nivel de la incisura naso-incisiva para la administración del tratamiento intracornete.

En las exploraciones realizadas a lo largo de los 9 días que duró el tratamiento apenas se apreció una mejoría de los signos clínicos. Sin embargo, sí que se observó en las imágenes termográficas una leve disminución de la temperatura de la zona (Figura 12-B). Una vez finalizado el tratamiento se tomaron muestras de las fosas nasales y, al igual que tras el primer tratamiento, se comprobó que el aislamiento de SED seguía siendo positivo.

Hasta el día 18 no se comenzó a observar una leve mejoría clínica. El día 27 la mejora ya era muy evidente apreciándose solamente una leve disnea inspiratoria sin apenas descarga nasal. No obstante, fue el día 42 cuando en las imágenes termográficas se observó una disminución del área de color rojo que se correspondía con una menor temperatura en las fosas nasales (Figura 12-E), causada por la disminución de la inflamación lo que mejoró la ventilación de la zona. Este estado se mantuvo hasta el día 60, momento en el que empezó a observarse un empeoramiento del estado de salud del animal y la reaparición de la clínica característica de la enfermedad.

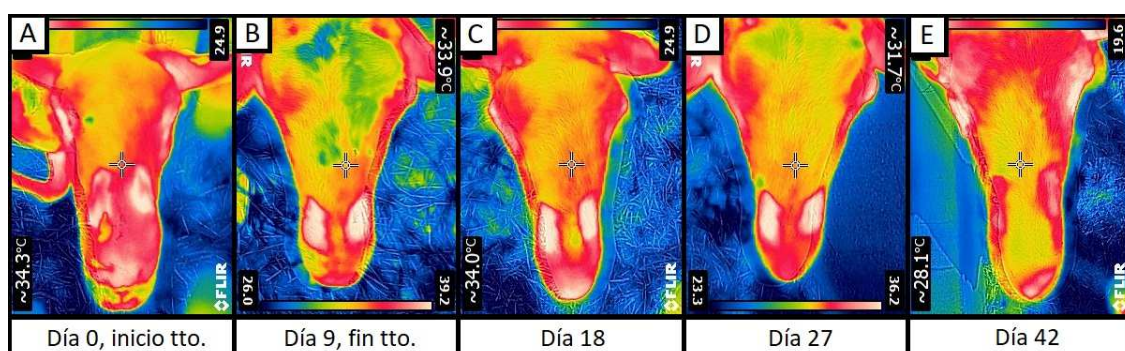


Figura 12. Termografías de proyección dorso-ventral realizadas para valorar el segundo tratamiento de la oveja 600.

Debido al progresivo agravamiento de la salud del animal se decidió administrar el tercer y último tratamiento de este trabajo, en el que se aplicó por vía parenteral marbofloxacin y flunixin meglumine durante 15 días. Durante la administración del mismo no se observaron cambios evidentes ni en las técnicas de imagen ni en la sintomatología del animal, siendo esta muy acusada. Además, al igual que en los anteriores casos, el hisopo de fosas nasales tomado al finalizar el tratamiento presentó aislamiento positivo a SED.

El día 21 se comenzó a apreciar la mejoría clínica del animal con la desaparición de la disnea y de la secreción nasal, siendo la progresión más rápida que con los anteriores tratamientos. Igualmente, las imágenes termográficas tomadas ese día mostraban una disminución de la temperatura de las fosas nasales (Figura 13-C). En la valoración clínica realizada el día 31 la sintomatología había desaparecido casi por completo y en la inspección

de la cavidad nasal no se observaba proliferación del tejido inflamado a través de los ollares (Figura 14-B). La comparación de las imágenes termográficas mostró un cambio en la coloración de la zona, tornando del color rojo de las fases anteriores a verde azulado (Figura 13-D), lo que indicaba una acusada disminución de la temperatura de la zona. Esta situación se mantuvo hasta el día 47, momento en el que se volvió a apreciar un aumento de la temperatura de las fosas nasales (Figura 13-F) así como la reaparición de la sintomatología. Finalmente, el día 70 el estado de salud del animal, los signos clínicos y las imágenes termográficas volvieron a ser similares a los del día 0 (Figuras 13-A y G; 14-A y C).

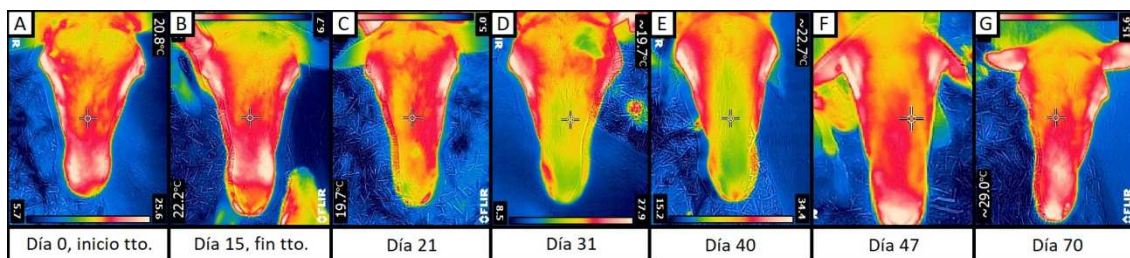


Figura 13. Termografías de proyección dorso-ventral realizadas para valorar el tercer tratamiento de la oveja 600.

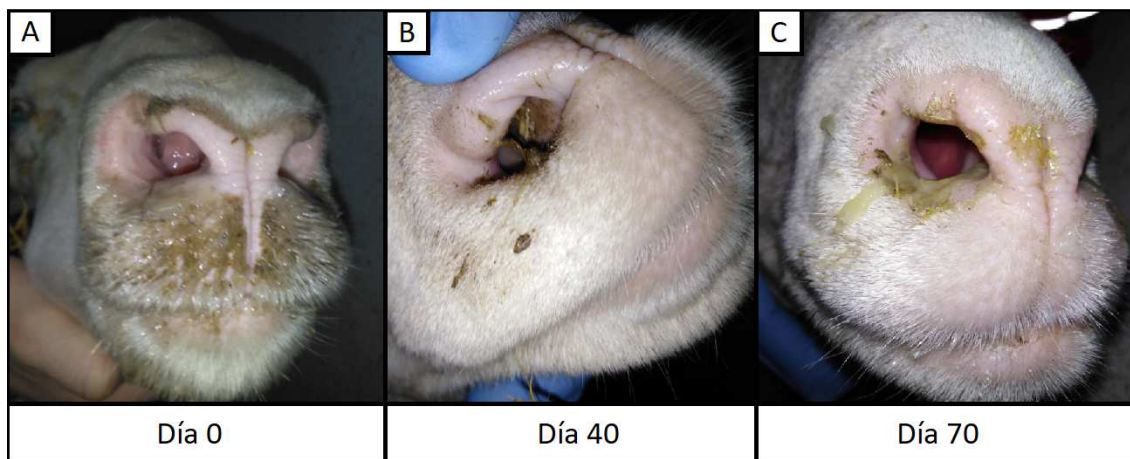


Figura 14. Evolución del tejido proliferativo de la fosa nasal derecha en la oveja 600 durante el tercer tratamiento.

En resumen, los resultados del primer tratamiento muestran que el animal comenzó a mejorar el quinto día tras finalizar la administración de los fármacos. Esta situación se prolongó durante 25 días aproximadamente, hasta que se volvió a agravar el estado de salud del animal.

En el segundo tratamiento el animal comenzó a manifestar una progresiva y lenta mejora clínica el noveno día tras finalizar el tratamiento y que se prolongó 40 días, momento en el que la enfermedad vuelve a agravarse de nuevo. La mejora clínica de este tratamiento persistió

durante más tiempo, sin embargo fueron necesarios muchos más días para alcanzar un estatus sanitario similar al de los otros dos tratamientos. Además, presentó la dificultad de la vía de administración intracornete, difícilmente aplicable a la actividad ganadera.

En el tercer tratamiento la mejora clínica fue mucho más marcada que en los dos anteriores, hecho evidenciado en las exploraciones clínicas realizadas y en los resultados obtenidos de las imágenes termográficas y fotografías realizadas. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del flunixin meglumine en el tratamiento frente a la RCP debido a su efecto antiinflamatorio.

Finalmente y en conclusión, los dos principios activos utilizados para este estudio, el florfenicol y la marbofloxacin, a pesar de ser fármacos de elección tanto por la sensibilidad como por su farmacocinética han mostrado una eficacia parcial y transitoria frente a la RCP y, aunque han sido capaces de mejorar la clínica, no ha sido posible eliminar a SED de las fosas nasales. A pesar de ello, gracias a estos tratamientos se ha logrado prolongar la vida de los animales y su productividad. Por ello, es necesario continuar trabajando en la etiopatogenia de esta enfermedad y así establecer tratamientos eficaces para eliminar este microorganismo de las fosas nasales.

6. CONCLUSIONES

En cuanto a las vías de eliminación de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7) en ovejas diagnosticadas de rinitis crónica proliferativa y en sus corderos durante el parto y postparto, estudiadas en este trabajo, se concluye:

- I. La ausencia de aislamiento de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7) en los cultivos microbiológicos y PCR, tanto en la leche como en el calostro de las ovejas de este estudio, descarta la presencia del agente en esta localización y por lo tanto su transmisión por vía lactógena.
- II. Las ovejas enfermas de rinitis crónica proliferativa presentan una excreción continua de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7) a través de las heces, lo que indica que la vía de eliminación fecal de esta bacteria es importante para su diseminación, favoreciendo la contaminación del entorno donde cohabita con sus corderos y aumentando el riesgo de infección de los mismos.

- III. La infección de los corderos ocurre en las primeras horas de vida dado el temprano aislamiento de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7) tanto en fosas nasales como en heces.
- IV. El vínculo materno-filial o el contacto cercano con animales eliminadores de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7) aumenta la probabilidad de infección de los corderos.

Tras administrar y valorar los anteriores tratamientos, se puede concluir:

- V. Tanto la marbofloxacin como el florfenicol han mostrado una eficacia parcial y transitoria frente a la rinitis crónica proliferativa y, aunque han sido capaces de mejorar la clínica, no ha sido posible eliminar a *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7) de las fosas nasales. Además, con estos tratamientos se ha logrado prolongar la vida de los animales y su productividad.
- VI. El tratamiento combinado de marbofloxacin y flunixin meglumine, aplicado de manera sistémica, produce una reducción más evidente y rápida de los signos clínicos de la rinitis crónica proliferativa. El flunixin meglumine tiene un importante efecto sobre dicha reducción de la sintomatología.

6. CONCLUSIONS

Regarding the study of the elimination routes of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) in sheep diagnosed with chronic proliferative rhinitis and their lambs during peripartum and postpartum, it is concluded that:

- I. The absence of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) isolations in cultures and PCR, both in milk and colostrum of the ewes of this study, dismisses the presence of the bacteria in this location and therefore its lactogenic transmission.
- II. Sheep affected by chronic proliferative rhinitis show a continuous *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) excretion through the faeces. This fact indicates that the faecal elimination route of this bacterium is important for its dissemination, promoting the contamination of the environment where the ewe lives together with their lambs and increasing their risk of infection.
- III. Lambs infection occurs during the first hours of their life. It is due to the early *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) isolation in the nasal cavity and faeces.

- IV. The mother-to-lamb bond or the close contact with excretory animals of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1,5,(7) increases the probability of infection in the lambs.

After treatments administration and valuation, it is concluded that:

- V. Both marbofloxacin and florfenicol have shown partial and temporary efficiency against chronic proliferative rhinitis. Although these products have been able to improve the clinic, it has not been possible to eliminate *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) of the nasal cavity. In addition, thanks to these treatments, it has been possible to extend the life of animals and their productivity.
- VI. The systemic administration of marbofloxacin combined with flunixin meglumine causes a greater improvement in the clinical signs of chronic proliferative rhinitis. In fact, flunixin meglumine has an important effect on this improvement.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Una vez finalizado el texto, me dispongo a exponer todos los conocimientos adquiridos. En primer lugar, durante los dos años de duración del trabajo, he practicado la toma de muestras de diferentes localizaciones, e interpretando sus resultados, muchos de los cuales nos han dado a mis tutores y a mí mucho que pensar. He aprendido a analizar los motivos por los que aparecen aislamientos positivos en localizaciones y fechas que se salen de todos los esquemas, basándome en el estudio de la patogenia de SED, en la probabilidad de que se den esos resultados o en la valoración de otros motivos, como posibles contaminaciones de la muestra. Por lo tanto, una conclusión muy importante, es que en la veterinaria y en la investigación no todo es blanco o negro como muchas veces parece en los libros de texto, sino que son más complicadas y requieren englobar todos los conocimientos aprendidos a lo largo de los años.

En segundo lugar, se ha intentado traer el máximo número de animales con RCP posibles, aunque finalmente, el tamaño muestral del trabajo ha sido pequeño. Sin embargo, esta situación me ha enseñado y acercado al mundo “real”, pues no es fácil llevar ovejas a la Facultad de Veterinaria una vez que se diagnostican en las explotaciones, ya que el ganadero puede tener otros deseos para ese animal o simplemente porque los medios económicos con los que se cuenta para realizar un trabajo de fin de grado son limitados.

Gracias a este trabajo también he aprendido sobre farmacología y prescripciones excepcionales, todo ello muy importante para el cercano futuro laboral. Además, he practicado diferentes vías de administración de medicamentos y aprendido otras nuevas como la vía intracornete.

Finalmente, me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han ayudado, especialmente a mis tutores, Luis Pedro Figueras Ara e Inés Rubira Aznar, a los que agradezco su dedicación y ayuda ofrecida durante estos dos años; y también al SCRUM, por haber colaborado para que este trabajo saliera adelante y por darme la oportunidad de aprender tanto sobre el sector ovino.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 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* 27, 475-483.
- Alvseike, O., Skjerve, E., (2000). Probability of detection of *Salmonella* using different analytical procedures, with emphasis on subspecies *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7). *International Journal of Food Microbiology* 58, 49-58.
- Alvseike, O., Skjerve, E., (2002). Prevalence of a *Salmonella* subspecies *diarizonae* in Norwegian sheep herds. *Preventive Veterinary Medicine* 52, 277-285.
- Baldwin, C. L., Winter, A. J. (1994). Macrophages and *Brucella*. *Immunology Series* 60, 363–380.
- Bonke, R., Wacheck, S., Bumann, C. Thum, C., Stueber, E., Koenig, M., Stephan, R., Fredriksson-Ahomaa, M. (2012). High prevalence of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* in tonsils of sheep at slaughter. *Food Research International* 45, 880-884.
- Brogden, K.A., Lehmkuhl, H.D., Cutlip, R.C., (1998). *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. *Veterinary Research* 29, 233-254.
- Brodgen, K.A., Meehan, J.T., Lehmkuhl, H.D. (1994). *Salmonella arizonae* infection and colonization of the upper respiratory-tract of sheep. *Veterinary Record* 135, 410-411.
- Celeghini, E.C.C., Gregory, L., Pinheiro, E.S., Piva, F.M., Carneiro, P.A.B., Parapinski-Santos, B., Bianchi, M., Benesi, F.J., (2013). Orchiepididymitis in ram by *Salmonella enterica* sub *diarizonae*: first case in South America. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria e Zootecnia* 65, 139-144.
- Chatzopoulos, D.C., Sarrou, S., Vasileiou, N.G.C., Ioannidi, K.S., Peteinaki, E., Valiakos, G., Tsokana, C.N., Papadopoulos, E., Spyrou, V., Mavrogianni, V.S., Giannakopoulos, A.,

- Sbiraki, A., Lacasta, D., Bueso, J.P., Athanasiou, L.V., Billinis, C., Fthenakis, G.C., (2016). Dissemination of intestinal pathogens between lambs and puppies in sheep farms. *Small Ruminant Research* 141, 5-10.
- Davies, R.H., Evans, S.J., Preece, B.E., Chappell, S., Kidd, S., Jones, Y.E., (2001). Increase in *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) in sheep. *Veterinary Record* 149, 555-557.
 - Duffy, L., Barlow, R., Fegan, N., Vanderlinde, P., (2009). Prevalence and serotypes of *Salmonella* associated with goats at two Australian abattoirs. *Letters in Applied Microbiology* 48, 193-197.
 - Ferrer, L.M., García de Jalón, J.A., De las Heras, M. (2002). Atlas de Patología ovina. Servet diseño y Comunicación S.L. 184-187.
 - Ferreras, M.d.C., Muñoz, M., Pérez, V., Benavides, J., García-Pariente, C., Fuertes, M., Aduriz, G., García-Marin, J.F., (2007). Unilateral orchitis and epididymitis caused by *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* infection in a ram. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 194-197.
 - Figueras, L.P. (2017). Estudio de la prevalencia y transmisión de *Salmonella entérica* subsp. *diarizonae* serotipo 61:k:1,5,(7) en el ganado ovino y su implicación como agente etiológico de la rinitis crónica proliferativa. Estudios de campo e infección experimental en corderos. Universidad de Zaragoza. Tesis doctoral.
 - González, J.M. (2015). Factores que condicionan la supervivencia de los corderos tipo Ternasco. Estudio del complejo respiratorio ovino: presentación, formas lesionales, agentes implicados y serotipificación de *Pasteurella haemolytica*. Universidad de Zaragoza. Tesis doctoral.
 - Greenfield, J., Greenway, J.A., Bigland, C.H., (1973). *Arizona* infections in sheep associated with gastroenteritis and abortion. *Veterinary Record* 92, 400-401.
 - Hannam, D.A.R., Wray, C., Harbourne, J.F., (1986). Experimental *Salmonella arizonae* infection of sheep. *British Veterinary Journal* 142, 458-466.
 - Harp, J. A., Myers, L.L., Rich, J.E., Gates, N.L., (1981). Role of *Salmonella arizonae* and other infective agents in enteric disease of lambs. *American Journal of Veterinary Research* 42, 596-599.
 - Hooper, D.C. (1998). Review. Clinical applications of quinolones. *Biochimica et Biophysica Acta* 1400, 45-61.
 - Horvath, L., Kraft, M., Fostiropoulos, K., Falkowski, A., Tarr, P.E., (2016). *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* Maxillary Sinusitis in a Snake Handler: First Report. *Open Forum Infectious Diseases* 3.
 - Jurado, R., Arenas, C., Doblas, A., Rivero, A., Torre-Cisneros, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine* 10(52), 3497-501.

- Lacasta, D., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., Gonzalez, J.M., De las Heras, M., (2008). Influence of climatic factors on the development of pneumonia in lambs. Small Ruminant Research 80, 28-32.
- Lacasta, D.; Ferrer, L. M.; Ramos, J. J.; Bueso, J. P.; Borobia, M.; Ruiz de Arcaute, M.; Figueras L.; González, J. M.; De las Heras, M., (2011). Brote de rinitis proliferativa crónica asociada a *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* en un rebaño de ovino de carne. XXXVI Congreso Nacional y XII Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). España.
- Lacasta, D., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., Bueso, J.P., Boborbia, M., de Arcaute, M.R., Figueras, L., Gonzalez-Sainz, J.M., De las Heras, M., (2012). Chronic proliferative rhinitis associated with *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* in sheep in Spain. Journal of Comparative Pathology 146, 72-72.
- Lacasta, D., Figueras, L., Bueso, J.P., De Las Heras, M., Ramos, J.J., Ferrer, L.M., González, J.M., Ruiz de Arcaute, M., Ortín, A., Marteles, D., Navarro, T., Fernández, A. (2017). Experimental infection with *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1,5,(7) in sheep: Study of cell mediated immune response. Small Ruminant Research 149, 28-33.
- Long, J.R., Finley, G.G., Clark, M.H., Rehmtulla, A.J., (1978). Ovine fetal infection due to *Salmonella arizonae*. Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne 19, 260-263.
- MAPA, (2018). Catálogo oficial de razas. Raza ovina Rasa Aragonesa.
- MAPA, (2018). Catálogo oficial de razas. Raza ovina Assaf.
- Meehan, J.T., Brogden, K.A., Courtney, C., Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., (1992). Chronic proliferative rhinitis associated with *Salmonella arizonae* in sheep. Veterinary Pathology 29, 556-559.
- Milnes, A.S., Stewart, I., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., Newell, D.G., Sayers, A.R., Cheasty, T., Cassar, C., Ridley, A., Cook, A.J.C., Evans, S.J., Teale, C.J., Smith, R.P., McNally, A., Toszeghy, M., Futter, R., Kay, A., Paiba, G.A., (2008). Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. Epidemiology and Infection 136, 739-751.
- Philippon, A., Renouy, G., Plommet, M., Bosseray, N. (1971). Brucellose bovine expérimentale. V. –Excrétion de “*Brucella abortus*” par le colostrums et le lait. Annales de Recherches Vétérinaires, INRA Editions, 2 (1), 59-67.
- Popesko, P. (1998). Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos. Masson, S.A.
- Pritchard, J., (1990). *Salmonella arizonae* in sheep. Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne 31, 42-42.

- Regenscheit, N., Roos, S., Giezendanner, R., Gurtner, C. (2015). Proliferative Rhinitis in a flock of Texel sheep associated with *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7). Congreso anual. European Society of Veterinary Pathology. Helsinki.
- Regenscheit, N., Overesch, G., Giezendanner, R., Roos, S., Gurtner, C. (2017). *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1,5,(7) associated with chronic proliferative rhinitis and high nasal colonization rates in a flock of Texel sheep in Switzerland . Preventive Veterinary Medicine 145, 78-82.
- Roop, R.M., Gaines, J.M., Anderson, E.S., Caswell, C.C., Martin, D.W. (2009). Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. Medical Microbiology Immunology. 198, 1-6.
- Rubira, I., Navarro, T., Jiménez, C., Ferrer, L.L.M., Figueras, L., De Las Heras, M., Castells, E., Bueso, J.P., Lacasta, D. (2017a). Chronic proliferative rhinitis in sheep. Improvement of the clinical methods of diagnosis with imaging techniques. Congreso annual. 9th International Sheep Veterinary Congress. Harrogate. United Kingdom.
- Rubira, I. (2017b). Valoración de técnicas de diagnóstico y estudio de posibles tratamientos de la rinitis crónica proliferativa en el ganado ovino. Universidad de Zaragoza. Trabajo de fin de grado.
- Sandberg, M., Alvseike, O., Skjerve, E., (2002). The prevalence and dynamics of *Salmonella enteric* IIIb 61:k:1,5,(7) in sheep flocks in Norway. Preventive Veterinary Medicine 52, 267-275.
- Sandberg, M., Alvseike, O., Nesbakken, T., Skjerve, E., (2003). The agreement in isolation of *Salmonella enterica* IIIb 61:k: 1,5,(7) from rectal swabs, faecal samples and ileo-caecal lymph nodes from sheep. Preventive Veterinary Medicine 60, 167-174.
- Soren, K., Lindblad, M., Jernberg, C., Eriksson, E., Melin, L., Wahlstrom, H., Lundh, M., (2015). Changes in the risk management of *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61:(k):1,5,(7) in Swedish sheep herds and sheep meat due to the results of a prevalence study 2012. Acta Veterinaria Scandinavica 57.
- Wolf, C., Schefers, J., (2017). Challenges posed by a flock problem of *Salmonella diarizonae* induced proliferative rhinitis. Congreso anual. 9th International Sheep Veterinary Congress. Harrogate. United Kingdom.
- Zhang, X., Xiong, H., Li, H., Yu, L., Deng, X. (2011). Effects of florfenicol on LPS-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production in RAW 264.7 macrophages. Fundamental and Clinical Pharmacology 25, 591-598.
- Zweifel, C., Zychowska, M.A., Stephan, R., (2004). Prevalence and characteristics of Shiga toxin- producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. International Journal of Food Microbiology 92, 45-53.