

46

Symposium
de Cunicultura

Pineda de Mar

Libro de Actas



Organizar



+

IRTA^{RS}

Instituto
de Investigación y Tecnología
Agroalimentarias



Generalitat de Catalunya
Departament d'Acció Climàtica,
Alimentació i Agenda Rural

1 y 2 de junio de 2022



978-84-17884-20-8



INTERCUN



Organización
Interprofesional
Cunicola

HIPRA

FOCALIZADOS EN EL RHDV2

ERAVAC[®]

Vacuna inactivada, adyuvantada

Enfermedad vírica hemorrágica del conejo tipo 2 (RHDV2)



ERAVAC[®] vacuna inactivada de la enfermedad hemorrágica del conejo tipo 2 (RHDV2), emulsión inyectable. **COMPOSICIÓN:** Una dosis (0,5 ml) contiene: virus de tipo 2 inactivado de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV2), cepa V-1037 $\geq 70\%$ cELISA40*, (*) $\geq 70\%$ de los conejos vacunados deben presentar concentraciones de anticuerpos mediante cELISA iguales o superiores a 40. **INDICACIONES:** Conejos: Para la inmunización activa de conejos a partir de 30 días de edad para reducir la mortalidad causada por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo tipo 2 (RHDV2). **ADMINISTRACIÓN:** Vía subcutánea. **POSOLOGÍA:** 0,5 ml/animal. **REACCIONES ADVERSAS:** Puede ocurrir un ligero aumento transitorio de la temperatura por encima de los 40°C muy frecuentemente entre dos o tres días después de la vacunación. Este aumento de la temperatura se resuelve espontáneamente sin tratamiento dentro de los 5 días siguientes a la vacunación. Se puede observar un nódulo o hinchazón (<2 cm) en el punto de inyección muy frecuentemente, que puede durar 24 horas. Estas reacciones locales se reducen gradualmente y desaparecen sin necesidad de tratamiento. Se puede observar letargo y/o inapetencia durante las primeras 48 horas después de la inyección en muy raras ocasiones, en base a las notificaciones tras la autorización. **TIEMPO DE ESPERA:** 0 días. **PRECAUCIONES ESPECIALES:** La vacuna proporciona protección solamente frente a RHDV2, la protección cruzada contra el RHDV2 clásico no ha sido demostrada. Vacunar únicamente animales sanos. La vacunación es recomendada donde el RHDV2 es epidemiológicamente relevante. No mezclar con ningún otro medicamento veterinario. Precauciones específicas que debe tomar la persona que administre el medicamento veterinario a los animales: este medicamento veterinario contiene aceite mineral. Su inyección accidental/ autoinyección puede provocar dolor agudo e inflamación, en particular si se inyecta en una articulación o en un dedo, y en casos excepcionales podría provocar la pérdida del dedo afectado si no se proporciona atención médica urgente. Conservar y transportar refrigerado (entre 2°C y 8°C). No congelar. Guardar el vial en la caja de cartón para proteger de la luz. Usar el producto inmediatamente después de su apertura. Todo medicamento veterinario no utilizado o los residuos derivados del mismo deberán eliminarse de conformidad con las normativas locales. Mantener fuera de la vista y el alcance de los niños. **INFORMACIÓN ADICIONAL:** Inicio de la inmunidad: 1 semana. Duración de la inmunidad: 12 meses demostrado por infección experimental. Gestación: Los estudios de laboratorio en conejas gestantes en el último tercio de gestación no han producido ninguna evidencia de efectos teratogénicos, fetotóxicos y maternotóxicos. Las conejas preñadas deben manejarse con especial cuidado para evitar el estrés y el riesgo de aborto. **ENVASE:** 10 frascos de 1 dosis, 1 frasco de 10 dosis, 1 frasco de 40 dosis. **NÚMERO(S) DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN:** EU/2/16/199/001-002-003. **TITULACIÓN DE LA AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN:** Laboratorios Hipra S.A. Avda. la Selva, 135, 17170 Amer (Girona), ESPAÑA. Medicamento sujeto a prescripción veterinaria. Utilice los medicamentos de forma responsable.

LIBRO DE ACTAS

46 SYMPOSIUM DE CUNICULTURA DE ASESCU

Pineda de Mar, 1 y 2 de junio de 2022

COORDINADORES:

Juan José Pascual Amorós
Mariam Pascual Amorós
Miriam Piles Rovira
Juan Pablo Sánchez Serrano
Raquel Quintanilla Aguado
Ceferino Torres Lozano
Anna Oliveres Tortosa
Pedro González Redondo

ORGANIZAN:



PATROCINAN:



El 46 Symposium de Cunicultura de ASESCU se celebró en l'Auditori de Pineda de Mar los días 1 y 2 de junio de 2022

El simposio fue organizado por:

Asociación Española de Cunicultura (ASESCU)

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural (DACC) de la Generalitat de Catalunya

Contó con el patrocinio de las siguientes empresas y organizaciones:

Coren

Gómez y Crespo

Hermi

Intercun

Laboratorios Hipra

Contó con la colaboración de las siguientes empresas:

Andrés Pintaluba

De Heus

Ebronatura

Elanco

Exopol

Hycote

Inserbo

Mevirsa

MSD

Nanta

SP Veterinaria

Comité organizador:

Juan José Pascual Amorós

Mariam Pascual Amorós

Miriam Piles Rovira

Juan Pablo Sánchez Serrano

Raquel Quintanilla Aguado

Ceferino Torres Lozano

Anna Oliveres Tortosa

Montserrat Álamos López

María Josep de Ribot

Pedro González Redondo

Comité científico:

Juan José Pascual Amorós

Mariam Pascual Amorós

Miriam Piles Rovira

Juan Pablo Sánchez Serrano

Raquel Quintanilla Aguado

Ceferino Torres Lozano

Pedro González Redondo

Los coordinadores de este libro de actas fueron:

Juan José Pascual Amorós

Mariam Pascual Amorós

Miriam Piles Rovira

Juan Pablo Sánchez Serrano

Raquel Quintanilla Aguado

Ceferino Torres Lozano

Anna Oliveres Tortosa

Pedro González Redondo

Edita: Editorial Agrícola Española, S.A.

C/ Caballero de Gracia, 24 3º Izda.

28013 Madrid

Edición, diseño y maquetación: Grupo Editorial Agrícola Española S.A.

ISBN: 978-84-17884-20-8

Depósito Legal: M-14547-2022

PROGRAMA

PROGRAMA 46 SYMPOSIUM DE CUNICULTURA

Pineda de Mar, 1 y 2 de junio de 2022

L'Auditori

Miércoles, 1 de junio

Mañana

8:00 – 9:00 Acreditación y entrega de documentación.

9:00 – 9:30 Inauguración del Symposium.

Sr. D. Xavier Amor i Martín. *Alcalde de Pineda de Mar*

Sra. D^a. Elisenda Guillaumes Cullèll. *Directora General d'Agricultura i Ramaderia del Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural de la Generalitat de Catalunya*

Sr. D. Josep Usall i Rodié. *Director del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)*

Sr. D. Juan José Pascual Amorós. *Presidente de la Asociación Española de Cunicultura (ASESCU)*

9:30 – 10:15 **Ponencia: "Tendencias en el mercado de productos cárnicos: implicaciones para el sector cunícola"**. D. José M^a Gil Roig. *Centre de Recerca en Economia i Desenvolupament Agroalimentari-Universitat Politècnica de Catalunya (CREDA-UPC)*

[Presenta: D. Juan Pablo Sánchez]

10:15 – 11:15 Comunicaciones libres: GENÉTICA

[Modera: D. Juan Pablo Sánchez]

Selección por variabilidad ambiental del tamaño de camada. I: Curvas de supervivencia

Agea I, Hadjadj I, García ML, Argente MJ

Selección por variabilidad ambiental del tamaño de camada. II: Emisividad de la temperatura corporal

Agea I, Hadjadj I, García ML, Argente MJ

Regiones genómicas del conejo de carne implicadas en la variación de su microbiota cecal

Velasco-Galilea M, Buitenhuis B, Ramayo-Caldas Y, Ballester M, Piles M, Sánchez JP

Caracterización del comportamiento alimentario en animales racionados y alimentados a voluntad

Piles M, Pascual M, Mora M, Sánchez JP

11:15 – 11:45 Pausa para café y sesión de pósters.

11:45 – 12:30 **Ponencia: “La Cunicultura en Catalunya”.** D^a Jordina Casas i Cantó y D. Ricard Garriga Baraut.
Federació d’Associacions de Cunicultors de Catalunya (FACC)

[Presenta: D. Enrique Blas]

12:30 – 14:00 Comunicaciones libres: NUTRICIÓN

[Modera: D. Enrique Blas]

Efecto del nivel de arginina en el pienso sobre el rendimiento productivo durante el cebo en dos líneas genéticas

Peixoto-Gonçalves C, Sancho FJ, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Moya J, Blas E, Cambra-López M, Pascual JJ

Suplementación de xilanas en dietas de conejos en crecimiento: Efecto sobre las energías digestible y metabolizable aparentes

Cambra-López M, López MC, Martínez-Paredes E, Pascual JJ, Blas E

Estudio in vitro de la digestibilidad y la fermentabilidad de 19 productos de macroalgas marinas en conejos

Buján M, Muiños A, Mirás M, Torres S, Domínguez H, Torres MD, Flórez N, del Pozo R, Núñez C, de Evan T, Jiménez R, Al-Soufi Novo S, López M, Villamide MJ, Carabaño R, Nicodemus N, Carro MD, García J

Efecto del tipo de fibra sobre los rendimientos productivos de gazapos

Cegarra E, Sevilla L, Carabaño R, García J, Nicodemus N

Efecto de la suplementación con xilooligosacáridos en el agua de bebida y la restricción alimenticia sobre la digestibilidad fecal aparente y el balance mineral en conejos en cebo

Farias-Kovac C, Nicodemus, Carabaño R, García J

14:00 – 16:00 Comida de trabajo. Hotel Promenade

Tarde

16:00 – 17:00 Comunicaciones libres: REPRODUCCIÓN

[Modera: D. Juan José Pascual]

Rendimiento reproductivo de las conejas de líneas paternas: reconciliando crecimiento y resiliencia

Peixoto-Gonçalves C, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Blas E, Cambra-López M, Pascual JJ

Renovación de grupos completos de reproductoras y utilización de multiparas como reposición ocasional: Resultados reproductivos y de mortalidad

López M, Campo MM, Olleta JL, Campanales M, Resconi VC

Inducción de ovulación de conejas con rrβNGF microencapsulado

Quiroga AC, García-García RM, Arias-Álvarez M, Gimeno-Martos S, Lorenzo PL, Rebollar PG

Inseminación Artificial como alternativa reproductiva para la cunicultura dominicana: Valoración técnica y económica en granja de conejos (*Oryctolagus cuniculus*), bajo condiciones comerciales

Durán M, Choque J, Ariztegui M, Guzman N

17:00 – 17:30 Pausa para café y sesión de pósteres.

17:30 – 19:30 **Mesa Redonda: “Alojamiento y bienestar: ¿qué nos va a demandar la legislación y sociedad europea?”**

D^a Angela Trocino. *Universidad de Padua (Italia)*

D. Luc Maertens. *Flanders Research Institute for Agriculture, Fisheries and Food (ILVO, Bélgica)*

D^a Arantxa Villagrà García. *Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA-IVIA)*

D^a Montserrat Àlamos López. *Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural (DACC). Generalitat de Catalunya*

D^a María Luz de Santos Martín. *Directora-Gerente de Intercun*

[Modera: D. Juan José Pascual]

21:00 Cena de Gala. Restaurante Pura Brasa

Jueves, 2 de junio

9:00 – 10:00 Asamblea General de ASESCU.

10:00 – 10:45 **Ponencia: "Cuánto contamina una granja de conejos"**. D. Salvador Calvet Sanz. *Universitat Politècnica de València (UPV)*

[Presenta: D. Juan Manuel Corpa]

10:45 – 11:15 Pausa para café y sesión de pósteres.

11:15 – 12:45 Comunicaciones libres: PATOLOGÍA Y BIENESTAR

[Modera: D. Juan Manuel Corpa]

Eficacia de diferentes planes de vacunación frente a mixomatosis

Ramírez-Oliveras S, Baratelli M, Pedrola-Garrido, P, Fontseca-Presta M, Gascon S

Presentación de proyecto de investigación en estafilococia: pasado, presente y futuro

Mascarós-Núñez P, Martínez-Seijas C, Arnau A, Selva Martínez L, Viana D, Corpa JM

Epidemiología molecular y evolución de *Staphylococcus aureus*: resultados preliminares

Martínez Seijas C, Mascarós Núñez P, Arnau A, Selva Martínez L, Viana Martín D, Corpa Arenas JM

Estudio de la evolución de la sensibilidad antibiótica de los principales patógenos bacterianos en cunicultura de 2019 a 2021

del Caso S, Sanz C, Domínguez L, Chacón L

Efecto de diferentes técnicas de manejo como alternativa al uso de antibióticos sobre parámetros de estrés en conejos de cebo

Ramón-Moragues A, Carulla P, Gonçalves C, Escribano D, Torres R, Romero T, Martínez-Paredes E, Villagrà A

Efecto del enriquecimiento con bloques de heno y de la diferenciación de grupo por sexo sobre parámetros productivos, uso del espacio y resultados al sacrificio en conejos de engorde alojados en parques

Birolo M, Xiccatto G, Zuffellato A, Pirrone F, Bordignon F, Trocino A

12:45 – 13:30 **Ponencia: "Uso prudente de antibióticos en cunicultura. Un trabajo bien hecho"**. D. Manuel

Marco Laguna. *Presidente de la Asociación de Veterinarios Especializados en Cunicultura (AVECU)*

[Presenta: D^a Mercè Soler]

13:30 – 14:00 Clausura del Symposium.

Sra. D^a Sonia Moraleda Campayo. *Regidora de Comerç, Turisme i Mercats. Ajuntament de Pineda de Mar*

Sr. D. Joan Gòdia i Tresánchez. *Director General d'Empreses Agroalimentàries, Qualitat i Gastronomia del Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural de la Generalitat de Catalunya*

Sra. D^a Mariam Pascual Amorós. *Subprograma de Mejora y Genética Animal del IRTA*

Sr. D. Juan José Pascual Amorós. *Presidente de ASESCU*

PÓSTERES:

Línea FESC. Parámetros tras 28 años de su creación

Chino-Rosario E, Gutiérrez-Hernández E

Efeitos de uma restrição alimentar sobre digestibilidade da dieta em coelhos no final do período de engorda

Ribeiro J, Andrade E, Monteiro D, Pinheiro V

Caracterización de exosomas en el plasma seminal de conejos fértiles y subfértiles: resultados preliminares

Sakr OG, Cañón-Beltrán K, Cajas YN, Rizos D, Rebollar PG

Los diferentes tipos de vacunas frente a RHDV-2 producen un diferente inicio en la respuesta de anticuerpos

Ramirez-Oliveras S, Baratelli M, Pedrola-Garrido, P, Fontseca-Presta M, Gascon S

Evaluación de la eficacia de ERAVAC® contra una cepa de la enfermedad hemorrágica del conejo tipo 2 (RHDV2) aislada en Francia en 2020

Perozo E, Montbrau C, Fontseca M, Gascon S

Biossegurança nas cuniculturas do norte de Portugal: Presente e Futuro

Morais, D, Coelho A, Pinheiro V, Monteiro, J

Biossegurança como ferramenta preventiva da colibacilose em coelhos

Morais, D, Coelho A, Pinheiro V, Monteiro, J

ÍNDICE

Programa del Symposium.....	5
Presentación del Presidente de ASESCU	13

PONENCIAS

¿Cuánto contamina una granja de conejos?

Calvet S, Estellés F	16
----------------------------	----

Uso prudente de antibióticos en cunicultura. Un trabajo bien hecho.

Marco Laguna, Manuel; Mora, F. Xavier; resto de asociados de AVECU.....	19
---	----

Sesión de GENÉTICA

Selección por variabilidad ambiental del tamaño de camada. I: Curvas de supervivencia.

Agea I, Hadjadj I, García ML, Argente MJ	22
--	----

Selección por variabilidad ambiental del tamaño de camada. II: Emisividad de la temperatura corporal.

Agea I, Hadjadj I, García ML, Argente MJ	27
--	----

Regiones genómicas del conejo de carne implicadas en la variación de su microbiota cecal.

Velasco-Galilea M, Buitenhuis B, Ramayo-Caldas Y, Ballester M, Piles M, Sánchez JP.....	32
--	----

Caracterización del comportamiento alimentario en animales racionados y alimentados a voluntad.

Piles M, Pascual M, Mora M, Sánchez JP	37
--	----

Línea FESC. Parámetros tras 28 años de su creación.
Chino E, Gutiérrez E.....42

Sesión de NUTRICIÓN

Efecto del nivel de arginina en el pienso sobre el rendimiento productivo durante el cebo en dos líneas genéticas.
Peixoto-Gonçalves C, Sancho FJ, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Moya J, Blas E,
Cambra-López M, Pascual JJ48

Suplementación de xilanasa en dietas de conejos en crecimiento: Efecto sobre las energías digerible y metabolizable aparentes.
Cambra-López M, López MC, Martínez-Paredes E, Pascual JJ, Blas E53

Estudio *in vitro* de la digestibilidad y la fermentabilidad de 19 productos de macroalgas marinas en conejos.
Buján M, Muiños A, Mirás M, Torres S, Domínguez H, Torres MD, Flórez N, del Pozo R, Núñez C, de Evan T,
Jiménez R, Al-Soufi Novo S, López M, Villamide MJ, Carabaño R, Nicodemus N, Carro MD, García J58

Efecto del tipo de fibra sobre los rendimientos productivos en gazapos.
Cegarra E, Sevilla L, Nicodemus N, García J.....64

Efecto de la suplementación con xilooligosacáridos en el agua de bebida y la restricción alimenticia sobre la digestibilidad fecal aparente y el balance mineral en conejos en cebo.
Farias-Kovac C, Nicodemus, Carabaño R, García J70

Efeitos de uma restrição alimentar sobre digestibilidade da dieta em coelhos no final do período de engorda.
Ribeiro J, Andrade E, Monteiro D, Pinheiro V75

Sesión de REPRODUCCIÓN

Rendimiento reproductivo de las conejas de líneas paternas: reconciliando crecimiento y resiliencia.
Peixoto-Gonçalves C, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Blas E, Cambra-López M, Pascual JJ.....80

Renovación de grupos completos de reproductoras y utilización de multiparas como reposición ocasional: Resultados reproductivos y de mortalidad.
López M, Campo MM, Olleta JL, Campanales M, Resconi VC.....85

Inducción de ovulación de conejas con rrβNGF microencapsulado.	
Quiroga AC, García-García RM, Arias-Álvarez M, Gimeno-Martos S, Lorenzo PL, Rebollar PG.....	90
Caracterización de exosomas en el plasma seminal de conejos fértiles y subfértiles: resultados preliminares.	
Sakr OG, Cañón-Beltrán K, Cajas YN, Rizos D, Rebollar PG	95
Inseminación Artificial como alternativa reproductiva para la cunicultura dominicana: Valoración técnica y económica en granja de conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>), bajo condiciones comerciales.	
Durán M, Choque J, Ariztegui M, Guzman N	100
 Sesión de PATOLOGÍA Y BIENESTAR	
Eficacia de diferentes planes de vacunación frente a mixomatosis.	
Ramirez-Oliveras S, Baratelli M, Pedrola-Garrido, P, Fontseca-Presta M, Gascon S.....	106
Presentación de proyecto de investigación en estafilococia: pasado, presente y futuro.	
Mascarós-Núñez P, Martínez-Seijas C, Arnau A, Selva Martínez L, Viana D, Corpa JM	109
Epidemiología molecular y evolución de <i>Staphylococcus aureus</i>: resultados preliminares.	
Martínez Seijas C, Mascarós Núñez P, Arnau A, Selva Martínez L, Viana Martín D, Corpa Arenas JM.....	113
Estudio de la evolución de la sensibilidad antibiótica de los principales patógenos bacterianos en cunicultura de 2019 a 2021.	
del Caso S, Sanz C, Domínguez L, Chacón L.....	118
Efecto de diferentes técnicas de manejo como alternativa al uso de antibióticos sobre parámetros de estrés en conejos de cebo.	
Ramón-Moragues A, Carulla P, Gonçalves C, Escribano D, Torres R, Romero T, Martínez-Paredes E, Villagrà A	123
Efecto del enriquecimiento con bloques de heno y de la diferenciación de grupo por sexo sobre parámetros productivos, uso del espacio y resultados al sacrificio en conejos de engorde alojados en parques.	
Birolo M, Xiccato G, Zuffellato A, Pirrone F, Bordignon F, Trocino A.....	128
Los diferentes tipos de vacunas frente a RHDV-2 producen un diferente inicio en la respuesta de anticuerpos.	
Ramirez-Oliveras S, Baratelli M, Pedrola-Garrido, P, Fontseca-Presta M, Gascon S.....	133

Evaluación de la eficacia de ERAVAC® contra una cepa de la enfermedad hemorrágica del conejo tipo 2 (RHDV2) aislada en Francia en 2020. Perozo E, Montbrau C, Fontseca M, Gascon S	136
Biossegurança nas cuniculturas do norte de Portugal: Presente e Futuro. Morais, D, Coelho A, Pinheiro V, Monteiro, J	138
Biossegurança como ferramenta preventiva da colibacilose em coelhos. Morais, D, Coelho A, Pinheiro V, Monteiro, J	142

Presentación del Presidente de ASESCU

Estimados socios de ASESCU y asistentes al *Symposium*,

Tras dos años sin poder juntarnos presencialmente, debido a las limitaciones asociadas a la pandemia, este año tenemos la suerte de celebrar la 46 edición del *Symposium* de Cunicultura de ASESCU en Pineda de Mar (Barcelona). Hemos querido en esta ocasión acercarnos a Catalunya, una de las regiones más importantes de nuestra producción cunícola, eligiendo como sede un precioso municipio costero de la comarca de El Maresme, rodeado por el parque Natural del Montnegre y el Corredor, donde dispondremos de un ambiente acogedor, provechoso y seguro.

Para poder celebrar dicho congreso hemos podido contar en esta ocasión con el Programa de Genética y Mejora Animal del IRTA, y el Departamento de Acción Climática, Alimentación y Agenda Rural (DACC) de la Generalitat de Catalunya como coorganizadores locales, a los cuales quisiera mostrar todo mi agradecimiento, al igual que a los organizadores habituales, por su implicación en el buen desarrollo del *Symposium*.

Estamos viviendo quizás una de las épocas más críticas que he conocido para la ganadería y en especial para la cunicultura. Está coincidiendo una serie de circunstancias en el tiempo que están poniendo en jaque al sector. La situación actual de precios de la energía y materias primas, y la preocupante tendencia en el consumo de carne de conejo, está suponiendo una prueba de estrés para todo un sector, que además debe afrontar nuevos retos y exigencias a nivel medioambiental, de alojamientos y en la utilización de antimicrobianos en sus granjas.

Por todo ello, el *Symposium* de este año lo hemos querido centrar justamente en todos estos desafíos que nos preocupan y debemos afrontar. Para ello, hemos invitado a expertos ponentes que nos informarán sobre el estado actual de la cunicultura en Catalunya y las tendencias de consumo en el mercado de los productos cárnicos. Por otro lado, celebraremos una mesa redonda, donde INTERCUN y distintos expertos de Italia, Bélgica y España, debatiremos sobre qué nos va a demandar y qué consecuencias va a tener las demandas en legislación en bienestar de la sociedad europea. Además, ponentes especialistas nos tratarán de explicar cuánto contamina una granja de conejos y qué consecuencias está teniendo la implantación de la normativa de utilización de medicamentos en las granjas. Así, este evento es crucial para congregar a productores, investigadores y empresas relacionadas con el sector cunícola, y así afrontar exitosamente cada uno de estos desafíos.

Además de estas ponencias invitadas también tendremos, a lo largo de *Symposium*, sesiones de comunicaciones libres donde se presentarán los avances en investigaciones realizadas por diferentes grupos en las disciplinas científicas más relevantes para el sector, como son el bienestar, la nutrición, la genética, la reproducción y la salud animal. Los mejores trabajos, llevados a cabo por los más jóvenes, podrán acceder a la cuarta edición del "Premio para jóvenes investigadores ASESCU", financiado por Andrés Pinaluba, S.A., que se entregará durante la cena de gala.

No quisiera despedirme sin antes mostrar todo mi agradecimiento a las empresas que apoyan la organización del *Symposium* y sin cuyo patrocinio sería difícil la celebración de este evento.

Atentamente,

Juan José Pascual Amorós
Presidente de ASESCU

PONENCIAS

¿Cuánto contamina una granja de conejos?

Calvet S, Estellés F

Uso prudente de antibióticos en cunicultura. Un trabajo bien hecho

Marco Laguna, Manuel; Mora, F. Xavier; resto de asociados de AVECU

¿Cuánto contamina una granja de conejos?

How much pollution comes from a rabbit farm

Calvet S*, Estellés F

Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València. 46022 Valencia, España.

**salcalsa@upvnet.upv.es*

Resumen

La producción ganadera supone, como otras actividades humanas, una serie de impactos sobre el medio ambiente que es necesario minimizar. En particular, tiene gran afección sobre los ciclos globales de nutrientes y sobre las emisiones atmosféricas. La producción cunícola, por su envergadura, tiene una contribución relativamente menor a estos impactos. Sin embargo, y a pesar de que la presión normativa es de momento inferior a la de otros sectores ganaderos, es necesario mejorar progresivamente la eficiencia y reducir dichos impactos para contribuir a una menor afección ambiental de las actividades humanas. Adicionalmente, las particularidades de la cunicultura pueden posicionarla como una producción alternativa frente al uso de materias primas y mitigación de emisiones, que en otro tipo de granjas presenta mayores dificultades. Esta ponencia repasa las principales oportunidades al respecto.

Palabras clave: emisiones, gases, nitratos, estiércol, economía circular.

Abstract

Similar to other human activities, livestock production involves the risk of several environmental impacts that has to be minimized. Particularly, global livestock production affects global nutrient cycles and atmospheric emissions. The rabbit production sector has a comparatively minor size related to other sectors. However it is necessary to improve the efficiency and reduce their impacts, contributing to a minor environmental damage. Additionally, rabbit production has some particularities that may place this sector as an alternative regarding the use of raw materials and emission mitigation, which may be more difficult in other sectors. This contribution summarizes some of the main opportunities for the rabbit sector.

Keywords: emissions, gases, nitrates, manure, circular economy.

Introducción

La producción ganadera, como otras actividades humanas, supone una serie de impactos sobre el medio ambiente. Algunos de ellos se generan directamente en la granja, como por ejemplo las emisiones de gases. Otros pueden generarse en su entorno próximo, por ejemplo, el riesgo de contaminación del agua subterránea en caso de aplicación inadecuada de estiércoles. Adicionalmente, otros impactos se generan de forma indirecta, por ejemplo los asociados a la fabricación de los piensos.

Más allá de la controversia sobre el papel ambiental de las granjas, es necesario reconocer que la producción ganadera contribuye a una enorme presión ambiental que ejercen las actividades humanas sobre nuestro entorno. Dicha presión compromete no sólo la preservación de los ecosistemas, sino también la viabilidad de las actividades humanas tal como las conocemos. Es fundamental por tanto que cada sector conozca cuál es su contribución a dichos impactos y compatibilice la necesaria reducción de los mismos con el valor productivo: en

el caso de la ganadería, la producción de alimentos de alto valor, la fijación de población en el medio rural, el reciclaje de nutrientes o el mantenimiento de ecosistemas.

Cuantificar los impactos ambientales en ganadería

Es importante cuantificar estas emisiones y reconocer su contribución al impacto global de la actividad humana. La producción ganadera es responsable de cerca de un 70% de las emisiones nacionales de amoníaco, mientras que contribuye aproximadamente a un 7% de las emisiones de gases efecto invernadero producidas en España. La situación de las aguas subterráneas en nuestro país sigue deteriorándose debido a la contaminación por nitratos procedentes de fuentes agrarias (fertilizantes sintéticos y orgánicos, principalmente), lo cual ha merecido la reciente actualización normativa en el Real Decreto 47/2022. Finalmente, la producción de piensos para la ganadería supone, en su conjunto, un importante estrés ambiental por el uso de superficies agrarias (a veces asociadas a deforestación) y por la gran afección al ciclo del nitrógeno.

La producción ganadera ha mejorado su eficiencia productiva de forma considerable, debido a mejoras en genética, alimentación, sanidad e instalaciones. Esta mejora en la eficiencia hace de la ganadería española una de las más eficientes a nivel global. Sin embargo, la eficiencia por sí sola no está siendo suficiente para reducir las afecciones ambientales. Los incrementos de producción y la concentración ganadera están ocasionando que el valor absoluto de emisiones apenas se esté reduciendo, comprometiendo por tanto los objetivos de preservación ambiental acordados internacionalmente.

Cuantificar los impactos de la producción ganadera no es sencillo, al ser sistemas complejos e interconectados con el resto de la cadena agroalimentaria. El concepto de huella de carbono permite cuantificar las emisiones asociadas a una unidad de producto, durante toda la cadena de producción. De estos análisis se extrae que la mayor parte de la huella de carbono en rumiantes está asociada a la fermentación digestiva en la propia granja, mientras que en monogástricos (aves y porcino) la mayor componente de esta huella procede de la fabricación de los piensos y no de la propia granja. De forma similar se conoce el concepto de huella hídrica, distinguiéndose por su grado de afección entre el agua verde (de lluvia), azul ("de grifo") y gris (agua contaminada por la actividad). El uso del suelo y la competencia con la alimentación humana son otros dos conceptos muy relacionados, pues determinan el coste de oportunidad de la ganadería. Es necesario en este punto distinguir entre aquellos usos del suelo e ingredientes para piensos que pueden competir con la alimentación humana, y aquellos que no tienen dicha competencia. Esta distinción es fundamental para valorar correctamente el impacto ambiental de una determinada producción.

Las granjas de conejos, ¿mejores o peores?

La producción cunícola origina menores afecciones que otros sectores simplemente por una cuestión de magnitud: los censos nacionales son muy inferiores a los de otras especies, y por tanto sus impactos ambientales son también menores. Es importante resaltar que para los principales sectores productivos se está actualizando la normativa sectorial (porcino en 2020, avicultura en 2021 y bovino previsto para 2022). Estas revisiones están incluyendo una importante componente ambiental, por ejemplo estableciendo ambiciosos porcentajes de reducción de emisiones basados en la aplicación de las mejores técnicas disponibles.

Aunque de momento esto no va a contemplarse para la producción cunícola, sí que marca las líneas de acción de cómo será la ganadería en un futuro: no sólo deberá producir alimentos de calidad con un gran nivel de bioseguridad y bienestar, sino que también deberá hacerlo conociendo el nivel de sus impactos ambientales (consumos, emisiones y estiércoles). ¿Qué ocurre en una granja de conejos?

Pongamos por caso una granja de 500 conejas y el correspondiente cebo. Las excreciones de dicha granja suponen unos 5000 kg de nitrógeno y unos 1000 kg de fósforo cada año, nutrientes con un valor creciente en la coyuntura económica actual. Adicionalmente, supone unas 50 toneladas de materia. En condiciones normales de granja, prácticamente la tercera parte del nitrógeno excretado se volatiliza como amoníaco en el propio alojamiento y durante la gestión del estiércol hasta su aplicación a campo. Estas pérdidas no solo suponen un importante impacto ambiental, sino que además son una pérdida de recursos. La gestión del estiércol de esta granja supone además cerca de 6 toneladas de CO₂ equivalente. En términos absolutos, dicha emisión sería equivalente aproximadamente al de una granja de 400 cerdos.

Conocer los números es importante para establecer estrategias de mejora. Sin embargo. ¿Es importante saber si contamina más criar conejos que cerdos o pollos? Consideramos que la respuesta es no. En primer lugar

porque otros sectores tienen mayores niveles de eficiencia en el uso de la alimentación, y por tanto sus índices ambientales (al menos los más utilizados actualmente) saldrán mejores por cada kg de producto. En este punto, es necesario remarcar que la producción cunícola puede tener una serie de puntos diferenciadores con otras especies, que permita posicionarse en el ámbito de la minimización de impactos ambientales. Algunos de ellos se repasan en el próximo apartado.

Oportunidades

La producción cunícola tiene un importante recorrido en incrementar el uso de ingredientes para sus piensos que no compitan con la alimentación humana. Cada vez son más las voces que abogan por no utilizar índices brutos de contaminación ambiental, sino ligarlos al beneficio real. Por ejemplo, se puede usar como indicador la cantidad de proteína producida por cada kg de ingredientes que compiten con la alimentación humana, o por cada m² de cultivo utilizado para producir un determinado pienso. En este sentido, la producción cunícola tiene ventajas comparativas con las producciones de monogástricos más intensivas, pues estas son eficientes normalmente a costa de utilizar materias primas nobles procedentes de tierras expresamente cultivadas para tal fin.

Una segunda ventaja comparativa viene del lado de la adaptación de mejoras ya existentes en otras especies, por ejemplo en cuestión de mejora genética o instalaciones. A modo de ejemplo, las instalaciones de retirada del estiércol en granjas de conejos permiten adaptarlas fácilmente a los criterios de retirada frecuente del estiércol, que reducen considerablemente las emisiones gaseosas en el interior de las naves. Finalmente, y más en el contexto económico actual, es necesario valorizar económicamente los estiércoles.

Uso prudente de antibióticos en cunicultura. Un trabajo bien hecho

Prudent use of antibiotics in rabbit farming, a well-done task

Marco Laguna, Manuel¹*; Mora, F. Xavier²; resto de asociados de AVECU

¹Ponente. Presidente de la Asociación de Veterinarios Especializados en Cunicultura (AVECU). Masía Ca L'Ermita s/n, 08410 Vilanova del Valles (Barcelona).

²AVECU, asvetxm@gmail.com

*manuel_marco64@hotmail.com

Resumen

En abril de 2017 los veterinarios de cunicultura -conscientes del problema de las resistencias bacterianas a los antibióticos- inician contactos con la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos) para trazar un plan lógico pero efectivo que permita disminuir la presión antibiótica en las granjas. Como herramienta, se pone en marcha el acuerdo ARAC (dentro del programa Reduce) entre la AEMPS y AVECU (Asociación de Veterinarios Especializados en Cunicultura) que traza las líneas para disminuir un 30% en dos años el uso de antimicrobianos en esta especie y establecer "Colistina cero" en piensos medicamentosos. A fecha de hoy, hemos conseguido una reducción de uso antibiótico de más de un 55% expresada en mg de atbc/PCU y seguimos disminuyendo.

Con la entrada en vigor del Reglamento (UE) 2019/4 a fecha 28 de enero de 2022 trabajamos ya sólo con una molécula en los engordes y nos hemos trazado unos nuevos objetivos de empleo antibiótico alineados con el *Green Deal*. Consisten en conseguir una presión antibiótica máxima de 350 mg/PCU vía pienso medicado en 2025 así como "Enrofloxacin cero" a esa misma fecha. No sólo los veterinarios sino también INTERCÚN y todas y cada una de las granjas de conejos están totalmente implicados en este proyecto. Un proyecto que no es gratis sino que requiere de fuertes inversiones por parte de los cunicultores y asumir mayor número de bajas en un momento de rentabilidad muy baja. Nuestro objetivo es ambicioso. Necesitará de nuevo un gran esfuerzo por parte del sector y de sus técnicos así como también precisaremos una ayuda extra por parte de la AEMPS y el MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Hemos demostrado que "sabemos hacer nuestros deberes"; todo el apoyo de la Administración a nuestro trabajo es bienvenido.

Palabras clave: AVECU, Antibióticos, Cunicultura, Reducción, Objetivo.

Abstract

In April 2017, rabbit farming veterinarians -aware of the problem of bacterial resistance to antibiotics- began contacting the AEMPS (Spanish Medicines Agency) to draw a logical but effective plan that would reduce antibiotic pressure on farms. As a tool, the ARAC agreement (within the Reduce program) between the AEMPS and AVECU (Rabbit farming Veterinarian Specialized Association) is launched. ARAC draws the lines to reduce the use of antimicrobials in rabbit farming by 30% in two years and establish "Colistin zero" in medicated feed. Today, we have achieved a reduction in antibiotic use of more than 55% expressed in mg of atbc/PCU and we continue to decrease.

With Regulation (EU) 2019/4 in force on January 28th, 2022, we are now working with only one molecule in fattening and we have set new objectives for antibiotic use in line with the *Green Deal*. They consist of achieving a maximum antibiotic pressure of 350 mg/PCU on medicated feed in 2025 as well as "Zero Enrofloxacin" at same date. Not only the veterinarians but also INTERCÚN and each and every one of the rabbit farmers are fully involved in this project. A project that is not free but requires strong investments by rabbit farmers and assume a

greater number of mortality at a time of very low profitability. Our goal is ambitious. It will again require a great effort from the sector and its technicians, as well as extra help from the AEMPS and MAPA (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). We have shown that "we know how to do our homework"; all the support of the Administration to our work are welcome.

Keywords: AVECU, Antibiotics, Rabbits, Reduction, Goal.

GENÉTICA

Selección por variabilidad ambiental del tamaño de camada.

I: Curvas de supervivencia

Agea I, Hadjadj I, García ML, Argente MJ

Selección por variabilidad ambiental del tamaño de camada.

II: Emisividad de la temperatura corporal

Agea I, Hadjadj I, García ML, Argente MJ

**Regiones genómicas del conejo de carne implicadas en la
variación de su microbiota cecal**

Velasco-Galilea M, Buitenhuis B, Ramayo-Caldas Y, Ballester M, Piles M, Sánchez JP

**Caracterización del comportamiento alimentario en animales
racionados y alimentados a voluntad**

Piles M, Pascual M, Mora M, Sánchez JP

Línea FESC. Parámetros tras 28 años de su creación

Chino E, Gutiérrez E

Selección por variabilidad ambiental del tamaño de camada.

I: Curvas de supervivencia

Selection for environmental variability of litter size. I: Survival curves

Agea I, Hadjadj I, García ML*, Argente MJ

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández de Elche, 03312 Orihuela, España.

*mariluz.garcia@umh.es

Resumen

Se está llevando a cabo un experimento de selección divergente por variabilidad residual del tamaño de camada en conejo. El criterio de selección es la varianza fenotípica del tamaño de camada dentro de hembra después de ser corregido por los efectos fijos de año-estación y de estado de lactación. En trabajos previos, la línea seleccionada para reducir la variabilidad del tamaño de camada (Low) ha mostrado una menor sensibilidad a enfermar y al estrés que la línea heterogénea (High). El objetivo de este trabajo es comparar las curvas de supervivencia de las líneas en función del orden de parto en el que la hembra es eliminada o muere, así como estudiar sus causas de eliminación. En ambas líneas el 55% de las hembras alcanzan el tercer parto, pero mientras la línea Low presenta un mayor porcentaje de supervivencia en el segundo parto, en la línea High es en el primer parto. A partir del 4º parto el porcentaje de eliminación o muerte de la línea Low es menor que en la línea High. La distribución de las hembras de la línea Low en función de las causas de eliminación fue: 39% por final de generación, el 21% eliminadas por presentar alguna patología y el 40% muertas. En el caso de la línea High la distribución fue del 30%, 34% y 36% respectivamente. En conclusión, la selección divergente por variabilidad del tamaño de camada parece que ha modificado las curvas de supervivencia de las hembras, además la tasa de eliminación por final de generación es mayor en las hembras de la línea Low que en las hembras de la línea High.

Palabras clave: orden de parto, resiliencia, sensibilidad ambiental, supervivencia.

Abstract

A divergent selection experiment for litter size variability is being carried out in rabbits. The selection criterion is the phenotypic variance of litter size within the female, after correcting litter size for the effects of year-season, and physiological status. In previous studies, the line selected to decrease litter size variability (Low) has shown less sensitivity to disease and stress than the heterogenous lone (High). The objective of this work is to compare the survival curves of the lines according to the order of parturition in which the female is eliminated or dies, as well as to study its causes of elimination. From the 4th parturition, the percentage of elimination or death of the Low line is lower than in the High line. The distribution of the females of the Low line according to the causes of elimination was: 39% by end of generation, 21 % eliminated due to some pathology and 40% dead. The distribution was 30%, 34% and 36%, respectively, for the High line. In conclusion, the divergent selection for litter size variability seems to have modified the survival curves of the females. In addition, the elimination rate at the end of the generation is higher in the females of the Low line than in the females of the High line.

Keywords: environmental sensitivity, parity order, resilience, survival.

Introducción

El bienestar animal es una prioridad en ganadería. Tanto la robustez como la resiliencia son características individuales estrechamente relacionados con el bienestar. Knap (2005) definieron la robustez como la capacidad del animal para expresar su potencial de producción en una amplia gama de entornos sin comprometer la salud ni la reproducción del animal. Colditz y Hine (2016) definieron la resiliencia como la capacidad del animal para recuperarse y volver al estado en el que se encontraba antes de la exposición a una perturbación ambiental. En conejo la selección por longevidad parece ser una metodología eficiente para mejorar la robustez (Sánchez *et al.*, 2008; Theilgaard *et al.*, 2009) mientras que la selección por variabilidad del tamaño de camada se ha propuesto para mejorar a resiliencia (Blasco *et al.*, 2017).

Un experimento de selección divergente por variabilidad residual del tamaño de camada ha obtenido una respuesta a la selección de un 4,5% de la media de la variabilidad del tamaño de camada. La línea homogénea (Low) presenta mejor estado sanitario y resistencia a enfermedades (Argente *et al.*, 2019), debido a que presenta una menor susceptibilidad a enfermar y una menor respuesta inflamatoria antes infecciones (Beloumi *et al.*, 2020) que la línea heterogénea (High). Además, la productividad de la línea Low es superior a la línea High, presentando mayor tamaño de camada al parto y más uniformidad de peso de los gazapos al destete (Agea *et al.*, 2019).

El objetivo de este trabajo es estudiar las diferencias en supervivencia de las hembras de dos líneas seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada.

Material y métodos

Los procedimientos experimentales con animales han sido aprobados por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat Valenciana con código 2019/VSC/PEA/0017.

Los animales están localizados en la granja de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela de la Universidad Miguel Hernández. Las hembras de este estudio pertenecen a la generación 14 de dos líneas seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada (Blasco *et al.*, 2017). La línea Low está seleccionada para disminuir la variabilidad del tamaño de camada al parto y la línea High para incrementar dicha variabilidad. El tamaño de camada está corregido por los efectos fijos de año-estación y de estado de lactación.

Las instalaciones son de ambiente controlado, el fotoperiodo de 16:8 y la alimentación es *ad libitum* con pienso comercial. Las hembras entran en producción con 18-20 semanas de edad, las montas son semanales y el sistema reproductivo semi-intensivo (12 días postparto).

Se registró el orden parto en el que la hembra es eliminada o muere (último orden de parto), así como la causa por la que era retirada del rebaño: muerta, fin de generación o eliminada. Las hembras fueron revisadas sanitariamente en la monta y en la palpación, siendo causa de eliminación: abscesos, fetos momificados, mamitis, mocos, diarrea, mal de patas y causas reproductivas. Se considera causa reproductiva de eliminación cuando se producen 6 intentos de monta, 3 servicios negativos o 2 abortos.

La supervivencia de las hembras en función del orden de parto se analizó mediante curvas de Kaplan-Meier (GraphPad Prism 9). Se realizó una χ^2 para analizar el porcentaje de hembras muertas, eliminadas por causas sanitarias y eliminadas por fin de generación.

Resultados y discusión

La **Tabla 1** muestra la distribución de las hembras de las líneas homogénea (Low) y heterogénea (High) según el último orden de parto. En ambas líneas el 55% de las hembras alcanzan el tercer parto, pero mientras la línea Low presenta un mayor porcentaje de supervivencia en el segundo parto, en la línea High es en el primer parto. A partir del 4º parto el porcentaje de eliminación o muerte de la línea Low es menor que en la línea High. Así, un 18% de las hembras de la línea Low llegan a tener más de 6 partos y este porcentaje es de un 14% en la línea High.

Tabla 1. Distribución de las hembras de la línea Low y High según el último orden de parto.

OP	Low (%)	Low acumulado (%)	High (%)	High acumulado (%)
1	30	30	20	20
2	9	39	18	38
3	16	55	17	55
4	15	70	14	69
5	8	78	13	82
6	4	82	4	86
+6	18	100	14	100

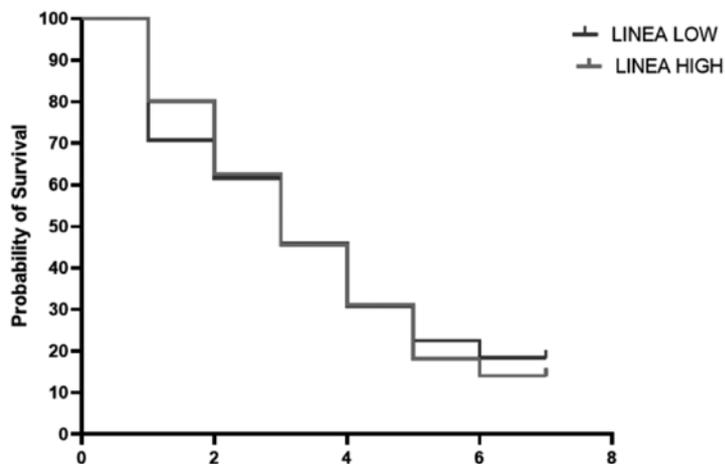


Figura 1. Curvas de supervivencia acumulada por orden de parto de las hembras de las líneas High y Low.

La **Figura 1** muestra las curvas de supervivencia por orden de parto de las hembras de las líneas Low y High. Se observa un mayor porcentaje de eliminación o muerte en las hembras de la línea Low en el primer parto y menor en el segundo parto que en la línea High. Agea et al. (2020) reportó resultados similares en la generación 12.

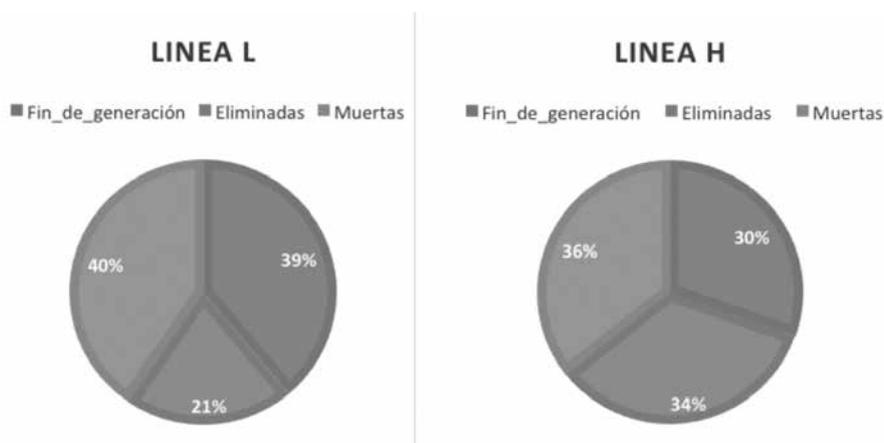


Figura 2. Distribución de las hembras de la línea Low y High en función de las causas de eliminación.

La distribución de las hembras de la línea Low en función de las causas de eliminación fue: 39% por final de generación, el 21% eliminadas por presentar alguna patología y el 40% muertas. En el caso de la línea High la distribución fue del 30%, 34% y 36% respectivamente ($\chi^2 = 15,6, p < 0,05$; **Figura 2**). Las patologías por las que fueron eliminadas las hembras se muestran en la **Tabla 2**. El 21% de las hembras de la línea High fueron eliminadas por presentar diarrea, siendo esta la causa más común junto con la presencia de mamitis, sin embargo, la

diarrea no fue causa de eliminación en las hembras de la línea Low. En esta línea las causas más frecuentes de eliminación fueron la presencia de abscesos, fetos momificados y mamicis.

Tabla 2. Distribución de las hembras de la línea Low y High según la causa de eliminación.

Causa	Low (%)	High (%)
Absceso	20	12
Feto momificado	20	16
Causas Reproductivas	12	8
Mamicis	20	20
Mocos	16	4
Diarrea	0	21
Mal de patas	12	19

El 32% de las hembras muertas de la línea Low se correspondían con problemas en el parto, mientras que en el caso de las hembras de la línea High este porcentaje asciende a un 52% (datos no mostrados en tablas). El porcentaje de hembras eliminadas por problemas durante el parto fue estudiado en la generación 7, encontrándose que el 44% de las hembras murieron o fueron eliminadas por problemas en los tres primeros partos en ambas líneas (García et al., 2019). En una generación posterior el porcentaje fue de un 26% para la línea Low y un 19% para la línea High (Argente et al., 2019).

En conclusión, la selección divergente por variabilidad del tamaño de camada podría haber modificado las curvas de supervivencia de las hembras, además las hembras de la línea Low son eliminadas por final de generación en mayor porcentaje que las hembras de la línea High.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MIC)-Agencia Estatal de Investigación (AEI) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa" con el AGL2017-86083-C2-2-P, y con el proyecto de la Conselleria Valenciana AICO/2019/169.

Bibliografía

- Agea I, García ML, Argente MJ. 2020. Estudio de supervivencia de dos líneas de conejo seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada al parto. En: I Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentario (CUIISA). Orihuela, Alicante, pp. 250-256.
- Agea I, García ML, Blasco A, Argente MJ. 2019. Litter survival differences between divergently selected lines for environmental sensitivity in rabbits. *Animals* 9: 203.
- Argente MJ, García ML, Zbynovská K, Petruska P, Capcarová M, Blasco A. 2019. Correlated response to selection for litter size environmental variability in rabbits' resilience. *Animal* 13:2348-2355.
- Beloumi D, Blasco A, Muelas R, Santacreu MA, García ML, Argente MJ. 2020. Inflammatory correlated response in two lines of rabbit selected divergently for litter size environmental variability. *Animals* 10: 1540.
- Blasco A, Martínez-Álvaro M, García ML, Ibañez-Escriche N, Argente MJ. 2017. Selection for environmental variance of litter size in rabbits. *Genet Sel Evol* 49: 48.
- Colditz I, Hine B. 2016. Resilience in farm animals: Biology, management, breeding and implications for animal welfare. *Anim Prod Sci* 25:37-41.
- García ML, Blasco A., García ME, Argente MJ. 2019. Correlated response in body condition and energy mobilisation in rabbits selected for litter size variability. *Animal* 13:784-789.

Knap PW. 2005. Breeding robust pigs. Aust J Exp Agric 45:763-773.

Sánchez JP, Theilgaard P, Minguez C, Baselga M. 2008. Constitution and evaluation of long-lived productive rabbit line. J Anim Sci 86:515-525.

Theilgaard P, Baselga M., Blas E, Friggens N, Cervera C, Pascual JJ. 2009. Differences in productive robustness in rabbits selected for reproductive longevity or litter size. Animal 3:637-646.

Selección por variabilidad ambiental del tamaño de camada.

II: Emisividad de la temperatura corporal

Selection for environmental litter size variability. II: Emissivity of body temperature

Agea I, Hadjadj I, García ML, Argente MJ*

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández de Elche, 03312 Orihuela, España.

*mj.argente@umh.es

Resumen

Se ha llevado a cabo un experimento de selección divergente por variabilidad residual del tamaño de camada en conejos durante 12 generaciones. El estrés provoca un aumento de la temperatura corporal basal. La termografía infrarroja (TIR) es una técnica útil para identificar cambios en la emisividad de la temperatura corporal. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta correlacionada a la selección para la variabilidad residual del tamaño de camada en la emisividad de la temperatura corporal del conejo. La monta puede considerarse un estímulo estresante para la hembra. La temperatura se midió en el globo ocular por TIR antes de la monta (temperatura basal) y después de 5 minutos, 30 minutos y 60 minutos en hembras de las líneas homogénea y heterogénea en tamaño de camada. Ambas líneas mostraron una temperatura basal similar (35,69°C línea homogénea vs 35,81°C línea heterogénea). La línea homogénea aumentó ligeramente la temperatura a los 5 minutos después del estímulo estresante (36,32°C), y este aumento se mantuvo hasta los 60 minutos (36,55°C). No hemos encontrado evidencia sobre diferencias de temperatura a los 5 minutos después de la monta entre líneas. Sin embargo, la línea heterogénea mostró una temperatura mayor que la línea homogénea a los 30 minutos (+0,96°C, $p = 0,99$). A los 60 minutos, la temperatura fue similar entre líneas. La evolución de la temperatura fue diferente entre líneas; ya que la línea heterogénea alcanzó el pico de temperatura más tarde que la línea homogénea (30 minutos vs 5 minutos), y su pico fue mayor en comparación con la homogénea (36,95°C vs 36,32°C). En conclusión, las hembras seleccionadas para reducir la variabilidad del tamaño de la camada mostraron un menor aumento de la temperatura después de un estímulo estresante, por lo tanto, su respuesta al estrés es menor y, en consecuencia, su bienestar es mayor.

Palabras clave: bienestar, estrés, temperatura, termografía, variabilidad ambiental.

Abstract

A divergent selection experiment for litter size residual variability has been carried out in rabbits during 12 generations. Stress causes an increase in body temperature. Infrared thermography (IRT) has been shown to be a useful technique for identifying changes in body temperature emissivity. The aim of this work was to study the correlated response to selection for litter size residual variability in body temperature emissivity at mating. Mating can be considered a stressful stimulus for doe. Temperature was measured in the eyeball by IRT before mating (basal temperature) and after 5 min, 30 min and 60 min in does from homogenous and heterogenous lines. Both lines showed similar basal temperature (35.69 °C in the homogenous line vs 35.81 °C in the heterogenous line). The homogenous line increased slightly temperature at 5 min after stressful stimulus (36.32 °C), and this increase remained up to 60 min (36.55 °C). We have not found evidence about temperature differences at 5 min after mating between lines. However, the heterogenous line showed a higher temperature than the homogenous line at 30 min (+0.96 °C, $p = 0.99$). At 60 min, temperature was similar between lines. The evolution of temperature was different between lines; since the heterogenous line reached the peak of temperature later than the homogenous line (30 min vs 5 min), and its peak was higher compared to the homogenous one (36.95 °C vs 36.32°C). In conclusion, the does selected for reducing litter size variability showed a lower increase in temperature after a stressful stimulus, therefore showing lower response to stress and consequently better welfare.

Keywords: environmental variability, stress, temperature, thermography, welfare.

Introducción

El bienestar del animal ha pasado a ser un objetivo prioritario para la industria ganadera y el consumidor. El bienestar animal está directamente relacionado con el estrés y la salud, y por tanto con la vida útil del animal (Rossell y de la Fuente, 2009). El estrés afecta a las poblaciones leucocitarias (Urbanova *et al.*, 2019), por lo que la relación neutrófilos-linfocitos se ha empleado para medir el estrés del animal de forma sencilla (Widowski *et al.*, 1989). También, los niveles de cortisol en sangre y sus metabolitos en heces, pelo y orina se han usado para medir este carácter (Mostl y Palme, 2002). Sin embargo, estas mediciones emplean procedimientos invasivos que pueden aumentar el estrés del animal y no ser útiles para cuantificarlo (Stewart *et al.*, 2005).

La termografía infrarroja (TIR) es una técnica aceptada para medir las pérdidas de calor corporal (Dela Ricci *et al.*, 2019). Esta técnica se ha utilizado para encontrar diferencias en la emisividad de la temperatura corporal en ojos, oídos y nariz en conejos bajo estrés (de Lima *et al.*, 2013). La técnica TIR tiene la ventaja de ser rápida, no invasiva y requiere un manejo mínimo del animal (Stewart *et al.*, 2005). Una temperatura corporal más alta en el conejo se ha relacionado con un mayor nivel de metabolitos de cortisol en las heces y, por lo tanto, con un mayor estrés (de Lima *et al.*, 2013; Marai *et al.*, 2001). El seguimiento de las variaciones de la temperatura en la superficie corporal del animal ha permitido evaluar el inicio del estro, los procesos inflamatorios, la adaptabilidad al calor y la tolerancia al estrés (McManus *et al.*, 2016).

En la Escuela Politécnica Superior de Orihuela se ha llevado a cabo con éxito un experimento de selección divergente para la varianza residual del tamaño de camada al nacimiento en conejo (Blasco *et al.*, 2017), y se ha observado una estrecha relación de la uniformidad del tamaño de camada con la adaptación de la hembra a los cambios ambientales (Argente *et al.*, 2019). En este sentido, la línea homogénea para el tamaño de camada muestra una mejor condición corporal y una menor susceptibilidad a enfermar, y en consecuencia una menor tasa de eliminación que la línea heterogénea (García *et al.*, 2019; Beloumi *et al.*, 2020). Por lo tanto, la selección para reducir la varianza residual del tamaño de la camada puede ser una herramienta útil para mejorar el bienestar de la coneja. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta correlacionada a la selección para la variabilidad residual del tamaño de camada en la emisividad de la temperatura corporal del conejo.

Material y métodos

Manejo de los animales

El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de la Universidad Miguel Hernández de Elche, según las Directivas del Consejo 98/58/CE y 2010/63/UE (número de referencia 2017/VSC/PEA/00212).

Las hembras se llevaron a la monta por primera vez a las 18 semanas de edad y luego a los 10 días después del parto. Las hembras no receptivas fueron montadas nuevamente la semana siguiente. Tras la monta, las hembras fueron devueltas a sus jaulas. El manejo, el agrupamiento y la monta son estímulos estresantes para el animal (Bakker y Baum, 2000; Gerencsér *et al.*, 2019; Rushen *et al.*, 1999). Se midió la emisividad de la temperatura corporal de la hembra mediante la TIR del globo ocular. Todas las imágenes de emisividad de temperatura se tomaron con una cámara termográfica @FLIR SC660 y se procesaron con el software @ThermaCAM Researcher Pro 2.10 para obtener el registro de temperatura (**Figura 1**).



Figura 1. Imagen termográfica de una coneja fotografiada con la cámara termográfica @FLIR SC660.

En la generación doce del experimento de selección divergente por variabilidad del tamaño de camada, se midió la emisividad de la temperatura del globo ocular en 21 hembras de la línea homogénea y en 22 hembras de la línea heterogénea antes de la monta, a los 5 minutos, a los 30 minutos y a los 60 minutos después de la monta para analizar la evolución de la temperatura en la hembra tras la monta. Además, también se midió la emisividad de la temperatura del globo ocular en 56 hembras de la línea homogénea y 37 hembras de la línea heterogénea (lactantes y no lactantes) antes de la monta y 60 minutos después de la monta. Todas las hembras utilizadas eran primíparas y fueron pesadas antes de llevarse a la segunda monta.

Caracteres

Se analizó la temperatura antes de la segunda monta (temperatura basal), temperatura a los 5 minutos, a los 30 minutos y a los 60 minutos después de la segunda monta, y la diferencia entre la temperatura basal y la temperatura a los 60 minutos tras la monta en las hembras primíparas.

Análisis estadísticos

El modelo para analizar la evolución de la temperatura en la primera hora después del estímulo estresante de la monta incluyó los efectos de sesión (dos niveles), línea-momento (ocho niveles; línea homogénea antes del apareamiento, línea homogénea a los 5 minutos, línea homogénea a los 30 minutos, línea homogénea a los 60 minutos, línea heterogénea a los 5 minutos, línea heterogénea a los 30 minutos y línea heterogénea a los 60 minutos), el efecto aleatorio de la hembra y el peso de la hembra como covariable.

El modelo para analizar el efecto del estado de lactación sobre la diferencia entre la temperatura basal y la temperatura a los 60 minutos tras la monta incluyó los efectos de la estación (tres niveles: otoño, invierno y primavera), estado de lactación (dos niveles: hembras lactantes y no lactantes), línea (dos niveles; línea homogénea y línea heterogénea), y la covariable el peso de la hembra.

Todos los análisis se realizaron utilizando metodología bayesiana. Se utilizaron priores uniformes acotados para todos los efectos sistemáticos, con la excepción del efecto de hembra que se distribuyó de forma normal con media 0 y varianza σ_f^2 . Los efectos de hembra y de residuo se consideraron independientes. Los residuos se distribuyeron de forma normal con media 0 y varianza σ_f^2 . Los priores de las varianzas fueron también planos acotados. Las distribuciones marginales posteriores de los parámetros de interés se estimaron por muestreo de Gibbs. Para todos los análisis se utilizó el programa Rabbit desarrollado por el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (Valencia, España). Después de algunos análisis exploratorios, se tomó una cadena de 60.000 iteraciones con un periodo de quemado de 10.000 iteraciones y solo una muestra de cada 10 se salvó. La convergencia se testó usando el criterio Z de Geweke y los errores de Monte Carlo se obtuvieron usando el procedimiento de series temporales.

Resultados y discusión

Evolución de la temperatura corporal bajo estrés en las líneas divergentes en variabilidad ambiental del tamaño de camada

La temperatura basal fue similar entre la línea homogénea y la línea heterogénea en tamaño de camada (35,69°C en la línea homogénea vs 35,81°C en la línea heterogénea, **Figura 2**). La línea homogénea aumentó ligeramente la temperatura del globo ocular a los 5 minutos después del estímulo estresante de la monta, pasando de 35,69 °C a 36,32 °C, y este aumento se mantuvo hasta los 60 minutos (36,55 °C). No hubo diferencias de temperatura entre las líneas a los 5 minutos después de la monta. Sin embargo, la línea heterogénea mostró una temperatura mayor que la línea homogénea a los 30 minutos (+0,96°C, $p = 0,99$). A los 60 minutos, la temperatura fue similar entre líneas. La evolución de la temperatura fue diferente entre líneas; ya que la línea heterogénea alcanzó el pico de temperatura más tarde que la línea homogénea (30 minutos vs 5 minutos), y su pico fue mayor (36,95°C línea heterogénea vs 36,32°C línea homogénea). Una mayor temperatura en el globo ocular está relacionada con un mayor estrés (de Lima *et al.*, 2013; Marai *et al.*, 2001). Así, nuestro estudio proporcionaría nueva evidencia de la menor sensibilidad al estrés de la línea homogénea.

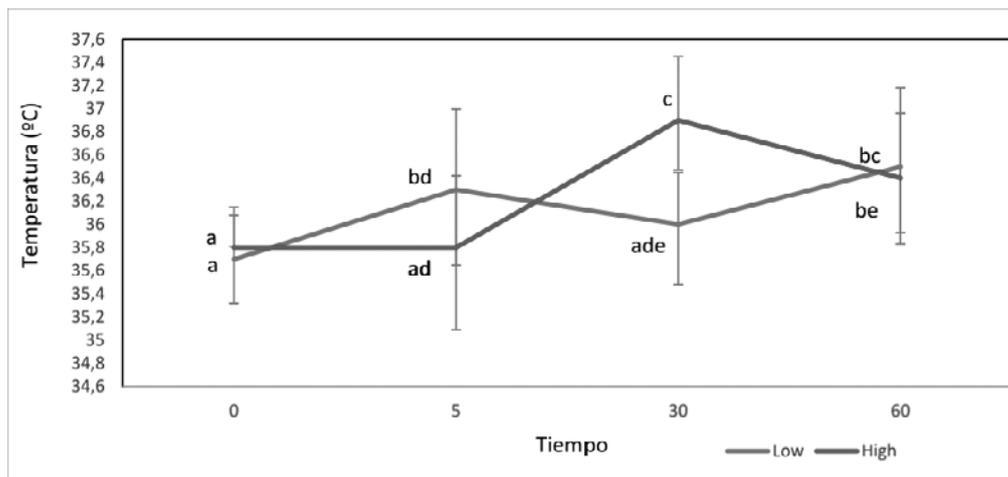


Figura 2. Evolución de la temperatura del globo ocular en la línea homogénea (Low) y heterogénea (High) para el tamaño de camada en condiciones basales, 5 minutos, 30 minutos y 60 minutos después del estímulo estresante de la monta. Diferentes letras indican diferencia entre líneas y momentos.

Efecto de la lactación sobre el incremento de la temperatura basal

La **Tabla 1** muestra la diferencia entre hembras lactantes y no lactantes para la temperatura basal y el incremento entre la temperatura basal y la de 60 minutos después del estímulo estresante de la monta. Las hembras no lactantes presentaron mayor temperatura basal que las lactantes (+0,60°C, $p = 0,97$). Cabe señalar que las hembras no lactantes mostraron un menor incremento de temperatura entre la temperatura basal y la de 60 minutos después del estímulo estresante que las hembras lactantes, la diferencia entre no lactantes y lactantes fue de -0,55°C ($p = 0,92$). La lactancia se considera un período estresante para las hembras. Nuestros resultados mostraron que el incremento de temperatura entre la monta y los 60 minutos después de esta fue mayor en las hembras lactantes que en las no lactantes. Esto concuerda con el mayor nivel de cortisol en sangre en las hembras lactantes que en las no lactantes como fue reportado por Argente *et al.* (2014).

Tabla 1. Diferencias en emisividad de temperatura basal y en la variación de temperatura entre la temperatura basal y a los 60 min en hembras no lactantes y lactantes.

Tiempo	No-lactantes (°C)	Lactantes (°C)	D_{nl-l}	HPD _{95%}	p
Basal (n=94)	33,21	32,61	0,60	-0,01; 1,27	0,97
Basal-60 min (n=94)	1,82	2,37	-0,55	-1,30; 0,25	0,92

n: número de datos. D_{nl-l} : diferencia entre hembras no lactantes y lactantes. HPD_{95%}: región de alta densidad al 95%.
 p: probabilidad de que la diferencia sea > 0 cuando $D_{nl-l} > 0$ o sea < 0 cuando $D_{nl-l} < 0$.

En conclusión, las hembras seleccionadas para reducir la variabilidad del tamaño de la camada mostraron un menor aumento de la temperatura después de un estímulo estresante, por lo tanto, su respuesta al estrés es menor y, en consecuencia, su bienestar es mayor.

Bibliografía

Argente MJ, García ML, Virlanga V, Muelas R. 2014. Relationship between cortisol and acute phase protein concentrations in female rabbits. *Vet J* 202:172-175.

Argente MJ, Garcia ML, Zbynovska K, Petruska P, Capcarova M, Blasco A. 2019. Correlated response to selection for litter size environmental variability in rabbits' resilience. *Animal* 13: 2348-2355.

- Bakker J, Baum MJ. 2000. Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators. *Front Neuroendocr* 21: 220-262.
- Beloumi D, Blasco A, Muelas R, Santacreu MA, Garcia ML, Argente MJ. 2020. Inflammatory Correlated Response in Two Lines of Rabbit Selected Divergently for Litter Size Environmental Variability. *Animals* 10(9):1540.
- Blasco A, Martínez-Álvaro M, García ML, Ibañez-Escriche N, Argente. 2017. Selection for environmental variance of litter size in rabbits. *Genet Sel Evol* 49: 48.
- de Lima V, Piles M, Rafel O, Lopez-Bejar M, Ramon J, Velarde A, Dalmau A. 2013. Use of infrared thermography to assess the influence of high environmental temperature on rabbits. *Res Vet Sci* 95:802-810.
- Dela Ricci G, da Silva-Miranda KO, Titto CG. 2019. Infrared thermography as a non-invasive method for the evaluation of heat stress in pigs kept in pens free of cages in the maternity. *Comput Electron Agr* 157:403-409.
- Garcia ML, Blasco A, Garcia ME, Argente MJ. 2019. Correlated response in body condition and energy mobilisation in rabbits selected for litter size variability. *Animal* 13:784-789.
- Gerencsér Z, Matics Z, Szabó RT, Kustos K, Mikó A, Nagy I, Odermatt M, Atkári T, Szendrő Z. 2019. Aggressiveness, Mating Behaviour and Lifespan of Group Housed Rabbit Does. *Animals* 9: 708.
- Marai IFM, Ayyat MS, Abd El-Monem UM. 2001. Growth performance and reproductive traits at first parity of New Zealand White female rabbits as affected by heat stress and its alleviation under Egyptian conditions. *Tropic Anim Health Prod* 33:451-462.
- McManus C, Tanure CB, Peripolli V, Seixas L, Fischer V, Gabbi AM, Menegassi SRO., Stumpf MT, Kolling GJ, Dias E et al. 2016. Infrared thermography in animal production: An overview. *Comput Electron Agr* 123:10-16.
- Mostl E, Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrin* 23:67-74.
- Rosell JM, de La Fuente LF. 2009. Culling and mortality in breeding rabbits. *Prev Vet Med* 88:120-127.
- Rushen JA, Taylor A, de Passillé AM. 1999. Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. *Appl Anim Behav Sci* 65:285-303.
- Stewart M, Webster JR, Schaefer AL, Cook NJ, Scott SL. 2005. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. *Anim Welfare* 14:319-325.
- Urbanova M, Kramarova E, Chloupek J, Najmanov M. 2019. Evaluation of stress in laboratory rabbits used for teaching purposes. *Acta Vet Brno* 88:249-255.
- Widowski TM, Curtis SE, Graves CN. 1989. The neutrophil lymphocyte ratio in pigs fed cortisol. *Can J Anim Sci* 69:501-504.

Regiones genómicas del conejo de carne implicadas en la variación de su microbiota cecal

Genomic regions of meat rabbit involved in the variation of its cecal microbiota

Velasco-Galilea M^{1,2}, Buitenhuis B³, Ramayo-Caldas Y¹, Ballester M¹, Piles M¹, Sánchez JP^{1,*}

¹Programa de Genética y Mejora Animal, IRTA, Torre Marimón, 08140 Caldes de Montbui, Barcelona, España.

²Centre de Recerca en Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, España.

³Center for Quantitative Genetics and Genomics, Aarhus University, Blichers Alle 20, P.O. Box 50, 8830 Tjele, Dinamarca.

*juanpablo.sanchez@irta.es

Resumen

El objetivo de este trabajo fue identificar regiones implicadas en el control genético de la composición de las diferentes comunidades microbianas presentes en el ciego del conejo. El material disponible consistió en los genotipos (~200K SNPs) y un conjunto de fenotipos microbianos representativos de la microbiota cecal de 412 gazapos. Para identificar las regiones genómicas del hospedador asociadas con los fenotipos microbianos se utilizaron dos enfoques: un modelo mixto de regresión para cada SNP (MIX-GWAS) y un ajuste simultáneo de todos los SNPs, asumiendo *a priori* que sólo el 1% tiene efecto, con BayesC. Con el fin de evaluar la potencia estadística de ambos enfoques, inicialmente se analizó un fenotipo microbiano simulado con la estructura de los datos reales en tres escenarios de heredabilidad. Los resultados de la simulación sugieren un poder bastante limitado de ambos enfoques para la detección de QTNs asociados con la variación de la microbiota cecal con los datos disponibles. Aunque la probabilidad de captar una señal correspondiente a un QTN es mayor con MIX-GWAS, el valor predictivo positivo de este enfoque es un tercio del de BayesC. Solo el análisis de los datos reales con el método MIX-GWAS declaró una región QTL en el cromosoma 12 asociada con la variación de una OTU perteneciente al género *Butyricimonas*. Este resultado sugiere que una variante en dicha región podría favorecer la presencia de bacterias productoras de butirato en el ciego del conejo y contribuir al mantenimiento de la integridad de su mucosa. En esta región se encuentra el gen *CD83* que codifica para una proteína de membrana con un papel importante en el sistema inmunitario, lo que lo convierte en un buen candidato para explicar variaciones en la abundancia de bacterias del género *Butyricimonas*.

Palabras clave: conejo, microbiota cecal, estudio de asociación de genoma completo, gen candidato, potencia estadística.

Abstract

The aim of this study was to identify the regions involved in the genetic control of the composition of different microbial communities present in the rabbit cecum. The available material consisted of the genotypes (~200K SNPs) and a set of microbial traits representative of the cecal microbiota of 412 rabbits. Two approaches were used to identify host genomic regions associated with microbial phenotypes: the implementation of a mixed regression model for each SNP (MIX-GWAS) and the simultaneous fit of all SNPs, assuming a *priori* that only 1% have an effect, with BayesC. Initially, in order to evaluate the statistical power of both approaches, a simulated microbial phenotype generated under the structure of the real data was analyzed for three heritability scenarios. Simulation results suggest the rather limited power of both approaches with the available data to detect the QTNs associated with the variation of cecal microbiota. Although the probability of capturing a signal corresponding to a QTN is higher with the MIX-GWAS, the positive predictive value of this approach is one-third that of the BayesC. Only the results of the analysis of the real data with the MIX-GWAS method declared a QTL region on chromosome 12 associated with the variation of an OTU belonging to the genus *Butyricimonas*. This result suggests that a variant in this chromosomal region could

favor the presence of butyrate-producing bacteria in the rabbit cecum and contribute to maintaining the integrity of its mucosa. This region harbours *CD83* gen that codes for a membrane protein involved in the immune system, this function makes this gen a serious candidate for explaining the abundance of bacteria from *Butyrivimonas* genus.

Keywords: rabbit, cecal microbiota, genome-wide association study, candidate gene, statistical power.

Introducción

En la última década se ha podido constatar en diversas especies mamíferas el relevante papel de los microorganismos que habitan su tracto gastrointestinal en una gran variedad de procesos fisiológicos y en el mantenimiento de la homeostasis (Flint *et al.*, 2012). El conejo para producción cárnica no es una excepción y, dada su dieta exclusivamente herbívora, la implicación de la microbiota cecal en el control de multitud de procesos fisiológicos pudiera ser incluso mayor que en otras especies. La comunidad microbiana más rica y diversa del tracto gastrointestinal del conejo es la que alberga su ciego, e influye sobre las condiciones ambientales de este órgano y sobre la disponibilidad de nutrientes del hospedador. Diferentes estudios, entre los que se incluyen los realizados por nuestro grupo, han revelado la influencia de diferentes factores relacionados con el manejo y la alimentación sobre la microbiota cecal (Velasco-Galilea *et al.*, 2020) así como el papel de ésta como factor explicativo y predictivo de caracteres vinculados con el crecimiento, el consumo y la eficiencia alimentaria de gazapos durante la fase de engorde (Velasco-Galilea *et al.*, 2021a).

La relación que se establece entre la microbiota del ciego y su hospedador es una simbiosis derivada de una adaptación evolutiva mutua que promovería el crecimiento de aquellos microorganismos que faciliten la degradación de alimentos, la protección de la mucosa intestinal y otros procesos que puedan resultar beneficiosos para el hospedador. Este proceso evolutivo de las comunidades microbianas y del hospedador pudiera verse reflejado en un cierto grado de control genético del hospedador sobre su microbiota intestinal. Esta hipótesis ha sido recientemente confirmada en varias especies ganaderas; incluyendo el conejo de producción cárnica (Velasco-Galilea *et al.*, 2021b).

El objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el estudio del determinismo genético de la composición microbiana del ciego del conejo de carne, tratando de identificar las regiones genómicas implicadas en su variación. El fin último de nuestro proyecto es generar conocimiento en torno a los diferentes factores que determinan caracteres tan importantes para la industria cunícola como el crecimiento y la eficiencia alimentaria.

Material y métodos

El material animal empleado en este estudio consistió en 412 gazapos de la línea Caldes (Gómez *et al.*, 2002) criados en 5 lotes en 2 granjas y periodos de tiempo diferentes (julio 2012 - julio 2014 en la granja A, y primavera de 2016 en la granja B) bajo las mismas condiciones de manejo y alimentados con una dieta estándar de pienso granulado suplementada con antibióticos (excepto 23 gazapos de la granja B que recibieron pienso libre de antibióticos). Durante el periodo de crecimiento (32-60/66 días de edad), los gazapos se alojaron en jaulas colectivas (6/8 gazapos/jaula) y se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes regímenes alimentarios: *ad libitum* o restringido a un 75% del consumo a voluntad.

En el momento del sacrificio se tomaron muestras de hígado y del contenido cecal de cada animal. Del hígado se extrajo el ADN genómico de los gazapos con el kit MN NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Alemania) para su posterior genotipado con un chip de 200K SNPs específico para conejos (200K Affymetrix Axiom OrcunSNP Array). Todas las muestras tuvieron un porcentaje de genotipado satisfactorio superior al 90%. El número final de SNPs autosómicos fue de 114.604 tras descartar aquellos con una frecuencia alélica y un porcentaje de genotipado correcto inferiores al 5%. Del ciego se extrajo el ADN microbiano y se amplificó un fragmento de 411 pb del gen 16S ARNr con el kit multiplex Nextera® XT (Illumina, Inc., San Diego CA, Estados Unidos) que se secuenció en una plataforma MiSeq. El procesamiento bioinformático de las lecturas crudas se realizó con la versión 1.9.0. del software QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) con el pipeline descrito en Velasco-Galilea *et al.* (2020), resultando en una tabla de 951 unidades taxonómicas operativas (OTUs) que fueron normalizadas con el método Cumulative Sum Scaling (CSS) (Paulson *et al.*, 2013). La asignación taxonómica de cada OTU se realizó con el asignador taxonómico de consenso UCLUST y la base de datos de referencia Greengenes (versión gg_13_5_otus). Se definieron los siguientes fenotipos microbianos como representativos de la microbiota cecal del conejo: abundancias relativas de 8 filos y 29 géneros, 951 OTUs CSS-normalizadas y 4 índices de alfa-diversidad.

Para identificar las regiones genómicas del hospedador asociadas con dichos fenotipos se aplicaron dos enfoques diferentes: MIX-GWAS y BayesC. El método MIX-GWAS se implementó con el programa GCTA ajustando un modelo mixto de regresión para cada SNP que considera su dosis alélica como una covariable y define su efecto como el coeficiente de regresión sobre esa covariable, testándolo con un test χ^2 de 1 grado de libertad. El modelo incluyó como factor aleatorio el efecto genómico de cada animal (predicho al considerar la matriz de relaciones genómicas calculada a partir de los genotipos disponibles). Este método requiere una corrección posterior de los resultados para controlar la tasa de falsos positivos (tFP). En este sentido, los p-valores se ajustaron dentro de carácter a una tFP = 0,05 (Benjamini y Hochberg, 1995) y posteriormente se multiplicaron por el número de caracteres independientes analizados (definido como el número de componentes principales de la matriz de fenotipos que permiten explicar el 98% de su variación) de manera equivalente al método de corrección de Bonferroni. El método BayesC se implementó con el programa gs3 ajustando simultáneamente todos los SNPs, asumiendo *a priori* que sólo el 1% tiene efecto. Las ventajas de este ajuste simultáneo son poder prescindir de correcciones posteriores y expresar directamente la incertidumbre en términos probabilísticos.

Para evaluar la potencia estadística de ambos enfoques dados los datos disponibles se hizo un estudio previo de simulación. Para ello se generaron 3 conjuntos de datos, bajo la misma estructura experimental y genealógica de los datos reales, usando distintos valores de heredabilidad (0,1, 0,3 y 0,5) y un mismo conjunto de 20 QTNs responsables del control genético del fenotipo simulado. En este estudio se determinó la proporción de veces que una región de 1 Mb continente de un QTN se declaraba realmente como asociada con la variación del fenotipo simulado (tasa de verdaderos positivos, tVP) así como las tasas de falsos negativos, falsos positivos y verdaderos negativos (tFN, tFP y tVN). Se calculó también la especificidad, sensibilidad y los valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN) para cada enfoque.

Resultados y discusión

Los resultados del estudio de simulación sugieren una potencia estadística bastante limitada de ambos enfoques para la detección de QTNs asociados con la variación de la microbiota cecal con los datos disponibles (Tabla 1). La tVP más elevada se consiguió con el método MIX-GWAS (65%) para el fenotipo simulado con una heredabilidad de 0,5. La potencia estadística del enfoque BayesC en ese mismo escenario fue un tercio más baja (45%). A pesar de que la probabilidad de captar una señal correspondiente a un QTN es mayor con el método MIX-GWAS, la proporción de verdaderos positivos respecto del total de asociaciones declaradas (VPP) con este enfoque (20,63%) es aproximadamente un tercio de la proporción observada con el modelo BayesC (64,29%). En conclusión, el método MIX-GWAS es capaz de detectar más señales, pero a su vez yerra más.

Tabla 1. Tasas de Falsos Positivos (tFP), Falsos Negativos (tFN), Verdaderos Positivos (tVP), Verdaderos Negativos (tVN), Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos Positivos y Negativos (VPP y VPN) de los análisis con MIX-GWAS y BayesC para detectar QTNs simulados en distintos escenarios de heredabilidad obtenidos bajo la estructura de los datos reales disponibles.

	h ² = 0,10		h ² = 0,30		h ² = 0,50	
	BayesC	MIX-GWAS	BayesC	MIX-GWAS	BayesC	MIX-GWAS
tFP (%)	0,00	0,11	0,11	2,52	0,58	5,72
tFN (%)	100,00	90,00	85,00	65,00	55,00	35,00
tVP (%)	0,00	10,00	15,00	35,00	45,00	65,00
tVN (%)	100,00	99,89	99,89	97,48	99,42	94,28
Sensibilidad ¹ (%)	0,00	10,00	15,00	35,00	45,00	65,00
Especificidad ² (%)	100,00	99,89	99,89	97,48	99,43	94,28
VPP ³ (%)	-	66,67	75,00	24,14	64,29	20,63
VPN ⁴ (%)	97,76	97,98	98,09	98,50	98,75	99,16

¹Sensibilidad = VP / (VP + FN), ²Especificidad = VN / (VN + FP), ³Valor predictivo positivo (VPP) = VP / (VP + FP), ⁴Valor predictivo negativo (VPN) = VN / (VN + FN).

En cuanto al análisis del conjunto de fenotipos microbianos reales, el método BayesC no declaró ningún SNP como asociado con la variación de ningún carácter dado que la probabilidad de asociación de la región no superó el umbral de 0,9. Dicha probabilidad de asociación refleja la probabilidad de que algún SNP dentro de una región sea declarado con efecto no nulo (porcentaje de veces, a lo largo de los muestreos de Gibbs, que un SNP

tiene efecto no nulo). En otras palabras, ningún SNP se declaró con efecto en al menos el 90% de las iteraciones para ningún fenotipo microbiano.

El método MIX-GWAS declaró una única señal significativa en el extremo proximal del cromosoma 12 (8,48-8,51 Mb), identificándose seis SNPs asociados a la variación de los conteos CSS-normalizados de la OTU 124470 (**Figura 1**). Esta OTU está taxonómicamente asignada al género *Butyricimonas*. Destacar que en un análisis previo de heredabilidad de los fenotipos microbianos analizados se describió el género *Butyricimonas* como uno de los más heredables ($h^2 = 0,27$; Velasco-Galilea et al., 2021b). Las bacterias de este género son productoras de butirato; una importante fuente de energía para las células del epitelio intestinal. En base a estos resultados, y al conocido papel del género *Butyricimonas* en el mantenimiento de la integridad de la mucosa, hipotetizamos que una variante en el cromosoma 12 favorecería la abundancia de este género en el ciego del conejo.

En esta región se anotaron los genes *MCUR1*, *RNF182*, *CD83*, *JARID2* y *DTNBP1*. Destacar el gen *CD83*, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que codifica para una proteína de membrana de paso único que podría estar involucrada en la regulación de la presentación de antígenos. Hipotetizamos que una mejor función inmunitaria pudiera favorecer la presencia del género *Butyricimonas*. No obstante, sería necesario un estudio de validación funcional para vincular la variabilidad alélica de este u otros genes candidatos con la menor o mayor presencia del OTU 124470 en el ciego.

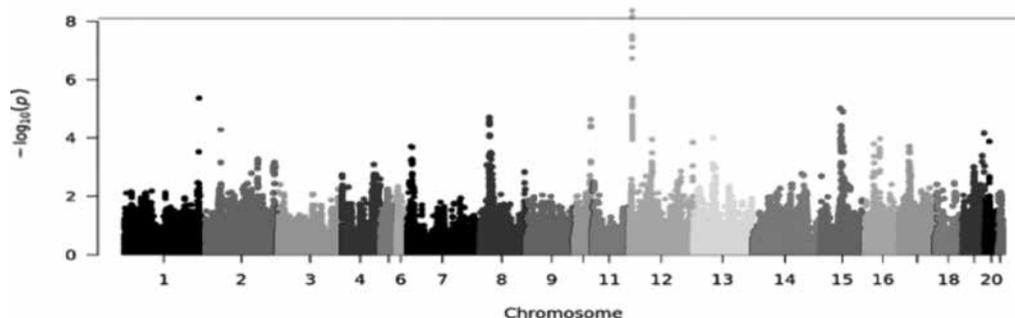


Figura 1. Manhattan plot para la OTU 124470.

Reportamos, a pesar de la limitada potencia estadística de nuestro diseño experimental, una región QTL potencialmente implicada en el control de un grupo de bacterias productoras de butirato que parecen tener un papel relevante en procesos bioenergéticos e inmunológicos de los conejos durante su crecimiento. Desde una perspectiva aplicada estos resultados tienen, a día de hoy, una repercusión limitada; sin embargo, pueden establecer la base de nuevas líneas de investigación que tengan como objetivo entender los procesos básicos de interacción entre el hospedador y su microbiota intestinal, siendo esto un conocimiento parcialmente transferible entre especies.

Agradecimientos

Financiado por los proyectos RTA2011-00064-00-00 (INIA) y Feed-a-Gene (Programa H2020 - UE núm. 633531). Maria Velasco Galilea fue beneficiaria de una beca predoctoral INIA asociada al proyecto de investigación RTA2014-00015-C2-01.

Bibliografía

- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 57(1):289-300.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7(5):335.
- Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastro Hepat* 9(10):577-589.
- Gómez EA, Rafel O, Ramon J. 2002. The caldes strain (Spain). *Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches* 38:193-198.

Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M. 2013. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods* 10(12):1200.

Velasco-Galilea M, Guivernau M, Piles M, Viñas M, Rafel O, Sánchez A, et al. 2020. Breeding farm, level of feeding and presence of antibiotics in the feed influence rabbit cecal microbiota. *Anim Microbiome* 2(1):1-16.

Velasco-Galilea M, Piles M, Ramayo-Caldas Y, Sánchez JP. 2021a. The value of gut microbiota to predict feed efficiency and growth of rabbits under different feeding regimes. *Sci Rep* 11:19495.

Velasco-Galilea M, Piles M, Ramayo-Caldas Y, Varona L, Sánchez JP. 2021b. Bayes factor for elucidating the influence of host genetics, litter and cage effects on rabbit cecal microbiota through linear and zero-inflated Poisson mixed models. *Genet Sel Evol* (under review).

Caracterización del comportamiento alimentario en animales racionados y alimentados a voluntad

Characterisation of feeding behaviour in restricted and ad libitum-fed animals

Piles M*, Pascual M, Mora M, Sánchez JP

Programa de Genètica i Millora Animal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Caldes de Montbui, Barcelona.

*miriam.piles@irta.es

Resumen

Se analizó el comportamiento alimentario de conejos de engorde alojados en grupo de los 42 a los 60 días de vida mediante el uso de comederos electrónicos que miden para cada animal la ingestión de pienso y el momento del consumo. Los animales pertenecían a dos líneas seleccionadas por eficiencia alimentaria durante de engorde, con dos criterios de selección diferente: ADGR, seleccionada por crecimiento diario bajo restricción alimentaria; y RFI, seleccionada por consumo residual (360 animales por línea). Los animales de la línea ADGR, criados bajo restricción horaria (18h a 6h; aprox. 80% del consumo *ad libitum*) mostraron mayor velocidad de consumo (+34%), y mayor nivel de competitividad entre individuos, determinado por mayores coeficientes de variación del tiempo de ocupación y consumo diario, así como mayor consumo durante las horas en las que no se aplicaba la restricción, que los animales de la línea RFI, que estaban alimentados *ad libitum*.

Palabras clave: comportamiento alimentario, interacción social, restricción alimentaria, crecimiento, bienestar animal.

Abstract

The feeding behavior of fattening rabbits housed in groups from 42 to 60 days of age was analyzed through the use of electronic feeders that measure feed intake and consumption time for each animal. The animals belonged to two lines selected for feed efficiency during fattening, with two different selection criteria: ADGR, selected for daily growth under feed restriction, and RFI, selected for residual consumption (360 animals per line). The animals of the ADGR line, reared under time restriction (6:00 p.m. to 6:00 a.m.; approx. 80% of *ad libitum*) showed a higher rate of feed intake (+34%), and a higher level of competition between individuals, determined by a higher coefficient of variation of the occupation time and the daily consumption, as well as by a greater feed intake during the hours of no restriction, than the animals of the RFI line, which were fed *ad libitum*.

Keywords: feeding behaviour, social interaction, feed restriction, growth, animal welfare.

Introducción

La cría de gazapos para producción de carne se realiza generalmente alojando los animales en grupo. Ello dificulta el registro de datos de comportamiento alimentario (CA) el cual se define a partir de la medida del consumo y de diferentes parámetros que definen la pauta con que este se produce. Tanto medir el CA individual como caracterizar el de una determinada población tienen importancia en diferentes campos de la producción, como son el de la salud y el bienestar animal, la nutrición y la genética. Así, por ejemplo,

conocer la pauta de consumo de una población es necesario para los sistemas automáticos de alimentación tanto si se practica racionamiento como alimentación a voluntad. Por otro lado, la información individual y de grupo de CA permite la detección temprana de problemas técnicos (fallos en los bebederos, temperaturas no adecuadas, etc.) o sanitarios (enfermedades subclínicas). La presencia de interacciones sociales entre los animales que comparten una jaula y que afectan a su crecimiento, eficiencia alimentaria y bienestar también se puede medir, o simplemente detectar, en función de los parámetros de CA, que a su vez se pueden utilizar para la mejora genética de estos caracteres utilizando modelos que incluyan los efectos de interacción social (Herrera Cáceres *et al.*, 2019). La selección genética para la mejora genética de la resiliencia frente a enfermedades también podría realizarse seleccionando aquellos animales cuyo CA se ve menos afectado en presencia de una enfermedad, tal como se ha planteado recientemente con el consumo de agua en cerdos (Cheng *et al.*, 2021). En definitiva, medir el CA es cada vez más importante y es una herramienta más de la ganadería de precisión.

Algunos trabajos desarrollados en las últimas décadas han permitido observar que durante el engorde el conejo presenta una menor ingestión de pienso durante las horas de luz, y que incrementa la velocidad de ingestión cuando se somete a una restricción horaria de alimento (Tudela y Lebas, 2006; Martignon, 2010; Martignon *et al.*, 2021). Sin embargo, los estudios son escasos y presentan ciertas limitaciones. Por una parte, el consumo de pienso se mide a nivel de grupo y no de individuo. Por otra parte, el periodo de estudio comprende apenas unos días y en algunos casos sólo una parte del día. Esto es así debido a la falta de un sistema de registro automático del consumo individual de animales alojados en grupo como el que existe desde hace varias décadas para otras especies. Sin embargo, en los últimos años nuestro grupo ha diseñado y producido este dispositivo para conejos durante el desarrollo de un proyecto europeo ("Feed a Gene") y dos proyectos estatales ("Genef" y "Genef2") que, además de medir el consumo individualmente y registrar el momento en que se produce, permite limitar el periodo de suministro de pienso a las horas deseadas.

El objetivo de este trabajo es caracterizar el CA de dos poblaciones de conejo sometidas a diferente régimen alimentario utilizando este dispositivo e identificar aquellos parámetros de CA que están asociados con crecimiento y aquellos que puedan ser buenos indicadores de la existencia de relaciones de competencia o jerarquía entre los animales que comparten una jaula.

Material y métodos

Los datos corresponden a animales de las líneas de selección ADGR y RFI, ambas seleccionadas para mejorar la eficiencia alimentaria durante el engorde mediante distintos criterios de selección: El crecimiento medio diario (ADGR) en condiciones de restricción alimentaria en el caso de la línea ADGR y el consumo de pienso residual (RFI) en el caso de la línea RFI. La restricción alimentaria se practicó limitando el tiempo de suministro de comida al período comprendido entre las 18h y las 8h del día siguiente, es decir, el período nocturno en el que los gazapos están más activos. En el estudio se consideran un total de 720 animales pertenecientes a 4 lotes nacidos entre agosto y octubre de 2021 (90 animales/lote y línea) alojados en jaulas de 6 animales (120 jaulas: 60 ADGR y 60 RFI). Los animales se distribuían en las jaulas a la edad de 39 días con pienso administrado a voluntad para que se familiaricen con el comedero. El periodo de control comprendió entre los 42 a los 60 días de edad. La edición de los datos producidos en el comedero (identificación del animal, tiempo de ocupación y pienso consumido) consistió en una primera eliminación de registros con valores ausentes, dudas en la identificación del animal, tiempos de ocupación (OT, en s) mayores a 1000 s y consumos (FI, en g) negativos o mayores de 30 g. Después, se agregó la información de registros de un mismo animal entre los que habían transcurrido menos de 2 minutos sin ser interrumpido por otro animal, al considerarlos registros correspondientes a una misma visita al comedero. Por otra parte, se eliminaron todos los registros de jaulas en los que hubiese algún animal muerto o eliminado del control, y también los registros correspondientes al primer y último día de control. Los datos de consumo se editaron de forma separada para cada una de las líneas, eliminándose los registros anómalos. En el caso de visitas al comedero en los que el animal no hubiese comido, se eliminaron los tiempos de ocupación con un valor mayor o menor que 2 veces el intervalo intercuartílico de este carácter. En el caso de visitas en las que el animal sí hubiese comido, se eliminaron los valores anómalos de manera multivariante de acuerdo con el criterio de la distancia de Mahalanobis robusta obtenida a partir de las variables OT, FI e intervalo de tiempo entre comidas (IBM, en s), eliminando datos con una distancia superior a 81 s. Finalmente, para cada comida (es decir, visita al comedero en la que sí había consumo) se calculó la velocidad de ingesta ($FR = FI/OT$, en g/s).

Resultados y discusión

En total, el porcentaje de registros eliminados fue del 7,7 % para los animales racionados (ADGR) y 2,6% para los alimentados a voluntad (RFI), lo que indica un comportamiento más errático en el caso de los animales sometidos a restricción. Por otra parte, el porcentaje de visitas al comedero en las que el animal come respecto al total de visitas fue de sólo del 51% para los animales ADGR y del 62% para los RFI, una diferencia pequeña dado que el periodo de racionamiento de la ADGR fue de 12 horas. El tiempo de ocupación cuando comían era 3,4 y 6,7 veces mayor que cuando no comían para los ADGR y RFI, respectivamente. Estos valores indican que los animales ADGR rápidamente se adaptan al periodo de suministro de pienso no visitando el comedero fuera de este periodo más de lo que lo hacen los alimentados a voluntad.

La evolución horaria de los parámetros de CA se muestra en la **figura 1**, vemos que los animales RFI disminuyen el número de visitas al comedero (NV) en las que comen a partir de las 6h, alcanzando un mínimo a las 15h de 11 visitas, mientras que el máximo se producía a las 23h. En el caso de los ADGR, el NV fue de media un 20% mayor al de los RFI durante las mismas horas. Los OT de los ADGR y RFI siguieron la misma pauta tanto cuando los animales comían como cuando no lo hacían, excepto en este último caso en el que se producía un pico importante durante las 2 horas siguientes a la interrupción del suministro de pienso. Durante el resto del día los valores se mantuvieron bastante constantes. El FI, seguía la misma pauta para los dos grupos que el NV en las que comen, siendo el máximo y el mínimo del total de pienso consumido en una hora 89 y 45 g en ADGR y 77 y 42 g en RFI. El FR fue siempre superior en ADGR que en RFI, es decir los animales comen un 34% más deprisa. IBM siguió la pauta contraria al NV en la línea RFI y no tanto en la ADGR.

En relación a la evolución diaria (**figura 2**), el NV incrementó con la edad del animal hasta alcanzar su máximo el día 11 de control (53 d de edad) en RFI (46 visitas) y el día 15 en ADGR (40 visitas). La pauta fue similar cuando los animales comían. Los tiempos de ocupación cuando los animales comen suponen en ADGR un 40% del los de RFI como consecuencia de la restricción. Cuando no comen, los tiempos de ocupación son el doble en ADGR que en RFI pero los valores son muy inferiores a cuando comen. Teniendo en cuenta que el nivel de restricción efectivo fue del 66% del consumo a voluntad (**figura 3**), valor muy superior al ratio de OT, se podría de nuevo sugerir que los ADGR prácticamente no van al comedero en las horas de racionamiento. El FI aumenta con la edad, lo que se corresponde con el crecimiento y lo hace también la FR que fue de nuevo superior en ADGR que en RFI (42%) alcanzando un máximo de 0,022 g/s en ADGR y de 0,016 en RFI. El IMB, sin embargo, disminuye con la edad y es inferior en ADGR que en RFI, es decir, los animales racionados comen cada vez más frecuentemente que los alimentados a voluntad y lo hacen también cada vez más deprisa para intentar cubrir sus necesidades. Aunque el nivel de restricción alcanzado parece inferior al deseado (80%) hay que tener en cuenta que en la edición de datos, los datos anómalos se eliminan cuando lo que podría hacerse es imputarles un valor que podría ser el de la media o la moda. Esto seguramente hace que el nivel de restricción calculado sea algo inferior al real aunque no es de esperar que alcance el 80% dado que el porcentaje de datos eliminados es pequeño.

Los coeficientes de variación dentro de jaula de las variables de CA (**figura 5**) pueden ser indicadores del nivel de relaciones de competencia entre los animales que comparten la jaula, de manera que una mayor variación indicaría una mayor dominancia de unos animales sobre otros a la hora de comer. Para todas las variables analizadas el coeficiente de variación fue superior en los ADGR que en los RFI aunque las diferencias son sólo significativas en el caso de FI y OT. Este resultado se correspondería con los resultados encontrados en un estudio sobre los efectos de interacción social en el crecimiento realizado en animales de la línea Caldes (Piles *et al.*, 2017) que es el origen común de las líneas ADGR y RFI.

El incremento de peso durante el periodo de control fue menor en ADGR ($668 \pm 6,5$ g) que en RFI ($730 \pm 5,9$ g) principalmente como consecuencia de la restricción pero a la que se podría sumar o restar el efecto que la selección ha tenido en cada una de las líneas sobre el crecimiento. Sería de esperar que en los animales ADGR la selección hubiese producido una mejora del crecimiento con respecto a los RFI, en los que se esperaría que se mantuviese constante (Droulhet *et al.*, 2016).

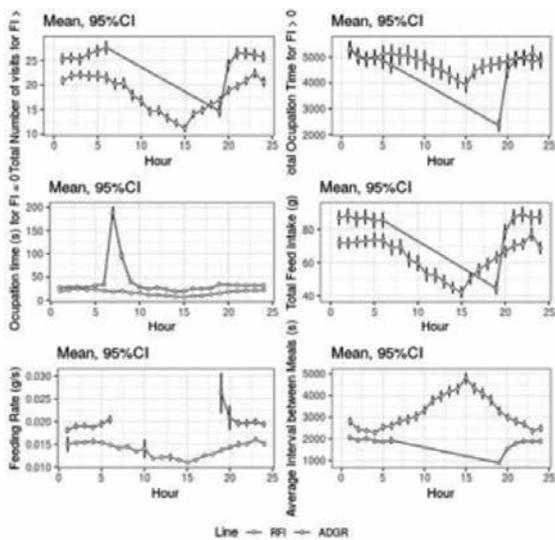


Figura 1. Evolución horaria de FR, OT y NV.

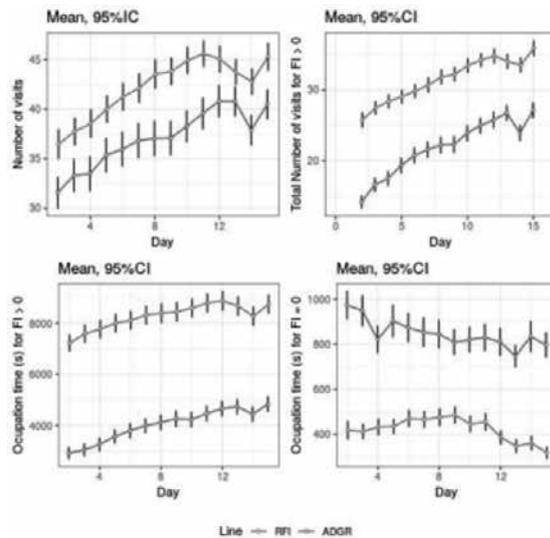


Figura 2. Evolución diaria de NV y OT.

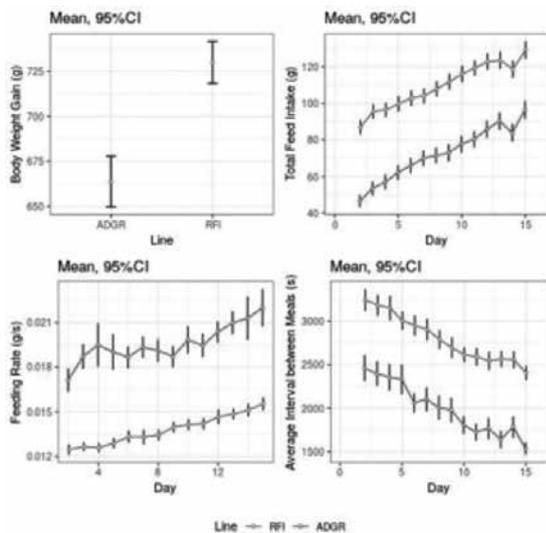


Figura 3. Ganancia de peso y evolución diaria de FI, FR e IBM.

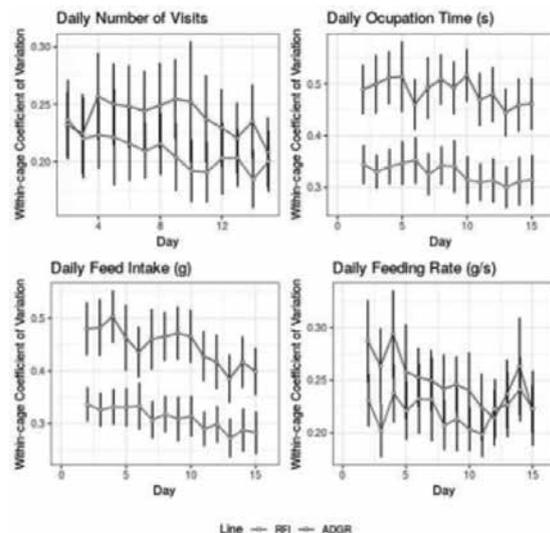


Figura 4. Evolución diaria del coeficiente de variación de NV, OT, FI y FR.

En la línea ADGR, el incremento de peso durante el periodo de control no estuvo significativamente correlacionado con ninguna de las variables de CA (**figura 5**). Sin embargo, sí lo estuvo la velocidad de crecimiento con el promedio de FR diario (0,11) y con el promedio de NV diario (0,12), valores que son muy bajos pero indican que los caracteres de CA podrían aportar alguna información a la hora de seleccionar por eficiencia alimentaria. En la línea RFI, la ganancia de peso estuvo negativamente correlacionada con el promedio del NV diario (-0,12) y positivamente con el promedio de FI diario (0,11) en esta misma línea, la velocidad de crecimiento también resultó positivamente correlacionada con este último carácter.

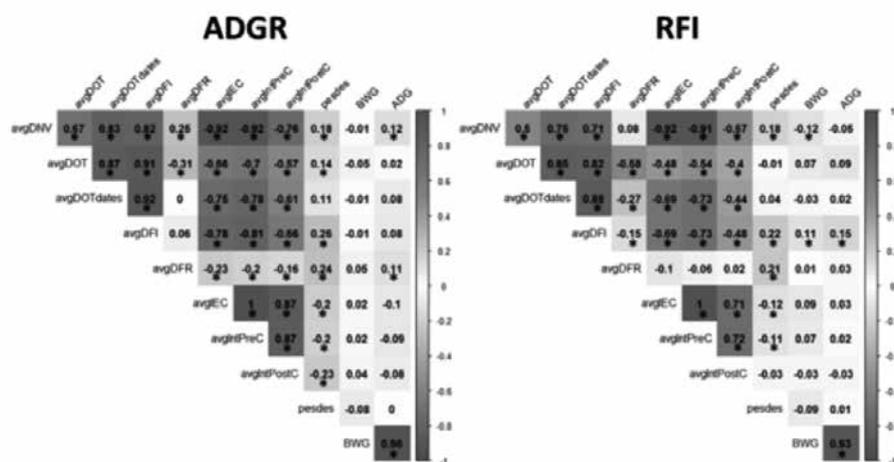


Figura 5. Correlación entre las variables de CA, la ganancia de peso y la velocidad de crecimiento.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos Feed-a-Gene (grant agreement no. 633531), Genef (RTA2014-00015-C02) y Genef2 (RTI2018-097610-R-I00).

Bibliografía

- Cheng J., Putz AM, Harding JCS, Dyck MK, Fortin F, Plastow GS, Canada PG, Dekkers JCM. 2021. Genetic parameters of drinking and feeding traits of wean-to-finish pigs under a polymicrobial natural disease challenge. *J Anim Sci Biotechnol* 12(1):105.
- Drouilhet L, Achard CS, Zemb O, Molette C, Gidenne T, Larzul C, Ruesche J, Tircazes A, Segura M, Bouchez T, Theau-Clement M, Joly T, Balmisse E, Garreau H, Gilbert H. 2016. Direct and correlated responses to selection in two lines of rabbits selected for feed efficiency under ad libitum and restricted feeding: I. Production traits and gut microbiota characteristics. *J Anim Sci* 94(1):38-48.
- Herrera Cáceres W, Ragab M, Sanchez JP. 2019. Indirect genetic effects on the relationships between production and feeding behaviour traits in growing Duroc pigs. *Animal* 14:1-10.
- Martignon M, Burel C, Cauquil L, Combes S, Gidenne T. 2021. Impact of feed restriction and fragmented feed distribution on performance, intake behaviour and digestion of the growing rabbit. *Animal* 15(7):100270.
- Martignon MH. 2010. Consequences of a feed intake control on digestive physiopathology and on feeding behaviour PhD thesis. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00001486/>.
- Piles M., David I, Ramon J, Canario L, Rafel O, Pascual M, Ragab M, Sánchez JP. 2017. Interaction of direct and social genetic effects with feeding regime in growing rabbits. *Gen Sel Evol* 49(1):58.
- Tudela F, Lebas F. 2006. Modalité´s du rationnement des lapins en engraissement. Effets du mode de distribution de la ration quotidienne sur la vitesse de croissance, le comportement alimentaire et l'homogénéité des poids. *Cuniculture Magazine* 33, pp. 21-27. Retrieved January 30, 2012, from <http://www.cuniculture.info/Docs/Magazine/Magazine2006/mag33-021.htm>

Línea FESC. Parámetros tras 28 años de su creación

FESC line. Parameters after 28 years of its creation

Chino E, Gutiérrez E*

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Módulo de Cunicultura, Centro Enseñanza Agropecuaria, México.

**mvzelisagutierrez@cuautitlan.unam.mx*

Resumen

Las líneas genéticas son el resultado de aparear animales de diferentes razas, siendo poblaciones numéricamente más pequeñas que las razas y se caracterizan por tener una especialización productiva. En este trabajo se evalúan algunos parámetros productivos de la línea genética FESC la cual nació en 1994 en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (México) de donde adquiere su nombre. Hoy en día presenta una fertilidad del 88.7%, 9 gazapos nacidos vivos y, 8.65 gazapos al destete lo que la vuelve alternativa para los cunicultores.

Palabras clave: conejos, parámetros, línea genética.

Abstract

Genetic lines results from the mating of animals of different breeds, which main features are being smaller populations in number and having a productive specialization. In this project we evaluate some productive parameters from the FESC genetic line, which was born in 1994 in the Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (México) from where it acquires its name. Their current fertility rate is 88.7%, 9 rabbits born alive, and 8.65 rabbits stay to weaning, becoming them a great alternative for rabbit farmers.

Keywords: rabbits, parameters, genetic line.

Introducción

En la búsqueda de animales más productivos se han creado líneas adaptadas al clima, alimentación y manejo. Una línea genética es un grupo de animales que ha sido seleccionado para una finalidad productiva particular.

En el Módulo de Cunicultura, ubicado en el Centro de Enseñanza Agropecuaria, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se llevó a cabo una investigación genética encaminada a obtener una línea altamente productora de carne.

La línea genética FESC, es el resultado del cruce de animales de las razas: Nueva Zelanda Blanco, California y Chinchilla, tras cinco ciclos de selección. La población base estuvo constituida por 221 reproductores, con un genotipo establecido mediante núcleos cerrados durante los años 1994 a 1998 y se han mantenido hasta la fecha (Gallegos, 2010).

En el lapso de 1998 al 2000, se seleccionaron las mejores crías de acuerdo con el peso a los 70 días de nacidos, y se logró una ganancia promedio aproximada de 300 gramos por animal, como resultado del cruzamiento de las tres razas que le dan origen (Boletín UNAM, 2000).

De este modo, la línea de conejos llamada "sintética", tendría genes de diferentes razas. Esto fue muy útil porque en México no se puede importar animales vivos, debido a que se encontraba libre de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los conejos y se requería conocer la genética de los animales que existen en el país y para formar líneas propias para su producción (Boletín UNAM, 2000).

En este trabajo se busca evaluar a los parámetros que presentan los animales de esta línea tras 28 años de su formación, con la finalidad de conocer cuáles son los parámetros en los que debemos trabajar y de este modo conocer si es momento de realizar nuevos cruces y con ello mejorar para mantener vigente esta línea.

Material y métodos

El presente trabajo se realizó en el módulo de cunicultura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4 (UNAM, México). En la evaluación se utilizaron todos los registros de los años 2015, 2019, 2020 y 2021 del 1 de enero al 31 de diciembre de las conejas de la línea genética FESC, todas bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación. Fueron evaluadas por medio de un análisis de varianza, empleando Minitab Statistical Software, mediante la prueba varianza (ANOVA), de las siguientes variables: fertilidad, número de gazapos vivos, peso al nacimiento, porcentaje de gazapos destetados y peso al destete.

Resultados y discusión

Tras realizar el análisis de los registros de las conejas de la línea FESC comprendidos en los años 2015, 2019, 2020 y 2021 el primer parámetro evaluado fue el de la fertilidad donde a pesar de que estos no mostraron una diferencia estadísticamente significativa se encontró que se mantiene por arriba del 80% todos los años evaluados. En el 2015 del 81.2% en el 2019 del 82.5%, 2020 del 84.3% y para el 2021 se alcanzó 88.7%, sin embargo, tras ser evaluados la diferencia es estadísticamente significativa como se observa la **Figura 1**.

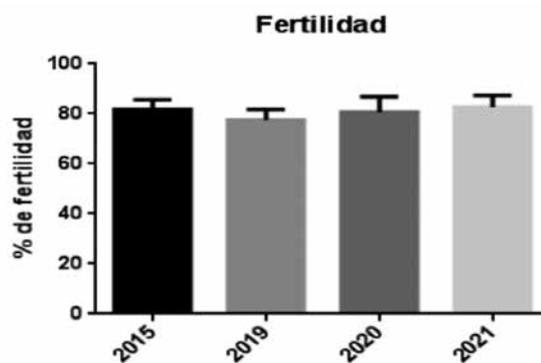


Figura 1. Evolución de la fertilidad de la línea FESC entre 2015 y 2021 ($p < 0.05$).

En cuanto al número de nacidos vivos encontramos una diferencia significativa en el número de gazapos nacidos vivos (gnv), en el 2020 respecto al resto de los años evaluados ya que para este año se alcanzó 9.9 gnv, mientras que lo encontrado para el 2015 fue 9.6 gnv, 9.2 gnv para el 2019 y de 9.0 gnv para el 2021 (**Figura 2**).

En cuanto al peso al nacimiento se observa que el peso al nacimiento fue mayor en el 2020 con 59.9 g, mientras que los pesos más bajos se presentaron en el 2021 con 56.8g promedio por camada. Aunque todos fueron muy semejantes y no se encontró diferencia estadísticamente significativa en los años evaluados, este parámetro se encuentra por arriba de los 56 gramos para todos los años evaluados (**Figura 3**).

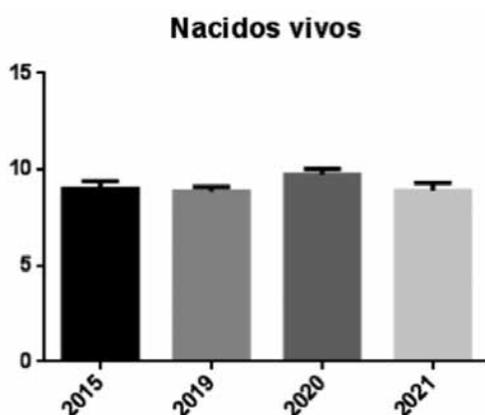


Figura 2. Número de gazapos nacidos vivos en los años estudiados.

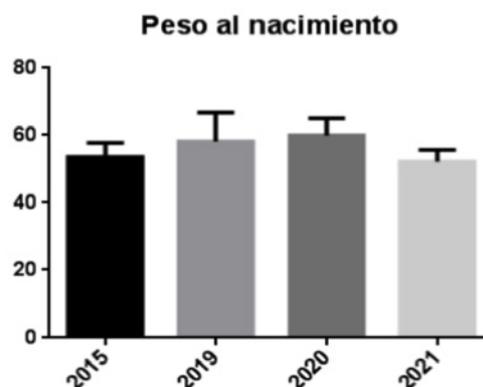


Figura 3. Peso al nacimiento en los años evaluados.

Al evaluar los datos correspondientes al número de destetados encontramos también una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0044$). En el 2021 se alcanzó el valor más alto en este rubro con 8.65 gazapos destetados (gd), siendo el promedio más alto, seguido del año 2015 con 8.19 gd, en el 2020 7.92 gd y finalmente en el 2019 7.45 gd lo cual podemos ver en la **Figura 4**.

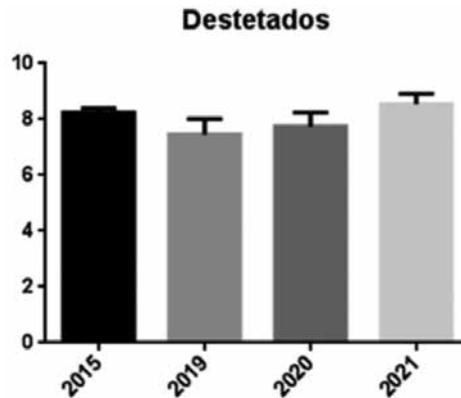


Figura 4. Número de gazapos destetados en los años evaluados.

Por último, se comparó también el peso promedio de la camada al destete (**Figura 5**) donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa, obteniendo el dato más alto en el 2019 (645.6 g), y en 2015 (626.48 g), en comparación con los pesos del 2020 (597.54 g) y 2021 (596.54 g), cabe mencionar que en estos dos últimos años el destete se realizó a los 30 días por cambio de manejo por emergencia sanitaria por Covid-19, y no a los 35 como se realizó antes de esta.

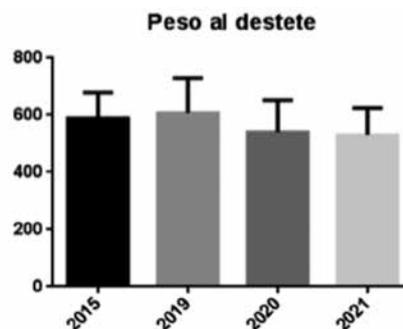


Figura 5. Peso promedio al destete en los años evaluados.

El objetivo de este trabajo fue valorar algunos de los parámetros productivos de las conejas de la línea genética FESC para así dar a conocer cuáles son sus características actuales y cuáles los aspectos que se deben mejorar.

Los datos se obtuvieron de todos los registros de los años 2015, 2019, 2020 y 2021 del 1 de enero al 31 de diciembre de las conejas de la línea genética, bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación, aunque a este respecto hay que aclarar que: debido a la contingencia sanitaria por Covid-19 (2020 y 2021) los destetes se realizaron en el día 30 de edad del gazapo, 5 días antes de lo que se realizaba previo a esta contingencia; por esto mismo, el estrés en el manejo en este periodo fue mucho menor pues se trata de una producción dedicada a la enseñanza.

La fertilidad no parece haber sido influenciada por el tiempo aun cuando es cierto, que en el último año (2021), el porcentaje de fertilidad alcanzó el 88.7%, lo que representa más de un punto porcentual por arriba de lo encontrado por Rojo en 2013 (71.7%).

Con referencia a los nacidos vivos se obtuvo que, en el 2020 se alcanzaron 9.9 gazapos nacidos vivos, 0.9 más que lo reportado en el 2013 por Rojo o Valencia en el 2005, solo Hernández en 2013 reportó 9.96 gazapos nacidos vivos. En cuanto a los destetados se puede ver que el porcentaje de conejos destetados ha sido creciente en los últimos 3 años, lo que permite pensar que la habilidad materna de esta línea se mantiene, aunque esto se deberá constatar con una evaluación de producción láctea.

En el peso al destete no se obtuvo una diferencia significativa entre los años estudiados por lo que no podemos decir con contundencia que el parámetro ha mejorado pues, las condiciones de manejo y un destete 5 días

antes puede no necesariamente significar un avance, más si tomamos en cuenta que el peso referido por Rojo en el 2013 se encontró por arriba de lo que se pudo evaluar.

En conclusión, la línea genética FESC presenta buenos parámetros productivos en cuanto a número de gazapos nacidos vivos, peso promedio al nacimiento, número de destetados y porcentajes de fertilidad. Esta línea genética ha manifestado una considerable evolución en los parámetros, debido al manejo de selección para el mejoramiento genético, siendo así una alternativa para los cunicultores, ofreciendo animales de buena calidad.

Agradecimientos

Al Módulo de Cunicultura y al Centro de Enseñanza Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM.

Bibliografía

Boletín UNAM-2000/431. La cunicultura, recurso poco explotado en México. Ciudad Universitaria, miércoles, 26 de Julio de 2000 <https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2000/2000/431ggg.html>

Gallegos A. 2010. *Comparación del comportamiento reproductivo de tres razas y una línea de conejos por medio del intervalo entre partos. (Tesis licenciatura) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. México.* <http://132.248.9.195/ptb2010/agosto/0659940/Index.html>

Hernández R. 2013. *Evaluación del efecto entre las diferentes estaciones del año en la producción de cuatro razas existentes en el módulo de cunicultura de la FES Cuautitlán durante el 21 de marzo de 2007 y el 20 de marzo de 2008. (Tesis licenciatura) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. México.*

Rojo A. 2013. *Evaluación productiva de tres razas puras y una línea sintética en el módulo de cunicultura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, durante el año 2009. (Tesis licenciatura) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. México.* <http://132.248.9.19/ptb2011/sep-tiembre/0672726/Index.html>

Valencia JA. 2005. *Evaluación de los estimadores productivos de 3 razas de conejos (Oryctolagus cuniculus) y una Línea genética formada en la FES Cuautitlán de agosto del 2002 a julio del 2003. (Tesis licenciatura) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. México* <http://132.248.9.195/ptb2005/11621/0346310/0346310/A1.pdf>

NUTRICIÓN

Efecto del nivel de arginina en el pienso sobre el rendimiento productivo durante el cebo en dos líneas genéticas

Peixoto-Gonçalves C, Sancho FJ, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Moya J, Blas E, Cambra-López M, Pascual JJ

Suplementación de xilanasa en dietas de conejos en crecimiento: Efecto sobre las energías digestible y metabolizable aparentes

Cambra-López M, López MC, Martínez-Paredes E, Pascual JJ, Blas E

Estudio *in vitro* de la digestibilidad y la fermentabilidad de 19 productos de macroalgas marinas en conejos

Buján M, Muiños A, Mirás M, Torres S, Domínguez H, Torres MD, Flórez N, del Pozo R, Núñez C, de Evan T, Jiménez R, Al-Soufi Novo S, López M, Villamide MJ, Carabaño R, Nicodemus N, Carro MD, García J

Efecto del tipo de fibra sobre los rendimientos productivos en gazapos

Cegarra E, Sevilla L, Nicodemus N, García J

Efecto de la suplementación con xilooligosacáridos en el agua de bebida y la restricción alimenticia sobre la digestibilidad fecal aparente y el balance mineral en conejos en cebo

Farias-Kovac C, Nicodemus, Carabaño R, García J

Efeitos de uma restrição alimentar sobre digestibilidade da dieta em coelhos no final do período de engorda

Ribeiro J, Andrade E, Monteiro D, Pinheiro V

Efecto del nivel de arginina en el pienso sobre el rendimiento productivo durante el cebo en dos líneas genéticas de conejo

Effect of dietary level of arginine on growth performance in two rabbit genetic lines

Peixoto-Gonçalves C*, Sancho FJ, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Moya J, Blas E, Cambra-López M, Pascual JJ

Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n. 46022 Valencia, España.

**capeigon@upvnet.upv.es*

Resumen

Se formularon cinco piensos isonutritivos excepto en el contenido en arginina (6.5, 9.6, 11.1, 13.2 y 14.9 g/kg materia seca, para los piensos P1, P2, P3, P4 y P5, respectivamente). Se utilizaron en total 345 conejos destetados (28 días) de las líneas LP y RLP. Los animales se alojaron en jaulas individuales y se alimentaron *ad libitum*. Diariamente se registró la mortalidad y morbilidad y se realizaron controles de peso e ingestión de pienso a los 49 y 63 días. Independientemente de la línea genética, el pienso P1 originó menor ganancia de peso e ingestión de pienso que el resto de los piensos desde los 28 a los 49 días (-25% y -26%, respectivamente, $P < 0.001$). Este menor crecimiento fue solo parcialmente compensado en el periodo de 49 a 63 días, ya que en el conjunto del cebo la ganancia de peso y la ingestión de pienso también fueron menores con el pienso P1 que con los otros piensos (-11% y -15%, respectivamente, $P < 0.001$). No se encontraron diferencias entre los piensos P2, P3, P4 y P5 en cuanto a ganancia de peso, ingestión de pienso e índice de conversión. Así, se puede concluir que las necesidades de arginina para maximizar la ganancia de peso quedan cubiertas con un contenido de 9.6 g/kg materia seca (P2). Por otro lado, la línea RLP presentó mayor ganancia de peso e ingestión de pienso (+34% y +29%, respectivamente, $P < 0.001$) y mejor índice de conversión (-5%, $P = 0.026$) que la línea LP. Sin embargo, la línea LP presentó menor mortalidad que la línea RLP en un brote de trastornos digestivos (20.6% vs 41.5%, $P < 0.001$).

Palabras clave: conejo, crecimiento, arginina, línea genética.

Abstract

Five isonutritive diets were formulated except for the arginine content (6.5, 9.6, 11.1, 13.2 and 14.9 g/kg dry matter for diets P1, P2, P3, P4 and P5, respectively). A total of 345 weaned rabbits (28 days) of the LP and RLP lines were used. The animals were housed in individual cages and fed *ad libitum*. The mortality and morbidity were recorded daily and the weight and feed intake were controlled at 49 and 63 days. Regardless of genetic line, the P1 diet produced a lower weight gain and feed intake than the rest of the diets from 28 to 49 days (-25% and -26%, respectively, $P < 0.001$). This lower growth was only partially compensated from 49 to 63 days, since in the whole growing period the weight gain and feed intake were also lower with the P1 diet than with the rest of the diets (-11% and -15%, respectively, $P < 0.001$). No differences were found between diets P2, P3, P4 and P5 in weight gain, feed intake and conversion rate. Thus, it can be concluded that the arginine requirements for maximum weight gain are covered with 9.6 g/kg dry matter (P2). On the other hand, the RLP line presented higher weight gain and feed intake (+34% and +29%, respectively, $P < 0.001$) and a better conversion rate (-5%, $P = 0.026$) than the LP line. However, the LP line presented lower mortality than the RLP line under a digestive disorders outbreak (20.6% vs 41.5%, $P < 0.001$).

Keywords: rabbit, growing, arginine, genetic line.

Introducción

Existen evidencias de que las necesidades de aminoácidos en animales con diferentes tasas de crecimiento podrían ser diferentes, en base al crecimiento de los distintos tejidos, el crecimiento intestinal y el mantenimiento de la funcionalidad de la mucosa, tanto en otras especies (Armero *et al.*, 1999) como en conejos (Carabaño *et al.*, 2009), siendo previsible que haya diferencias en la relación entre las de mantenimiento y las de crecimiento. Por ello, las recomendaciones actuales sobre el contenido dietario de aminoácidos esenciales podrían estar limitando la expresión del potencial genético de los conejos con alta tasa de crecimiento.

Las recomendaciones sobre el contenido en arginina del pienso para conejos de cebo se basan en estudios de hace más de 45 años (McWard *et al.*, 1967; Colin, 1975; Adamson y Fisher, 1976) y parece razonable comprobar si siguen siendo válidas para las líneas genéticas actuales. El presente trabajo estudia el efecto del nivel de arginina en el pienso sobre el rendimiento productivo durante el cebo en dos líneas genéticas, una maternal y otra paternal.

Material y métodos

Se formularon cinco piensos isonutritivos excepto en el contenido en arginina. Para ello, se elaboró previamente una mezcla basal, a la que se añadieron 0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 g de L-arginina/kg, para obtener un contenido en arginina de 6.5, 9.6, 11.1, 13.2 y 14.9 g/kg MS, para los piensos P1, P2, P3, P4 y P5, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Ingredientes de la mezcla basal (%) y composición de los piensos (g/kg materia seca).

Ingredientes		Composición	P1	P2	P3	P4	P5
Cebada	19.5	Materia seca (g/kg)	884	886	885	886	887
Gluten meal	9.0	Cenizas	76.9	77.4	78.4	73.5	74.7
Salvado trigo	17.4	Proteína bruta	184	188	189	193	199
Heno alfalfa	35.0	Extracto etéreo	31.7	30.9	28.0	28.8	28.4
Pulpa remolacha	11.7	Fibra neutro detergente	384	387	388	387	383
Arbocel®	3.0	Fibra ácido detergente	210	210	209	211	209
Aceite soja	1.0	Lignina ácido detergente	31.1	32.0	31.3	31.4	30.4
L-lisina	0.541	Almidón	179	174	184	177	176
DL-metionina	0.216	Lisina	8.4	8.5	8.5	8.5	8.4
L-treonina	0.177	Metionina	4.5	4.4	4.2	4.4	4.6
L-triptófano	0.100	Cistina	2.5	2.7	2.4	2.5	2.4
L-histidina	0.107	Metionina+Cistina	7.0	7.2	6.6	6.8	7.0
L-arginina	0.036	Treonina	7.2	7.3	7.7	7.7	7.4
Carbonato cálcico	0.073	Isoleucina	5.5	5.4	5.4	5.6	5.3
Fosfato bicálcico	1.326	Valina	7.6	7.5	7.3	7.8	7.5
Cloruro sódico	0.404	Histidina	3.5	3.7	4.0	3.6	3.5
Corrector vitam. y olig.	0.500	Arginina	6.5	9.6	11.1	13.2	14.9

Los animales pertenecían a dos líneas genéticas distintas, la LP (maternal) y la RLP (paternal). La línea LP se fundó con conejas que tenían una carrera reproductiva muy larga y con elevado número de conejos destetados por parto, después ha sido seleccionada por tamaño de camada al destete y se caracteriza por su resiliencia (Sánchez *et al.*, 2008; Saviotto *et al.*, 2015). La línea RLP se ha creado mediante retrocruzamiento de la línea R (seleccionada por ganancia de peso durante el cebo) con la línea LP hasta 7/8 R y 1/8 LP.

Se utilizaron en total 345 conejos destetados a los 28 días, pertenecientes a 69 camadas distintas, distribuidas en cuatro tandas. Los animales se alojaron en jaulas individuales y se alimentaron *ad libitum*. Diariamente se registró la mortalidad y la morbilidad y se realizaron controles de peso e ingestión de pienso a los 49 y 63 días.

Los piensos se analizaron siguiendo los procedimientos de la AOAC (2019) para materia seca (934.01), cenizas (942.05), proteína bruta (990.03) y extracto etéreo (920.39). La fibra neutro detergente, la fibra ácido detergente y la lignina ácido detergente se determinaron secuencialmente según Mertens *et al.* (2002), procedimiento 973.18 de la AOAC (2019) y Robertson y Van Soest (1981), respectivamente. El almidón se analizó mediante una hidrólisis enzimática en doble etapa (Batey, 1982), valorando la glucosa resultante con el sistema hexoquinasa/

glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El contenido de aminoácidos se determinó tras hidrólisis ácida con HCL 6N a 110 °C durante 23 h, según Bosch *et al.* (2006).

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems Institute, 2009). Para el estado sanitario (mortalidad, morbilidad e índice de riesgo sanitario, calculado como mortalidad + morbilidad) se utilizó el procedimiento GENMOD, según un modelo de regresión logística binaria con el pienso, la línea genética, la tanda de cebo y sus interacciones dobles como efectos fijos. Para los parámetros de crecimiento (ganancia de peso, ingestión de pienso e índice de conversión) se utilizó el procedimiento GLM, según un modelo en el que se consideraron el pienso, la línea genética, la tanda de cebo, sus interacciones dobles y su interacción triple como efectos fijos, así como la camada anidada a línea genética y tanda de cebo. Finalmente, en ambos análisis, se eliminaron del modelo todas las interacciones porque sus efectos no fueron significativos.

Resultados y discusión

La mortalidad fue más elevada de lo que se esperaba, como consecuencia de un brote de enteropatía epizootica y, aunque el experimento no estaba dimensionado para evaluar los efectos sobre el estado sanitario, se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos (**Tabla 2**), que puso de manifiesto algunas cuestiones relevantes.

Tabla 2. Efecto del pienso y de la línea genética sobre el estado sanitario de 28 a 63 días.

	Pienso					Línea genética		P-valor	
	P1 (n=61)	P2 (n=77)	P3 (n=68)	P4 (n=71)	P5 (n=68)	LP (n=154)	RLP (n=191)	Pienso	Línea genética
Mortalidad (%)	12.0 ^a	46.4 ^b	27.1 ^{ab}	39.8 ^b	33.1 ^b	20.6	41.4	<0.001	<0.001
Morbilidad (%)	4.9	2.6	1.5	2.8	4.4	3.0	3.0	0.784	0.984
IRS ¹ (%)	16.9 ^a	49.2 ^b	28.8 ^{ab}	42.9 ^b	37.8 ^b	24.3	45.3	<0.001	<0.001

¹ Índice de riesgo sanitario; ^{a,b} Valores con superíndices distintos difieren significativamente, P<0.05.

Así, el pienso P1 dio lugar a menor mortalidad que los restantes (12.0% vs 36.9%, P<0.001), lo que podría estar relacionado con la menor ingestión registrada con este pienso durante las tres primeras semanas de cebo (-26%, **Tabla 3**). Es bien conocido el hecho de que una restricción alimentaria de esta entidad en las semanas siguientes al destete reduce la incidencia de trastornos digestivos y la mortalidad (Gidenne *et al.*, 2012). Por otro lado, la línea LP presentó menor mortalidad que la línea RLP. García-Quirós *et al.* (2014) ya observaron menor mortalidad por trastornos digestivos durante cebo en la línea LP que en otras líneas maternas o paternas, pero no parece que el retrocruzamiento con esta línea haya permitido solucionar del todo la sensibilidad de la línea R a los problemas digestivos.

La **Tabla 3** muestra el efecto del pienso y la línea genética sobre la ingestión de pienso, la ganancia de peso y el índice de conversión durante el cebo.

Tabla 3. Efecto del pienso y de la línea genética sobre el rendimiento productivo de 28 a 63 días.

	Pienso					Línea genética		P-valor	
	P1 (n=49)	P2 (n=38)	P3 (n=47)	P4 (n=38)	P5 (n=41)	LP (n=113)	RLP (n=100)	Pienso	Línea ge- nética
28-49 días									
Ingestión pienso (g MS ¹ /día)	68.5 ^a (2.13)	95.5 ^b (2.46)	89.6 ^b (2.22)	92.8 ^b (2.44)	92.4 ^b (2.32)	78.0 (2.06)	97.3 (2.18)	<0.001	<0.001
Ganancia peso (g/día)	35.9 ^a (1.14)	49.7 ^b (1.31)	46.5 ^b (1.19)	48.3 ^b (1.30)	47.8 ^b (1.23)	39.2 (1.02)	52.0 (1.08)	<0.001	<0.001
Índice conversión (g MS ¹ /día)	1.93 (0.020)	1.91 (0.023)	1.93 (0.021)	1.93 (0.023)	1.94 (0.022)	1.99 (0.027)	1.86 (0.028)	0.942	0.003
49-63 días									
Ingestión pienso (g MS ¹ /día)	130 (2.5)	136 (2.9)	134 (2.6)	136 (2.9)	133 (2.7)	115 (3.0)	153 (3.2)	0.391	<0.001
Ganancia peso (g/día)	49.0 ^b (0.91)	43.9 ^a (1.04)	43.9 ^a (0.94)	44.1 ^a (1.04)	42.7 ^a (0.99)	37.6 (1.05)	51.7 (1.11)	<0.001	<0.001
Índice conversión (g MS ¹ /día)	2.68 ^a (0.062)	3.16 ^b (0.072)	3.09 ^b (0.065)	3.09 ^b (0.064)	3.18 ^b (0.067)	3.09 (0.064)	2.99 (0.064)	<0.001	0.434
28-63 días									
Ingestión pienso (g MS ¹ /día)	93 ^a (2.0)	112 ^b (2.3)	108 ^b (2.0)	110 ^b (2.2)	109 ^b (2.2)	93 (2.3)	120 (2.4)	<0.001	<0.001
Ganancia peso (g/día)	41.2 ^a (0.68)	47.4 ^b (0.79)	45.4 ^b (0.71)	46.6 ^b (0.78)	45.7 ^b (0.74)	38.6 (0.80)	51.9 (0.85)	<0.001	<0.001
Índice conversión (g MS ¹ /día)	2.26 ^a (0.024)	2.36 ^b (0.027)	2.37 ^b (0.025)	2.37 ^b (0.027)	2.39 ^b (0.026)	2.41 (0.029)	2.29 (0.032)	<0.001	0.026

¹ Materia seca; ^{a,b} Valores con superíndices distintos difieren significativamente, P<0.05; Error estándar entre paréntesis.

El pienso P1 dio lugar a una menor ganancia de peso e ingestión que el resto de los piensos en el periodo de 28 a 49 días (-25% y -26%, respectivamente). Este resultado pone de manifiesto que el contenido en arginina del pienso P1 (6.5 g/kg materia seca, 5.7 g/kg materia fresca) es insuficiente para satisfacer las necesidades de arginina para el crecimiento en el periodo post-destete. Este retraso del crecimiento fue parcialmente compensado en el periodo de 49 a 63 días, durante el cual se observó mayor ganancia de peso con el pienso P1 que con el resto de los piensos (+12%) sin cambios relevantes en la ingestión, por lo que el índice de conversión mejoró con respecto al del resto de los piensos (-14%). Este crecimiento compensador es habitual tras periodos de restricción alimentaria tanto cuantitativa como cualitativa (cuando el pienso es deficitario en algún nutriente, como sucede en este caso con la arginina). No obstante, la compensación no llegó a completarse, ya que en el conjunto del cebo la ganancia de peso y la ingestión de pienso fueron menores con el pienso P1 que con el resto de los piensos (-11% y -15%, respectivamente), aunque resultó en un mejor índice de conversión (-4.7%). Gidenne et al. (2012) señalan que la restricción alimentaria en la primera mitad del cebo seguida de alimentación *ad libitum* no permite alcanzar la misma ganancia de peso que en animales alimentados siempre *ad libitum*, pero mejora el índice de conversión.

No hubo diferencias entre los piensos P2, P3, P4 y P5 en lo que se refiere a la ganancia de peso, ingestión de pienso e índice de conversión, así que puede concluirse que las necesidades de arginina para maximizar la ganancia de peso quedan cubiertas con el contenido del pienso P2, es decir, 9.6 g/kg materia seca (8.5 g/kg materia fresca), aunque habría que estudiar la hipótesis de que un contenido inferior fuera suficiente en las últimas semanas del cebo. En estudios anteriores, la ganancia de peso se maximizó con 6 g/kg materia fresca (Adamson y Fisher, 1976) o con 9.8-12.3 g/kg materia fresca (McWard et al., 1967) y la retención de nitrógeno con 10 g/kg materia seca (Colin, 1975). Delgado et al. (2019) no observaron cambios en ganancia de peso o en retención de nitrógeno al aumentar el nivel de arginina de 11.3 a 15.3 g/kg materia seca.

Por otro lado, la línea RLP presentó mayor ganancia de peso e ingestión de pienso que la línea LP, así como mejor índice de conversión (aunque la diferencia en el índice de conversión entre los 49 y 63 días no fue significativa). En el conjunto del cebo, los valores registrados en la línea RLP fueron un 34% y un 29% mayores para la ganancia de peso y la ingestión de pienso, respectivamente, mientras que el índice de conversión fue un 5% menor.

De los resultados del presente trabajo se concluye que: i) independientemente de la línea genética, un contenido de 9.6 g arginina/kg materia seca resulta adecuado para optimizar la ganancia de peso durante el cebo, y ii) la línea RLP muestra mayor ganancia de peso e ingestión de pienso y mejor índice de conversión que la línea LP, en la que se registra menor mortalidad.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España (AGL2017-85162-C2-1-R). También se agradece el contrato concedido por la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana (GRISOLIAP/2019/149) del que Catarina Peixoto-Gonçalves ha sido beneficiaria.

Bibliografía

- Adamson I, Fisher H. 1976. Further studies on the arginine requirement of the rabbit. *J Nutr* 106:717-723.
- AOAC. 2019. *Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists (21st edition)*. AOAC International, Gaithersburg (MD), USA.
- Armero E, Baselga M, Aristoy MC, Toldrá F. 1999. Effects of sire type and sex on pork muscle exopeptidase activity, natural dipeptides and free amino acids. *J Sci Food Agric* 79:1280-1284.
- Batey IL. 1982. Starch analysis using thermostable alpha amylases. *Starch Stärke* 34(4):125-128.
- Bosch L, Alegría A, Farré R. 2006. Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. *J Chromatog B* 831(1-2):176-183.
- Carabaño R, Villamide MJ, García J, Nicodemus N, Llorente A, Chamorro S, Menoyo D, García-Rebollar P, García-Ruiz AI, De Blas JC. 2009. New concepts and objectives for protein-amino acid nutrition in rabbits: A review. *World Rabbit Sci* 17:1-14.
- Colin M. 1975. Effet de la teneur en arginine du régime sur la croissance et le bilan azoté chez le lapin: relation avec le taux de lysine. *Ann Zootech* 24:629-638.
- Delgado R, Nicodemus N, Abad-Guamán R, Menoyo D, García J, Carabaño R. 2019. Effect of arginine and glutamine supplementation on performance, health and nitrogen and energy balance in growing rabbits. *Anim Feed Sci Technol* 247:63-73.
- García-Quirós A, Arnau-Bonachera A, Penadés M, Cervera C, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Selva L, Viana D, Corpa JM, Pascual JJ. 2014. A robust rabbit line increases leucocyte counts at weaning and reduces mortality by digestive disorder during fattening. *Vet Immunol Immunopathol* 161(3-4):123-131.
- Gidenne T, Combes S, Fortun-Lamothe L. 2012. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *Animal* 6:1407-1419.
- McWard GW, Nicholson LB, Poulton BR. 1967. Arginine requirement of the young rabbit. *J Nutr* 92: 118-120.
- Mertens DR. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J AOAC Int* 85:1217-1240.
- Robertson JB, Van Soest PJ. 1981. The detergent system of analysis. En: James WPT, Theander O, (Eds.), *The Analysis of Dietary Fibre in Food*. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 123-158.
- Sánchez JP, Theilgaard P, Mínguez C, Baselga M. 2008. Constitution and evaluation of a long-lived productive rabbit line. *J Anim Sci* 86:515-525.
- Saviotto D, Friggens NC, Pascual JJ. 2015. Reproductive robustness differs between generalist and specialist maternal rabbit lines: the role of acquisition and allocation of resources. *Genet Sel Evol* 47: n° 2.
- Statistical Analysis Systems Institute. 2009. *SAS/STAT® 9.2 User's guide*. SAS Inst. Inc., Cary (NC), USA.

Suplementación de xilanasa en dietas de conejos en crecimiento: Efecto sobre las energías digestible y metabolizable aparentes

Xylanase supplementation in growing rabbit diets: Effect on apparent digestible and metabolizable energies

Cambra-López M*, López MC, Martínez-Paredes E, Pascual JJ, Blas E

Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València, 46022 Valencia, España.

*macamlo@upvnet.upv.es

Resumen

Se realizó un ensayo para evaluar la eficacia de una xilanasa dirigida a mejorar la digestibilidad de los nutrientes de dietas de conejos de cebo. Se utilizaron 34 animales destetados a los 31 días de vida. Cada animal se alojó en una jaula metabólica individual. A los 42 días de vida, los animales fueron asignados a las dietas experimentales (17 animales/tratamiento). Los animales recibieron la dieta experimental *ad libitum* hasta los 53 días de vida. De los 49 a los 53 días de vida, la cantidad total de heces y orina producida por jaula se recogió por separado diariamente. Hubo dos tratamientos experimentales: Tratamiento 1, dieta control negativo (NC) sin xilanasa, y Tratamiento 2, NC + xilanasa proporcionando 1500 unidades de endopentosanasa por kg de alimento. El peso vivo y la ingestión se registraron individualmente. El pienso, las heces individuales y la orina se analizaron para materia seca (MS), materia orgánica (MO) y energía bruta (EB) y se calcularon los coeficientes de digestibilidad aparente de estos nutrientes. Además, se calculó la energía digestible y metabolizable. La inclusión de xilanasa aumentó ($P<0,05$) la digestibilidad de la MS, MO y EB en comparación con la NC y aumentó ($P<0,05$) el contenido de energía digestible y metabolizable en el alimento.

Palabras clave: conejos, engorde, digestibilidad, xilanasa.

Abstract

A trial was conducted to evaluate the efficacy of a xylanase in improving nutrient digestibility of fattening rabbit diets. Thirty-four animals were used. After weaning (at 31 days of age), each animal was housed in an individual metabolic cage. At 42 days of age, animals were assigned to the experimental diets (17 animals/treatment). Animals received the experimental diet *ad libitum* until 53 days of age. From 49 to 53 days of age the total amount of faeces and urine produced per cage was collected separately on a daily basis. There were two dietary treatments: Treatment 1, negative control diet (NC) without xylanase, and Treatment 2, NC + xylanase providing 1500 endopentosanase units per kg feed. Body weight and feed intake were measured individually. Feed, individual faeces and urine were analysed for dry matter (DM), organic matter (OM) and gross energy (GE). The apparent digestibility coefficients of these nutrients were calculated. Additionally, digestible and metabolizable energy were calculated. The inclusion of xylanase increased ($P<0.05$) DM, OM and GE digestibility compared with the NC and increased ($P<0.05$) both digestible and metabolizable energy content in the feed.

Keywords: rabbit, fattening, digestibility, xylanase.

Introducción

Las enzimas exógenas se añaden a los piensos para mejorar la digestibilidad de los nutrientes. Esto supone una mejora del valor nutritivo de las materias primas y del rendimiento de los animales, a través de la mejora del índice de conversión y de la reducción del precio del pienso (Cambra-López y Pascual, 2016). El uso de enzimas exógenas tiene especial interés en los animales jóvenes, que no tienen desarrollado completamente el tracto digestivo, y/o con dietas que incluyen ingredientes con niveles elevados de factores antinutricionales (Cachaldora *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2002).

Las carbohidrasas (como las xilanasas y β -glucanasas, entre otras) pueden contribuir a estos objetivos a través de diferentes mecanismos de acción (Melo-Durán *et al.*, 2019): *i*) la ruptura de los factores antinutricionales y reducción de la viscosidad luminal, evitando la hidratación de los polisacáridos no amiláceos contenidos en cereales como el trigo, cebada o centeno; *ii*) la hidrólisis de polisacáridos no amiláceos insolubles, que encapsulan nutrientes y son liberados, por ejemplo, almidón o proteína en el maíz; *iii*) la liberación de estructuras de oligosacáridos, potencialmente fermentables por la población microbiana que reside a partir del íleon, y modulación de la microbiota; y *iv*) la reducción del flujo y la pérdida de nutrientes endógenos, incluidos los aminoácidos, contenidos en las mucinas intestinales.

A pesar de que el uso de xilanasas podría mejorar la digestibilidad del almidón en conejos de cebo, mejorando el aprovechamiento de la energía del pienso, son escasos los trabajos que han evaluado su efecto y hoy en día no existen enzimas autorizadas en cunicultura (Nutrinews, 2021).

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia de una xilanasas sobre la digestibilidad de la energía. Para ello, se evaluó la digestibilidad de la materia seca (MS), la materia orgánica (MO), las energías digestible (ED) y metabolizable (EM) aparentes en conejos de engorde.

Material y métodos

La prueba se desarrolló en el animalario de la Unidad de Alimentación Animal, de la Universitat Politècnica de València (UPV). El procedimiento de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la UPV y autorizado por la Consellería de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural con el código 2021/VSC/PEA/0044.

Se utilizaron 34 conejos (machos y hembras) de la línea LP de la UPV, que fueron destetados a los 31 días de vida y que procedían de 7 camadas. Los animales se alojaron en jaulas individuales metabólicas (29 x 50 x 32 cm) que estaban provistas de una tolva de pienso individual y un bebedero de tipo cazoleta. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con un pienso comercial desde el destete hasta el día 41 de vida. A partir de este momento, cada jaula se asignó a un tratamiento experimental, teniendo en cuenta que los individuos de una misma camada se distribuyeran equitativamente entre tratamientos. Los dos tratamientos experimentales fueron: Tratamiento 1 (T1) control negativo y Tratamiento 2 (T2) igual al T1 con la adición de xilanasas equivalente a 1500 unidades de endopentanasas (EPU) por kg de pienso.

Los piensos experimentales fueron formulados siguiendo las recomendaciones nutricionales para conejos de engorde (de Blas y Mateos, 2010). Éstos se fabricaron a partir de una mezcla basal común, cuya única diferencia fue la inclusión de la enzima (xilanasas Hostazym X 1500 MG, preparación de endo-1,4-beta-xilanasas producida por una cepa de *Trichoderma citrinoviride* de la empresa Huvepharma NV; dosificada a 100 g/t de pienso). La composición en ingredientes y nutrientes de la mezcla basal se presenta en la **Tabla 1**. Los piensos fueron analizados antes de comenzar la prueba para verificar la actividad enzimática.

Tabla 1. Ingredientes y nutrientes en la dieta basal.

Ingredientes	g/kg	Composición nutricional analizada	g/kg de MS
Trigo	170	Materia seca (MS, g/kg)	892
Salvado de trigo	300	Cenizas	76
Harina de girasol, 30% PB	120	Proteína bruta (PB)	189
Heno de alfalfa	220	Fibra dietaria total	397
Pulpa de remolacha	160	Fibra neutro detergente	315
Aceite de soja	10	Fibra ácido detergente	164
L-lisina HCl	1,5	Lignina ácido detergente	30
DL-metionina	0,5	Fibra soluble	90
Carbonato cálcico	4,0	Almidón	177
Fosfato bicálcico	3,5	Extracto etéreo	34
Cloruro de sodio	4,0	Energía bruta (kcal/ kg de MS)	4069
Bicarbonato de sodio	1,5		
Corrector vitamínico-mineral ¹	5,0		

¹ Premezcla del corrector vitamínico-mineral por kg de alimento: Vitamina A: 12000 IU; Vitamina D3: 2500 IU; Vitamina E: 50 mg; Vitamina K3: 2 mg; Vitamina B1: 2 mg; Vitamina B2: 5 mg; Vitamina B6: 2 mg; Vitamina B12: 20 g; Niacinamida: 30 mg; Acido pantoténico: 10 mg; Ácido Fólico: 1 mg; Cloruro de colina: 300 mg; Biotina: 0,1 mg; Mn: 32 mg; Zn: 30 mg; Cu:10 mg; I: 0,9 mg; Se: 0,25 mg; Fe: 45 mg.

Los piensos experimentales en pellets se administraron *ad libitum* desde el día 42 al 53 de vida, con un periodo de adaptación de 7 días antes del ensayo de digestibilidad, que se realizó del día 49 al 53 de vida (Pérez et al., 1995). El agua de bebida se proporcionó *ad libitum* durante todo el periodo experimental. Los animales se pesaron individualmente al inicio y final del ensayo. La ingestión individual se determinó también durante este periodo.

Durante el ensayo de digestibilidad se recogieron diariamente las heces y la orina por separado. Las heces de cada animal se conservaron en congelación (-20°C) hasta su análisis. La orina se recolectó en una solución de ácido sulfúrico al 10% (asegurando un pH < 3) y se mantuvo también en congelación (-20°C) hasta su análisis.

En el análisis químico de las dietas experimentales se determinó MS, cenizas, fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), lignina ácido detergente (LAD), energía bruta (EB), almidón, proteína bruta (PB) y extracto etéreo (EE). En el caso de las heces y orina individuales se determinó MS, cenizas y EB. Las determinaciones se realizaron de acuerdo con los métodos estándares que establece la AOAC (2019) (procedimiento 934.01 para la MS, 942.05 para las cenizas, 990.03 para la PB método de Dumas, 920.39 para el EE y 991.43 para la FDT). Las fracciones de FND, FAD y LAD se analizaron secuencialmente de acuerdo con Mertens et al. (2002), procedimiento de 973.18 de la AOAC (2019) y Robertson y van Soest (1981), respectivamente. La fibra soluble se determinó según van Soest et al. (1991). El contenido de almidón se determinó de acuerdo con Batey (1982). El contenido de EB fue determinado por calorimetría de bomba adiabática.

Los datos se analizaron estadísticamente utilizando SAS Software 9.3. La jaula fue la unidad experimental. El modelo estadístico incluyó el tratamiento y la camada como efectos fijos, que fue analizado empleado el procedimiento GLM. Los contrastes de medias de grupo entre los tratamientos experimentales frente al control negativo (T1, sin enzima) se realizaron mediante el test de Dunnett. Se indicaron diferencias significativas con $P \leq 0,05$.

Resultados y discusión

La **Tabla 2** muestra los rendimientos productivos de los animales durante el ensayo de digestibilidad. No hubo diferencias significativas en el peso vivo, ganancia de peso, ingestión e índice de conversión. El consumo, crecimiento e índice de conversión observados durante la prueba de digestibilidad fueron los normales para esta línea en las edades descritas, por lo que la enzima fue evaluada en condiciones normales.

Tabla 2. Efecto de la adición de xilanasa en conejos de cebo entre los 42 y 53 días de vida, sobre los rendimientos productivos (peso vivo PV, ganancia media diaria GMD, consumo medio diario CMD e índice de conversión IC).

Tratamiento	PV _{inicial} (g)	PV _{final} (g)	GMD (g/día)	CMD (g/día)	IC
T1 control negativo	1208	1709	45.5	117.8	2.60
T2 control negativo + xilanasa ¹	1199	1687	44.9	115.8	2.62
EEM ²	46.1	59.5	1.79	3.54	0.052
P-valor	0.895	0.794	0.791	0.690	0.742

n = 33 (17 conejos en T1 y 16 conejos en T2). Un animal eliminado por ingestión anormalmente alta; ¹100 g/t de Hostazym X 1500 MG (Huvepharma NV) igual a 1500 unidades de endopentanasas por kg de pienso; ²EEM = Error estándar de la media

La **Tabla 3** muestra los coeficientes de digestibilidad de la MS, la MO y la EB, además del valor de ED y EM en ambos tratamientos. Las dietas de los animales que recibieron xilanasa (T2) mostraron un aumento de 1,1 puntos porcentuales en la digestibilidad de la MS (P=0,055), 1,2 puntos porcentuales en la digestibilidad de la MO (P=0,047) y 1,2 puntos porcentuales en la digestibilidad de EB (P=0,050) en comparación con el control negativo (T1, sin xilanasa). El contenido de ED y EM en el alimento aumentó (P<0,05) con la adición de xilanasa. Las dietas que incluían xilanasa (T2) aumentaron su contenido energético en +52,9 kcal ED/kg (P=0,050) y +61,3 kcal EM/kg (P=0,027) en comparación con la dieta del control negativo (T1, sin xilanasa).

Tabla 3. Efecto de la adición de xilanasa en dietas de conejos de cebo entre los 49 y 53 días de vida, sobre el coeficiente de digestibilidad aparente (%) de la materia seca (dMS), materia orgánica (dMO), energía bruta (dEB), energía digestible (ED; kcal/kg MS) y energía metabolizable (EM; kcal/kg MS) de los piensos experimentales.

Tratamiento	dMS	dMO	dEB	ED	EM
T1 control negativo	67.5	67.7	67.1	2945.6	2842.8
T2 control negativo + xilanasa ¹	68.6	68.9	68.3	2998.5	2904.1
EEM ²	0.39	0.40	0.42	18.55	18.94
P-valor	0.055	0.047	0.050	0.050	0.027

n = 33 (17 conejos en T1 y 16 conejos en T2). Un animal eliminado por ingestión anormalmente alta; ¹100 g/t de Hostazym X 1500 MG (Huvepharma NV) igual a 1500 unidades de endopentanasas por kg de pienso; ²EEM = Error estándar de la media

Los resultados obtenidos están de acuerdo con la bibliografía donde se ha descrito mejoras en la digestibilidad de los nutrientes utilizando complejos multienzimáticos, incluyendo xilanasa, en comparación con un control negativo (Machado *et al.*, 2012; Ayodele *et al.*, 2016; Oloruntola *et al.*, 2018). Estos resultados indican que existe un potencial de las enzimas para mejorar la disponibilidad de nutrientes en las dietas de los conejos de cebo, pero estos datos pueden variar principalmente según el tipo de enzimas utilizadas, su dosis y la composición de la dieta (concentración y tipo de fibra incluida en la dieta).

En conclusión, la suplementación de dietas con xilanasa (1500 EPU por kg de pienso) en conejos de cebo mostró efectos significativamente positivos sobre la digestibilidad de MS, MO y EB (P<0,05) en comparación con un control negativo. La inclusión de la enzima aumentó la utilización de energía a través de un mayor contenido de energía digestible y metabolizable aparentes del pienso (P<0,05).

Agradecimientos

El trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto "Eficacia de una xilanasa en conejos de cebo" financiado por la empresa Huvepharma NV.

Bibliografía

- AOAC, Association of Official Agricultural Chemists. 2019. *Official methods of analysis of the AOAC International (21st edition)*. Gaithersburg, MD (USA): AOAC International.
- Ayodele SO, Oloruntola OD, Agbede JO. 2016. Effect of Alchornea cordifolia leaf meal inclusion and enzyme supplementation on performance and digestibility of rabbits. *World Rabbit Sci.* 24(3):201-206.
- Batey IL. 1982. Starch analysis using thermostable alpha-amylases. *Starch-Stärke* 34:125-128.
- Cachaldora P, Nicodemus N, García J, Carabaño R, de Blas JC. 2010. Efficacy of Amylofeed® in growing rabbit diets. *World Rabbit Sci* 12(1):23-31.
- Cambra-López M, Pascual JJ. 2016. Enzimas en alimentación animal. *Ganadería, Revista Técnica Ganadera* 106:40-44.
- de Blas C, Mateos GG. 2010. Feed formulation. En: de Blas, C., Wiseman, J. (Eds). *The Nutrition of the Rabbit (2nd edition)*. Wallingford, UK: CABI International.
- Gutiérrez I, Espinosa A, García J, Carabaño R, de Blas JC. 2002. Effects of starch and protein sources, heat processing, and exogenous enzymes in starter diets for early weaned rabbits. *Anim Feed Sci Technol* 98(3-4):175-86.
- Machado LC, Ferreira WM, Scapinello C. 2012. Apparent digestibility of simplified and semi-simplified diets, with and without addition of enzymes, and nutritional value of fibrous sources for rabbits. *Rev Bras Zootecn* 41(7): 1662-1670.
- Melo-Durán D, Solà-Oriol D, Villagómez-Estrada S, Pérez JF. 2019. Chapter 20. Enzymes as an alternative to antibiotics: an overview. En: González-Ortiz G, Bedford MR, Bach Knudsen KE, Courtin, CM, Classen HL. (Eds.). *The value of fibre*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, pp. 351-71.
- Mertens DR. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J AOAC Int* 85(6): 1217-1240.
- Nutrinews. 2021. Actualización Tablas de enzimas 2021. <https://nutricionanimal.info/tabla/enzimas/>.
- Oloruntola OD, Ayodele SO, Adeyeye SA, Ogunsipe MH, Daramola OT, Ayedun ES. 2018. Effect of pawpaw leaf meal and multi-enzyme supplementation in the diet on performance, digestibility, and oxidative enzyme status of rabbits. *J Basic Appl Zool* 79(1):26.
- Pérez JM, Lebas F, Gidenne T, Maertens L, Xiccato G, Parigi-Bini R, Dalle Zotte A. 1995. European reference method for in vivo determination of diet digestibility in rabbits. *World Rabbit Sci* 3(1):41-43.
- Robertson JB, van Soest PJ. 1981. The detergent system of analysis. En: James WPT, Theander O, (Eds.), *The Analysis of Dietary Fibre in Food*. Marcel Dekker (NY), pp. 123-58.
- van Soest P., Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74(10): 3583-3597.

Estudio *in vitro* de la digestibilidad y la fermentabilidad de 19 productos de macroalgas marinas en conejos

In vitro study of *in vitro* digestibility and fermentability of 19 seaweed products in rabbits

Buján M¹, Muiños A¹, Mirás M¹, Torres S¹, Domínguez H², Torres MD², Flórez N², del Pozo R³, Núñez C³, de Evan T³, Jiménez R³, Al-Soufi Novo S⁴, López M⁵, Villamide MJ³, Carabaño R³, Nicodemus N³, Carro MD³, García J^{3*}

¹PORTO-MUIÑOS, S.L., Cerceda, A Coruña.

²Dpto. Ingeniería Química, Universidade de Vigo, Ourense.

³Dpto. Producción Agraria, Universidad Politécnica de Madrid.

⁴Dpto. Anatomía, Producción Animal y Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo.

⁵Dpto. Patología Animal, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo.

*javier.garcia@upm.es

Resumen

La producción de gas *in vitro* a 24 h de *Saccharina latissima* deshidratada y su extracto acuoso fueron similares a la de la pulpa de remolacha, mientras que el extracto acuoso del alga hidrolizada incluso produjo más gas que la pulpa (112 vs. 68 ml/g MS sustrato. $P < 0,05$). El extracto acuoso obtenido tras la hidrólisis de *Laminaria ochroleuca* también produjo una cantidad de gas similar a la pulpa, mientras que el resto de algas/extractos produjeron una cantidad de gas que no difirió de la de la paja (5 ml/g MS) salvo el extracto de *Ulva spp.* hidrolizada que tuvo un valor intermedio (30 ml/g MS). La proporción de butirato fue mayor en *Himanthalia elongata* deshidratada y en el extracto acuoso de *Laminaria ochroleuca* hidrolizada que en la pulpa de remolacha ($P < 0,05$). No se observó correlación entre la digestibilidad y la producción de gas *in vitro*.

Palabras clave: macroalgas, composición química, digestión-fermentación *in vitro*, conejos.

Abstract

The *in vitro* gas production at 24 h of dehydrated *Saccharina latissima* and its aqueous extract were similar to that of beet pulp, while its aqueous extract from the hydrolysed algae even produced more gas than the pulp (112 vs. 68 ml/g DM substrate. $P < 0.05$). The aqueous extract obtained after hydrolysis of *Laminaria ochroleuca* also produced a similar amount of gas as the pulp, while the other algae/extract studied produced an amount of gas that did not differ from that of the straw (5 ml/g DM) except for the extract of hydrolysed *Ulva spp.* which had an intermediate value (30 ml/g DM). The proportion of butyrate was higher in dehydrated *Himanthalia elongata* and the extract of hydrolysed *Laminaria ochroleuca* than in beet pulp ($P < 0.05$). No correlation was observed between digestibility and gas production *in vitro*.

Keywords: seaweed, chemical composition, *in vitro* digestibility, fermentability, rabbit.

Introducción

La composición química de las macroalgas marinas es muy compleja y variable, tanto al comparar distintas especies como dentro de la misma especie (Holdt y Kraan, 2011; Samarasinghe et al., 2021). Esta variabilidad depende de la estación del año, del lugar y la profundidad de recogida, y la forma de secado/conservación, etc., lo que hace también muy variable su valor nutritivo (Michel et al., 1996). Las macroalgas se caracterizan

por tener un contenido elevado en agua, minerales y fibra dietética (destacando su contenido en fibra soluble), medio-bajo de proteína y bajo en grasa y azúcares, con presencia de sustancias fenólicas (florotaninos) con capacidad antioxidante pero también inhibitoria de las enzimas digestivas (Kellogg *et al.*, 2014; Neto *et al.*, 2018), lo que implica que su valor energético y proteico no es muy elevado, incluso una vez secas. Por este motivo, las macroalgas marinas se emplean tradicionalmente para alimentar a animales rumiantes en lugares y periodos en los que no hay otra alternativa, mientras que prácticamente no se utilizan en la fabricación de piensos para animales monogástricos, aunque el uso de algunas especies en alimentación humana está aumentando. Los trabajos que estudian el valor nutricional de las macroalgas marinas habitualmente están centrados en rumiantes (Bikker *et al.*, 2020) o en extractos de las mismas, y no conocemos trabajo alguno en gazapos. En estos últimos, el interés de las macroalgas radicaría bien en el posible efecto prebiótico de su fibra fermentable, también muy variable, o en los efectos de algunos de sus compuestos sobre el sistema inmune o la morfología de la mucosa como ya se ha observado en lechones (Sweeney y O'Doherty, 2016).

En la costa gallega se producen (cultivadas o no) y se recogen una gran cantidad y variedad de macroalgas con destino mayoritario a la industria alimentaria. Si bien, algunos productos que no se adaptan bien a la misma podrían tener mayor interés en alimentación animal, como los descartes generados en el procesado de las macroalgas, determinadas especies que no se utilizan, o algunos extractos de las mismas. Por este motivo, y en el contexto del Grupo Operativo TIRAC, el objetivo de este trabajo es identificar cuáles de los 19 productos de algas preseleccionados por la empresa Porto-Muiños pueden tener más interés en piensos de conejos en función de su composición química y su digestibilidad/fermentabilidad *in vitro*.

Material y métodos

Se seleccionaron 19 productos de algas diferentes (**Tabla 1**) procedentes del cultivo (*Saccharina latissima*) o de la recolección (el resto). Mayoritariamente son algas pardas (menos *Ulva spp.*, verde, y *Mastocarpus stellatus*, roja), se deshidrataron a 35-40°C y se molieron con un molino de microestallado (**Tabla 1**). Además, se seleccionó una muestra de pulpa de remolacha y otra de paja (sin tratar) como referentes muy y poco fermentables, respectivamente. Se determinó el contenido en materia seca (MS), cenizas, proteína bruta (nitrógeno \times 5), fibra dietética total (FDT. Método 985.29; AOAC, 2006), fibra neutro detergente (FND), fibra soluble (FDT – FND, ambas libres de ceniza y proteína) y fibra ácido detergente y lignina ácido detergente (de manera secuencial y corregidas por cenizas). Además, se determinó la digestibilidad *in vitro* ileal (no mostrada) y fecal (2 y 3 pasos) de la materia seca y fecal de la proteína (Abad *et al.*, 2013). Finalmente, se determinó la producción de gas *in vitro* de los 19 productos de algas, y de los residuos indigestibles de la digestión *in vitro* a nivel ileal de las muestras con una digestibilidad inferior al 93% (para disponer de muestra) (Ocasio-Vega *et al.*, 2018). Con el fin de tener 4 inóculos distintos, se sacrificaron 4 gazapos de 2,3 kg de peso (\pm 0.03) con 67 días de edad. Se tomaron 8 g de digesta cecal de cada gazapo, con un contenido medio de materia seca de $19,3 \pm 1,3\%$, que se diluyeron en 800 ml de solución tampón. En los botes de fermentación se pesaron 0,2 g MS de sustrato, se añadieron 20 ml del inóculo preparado, para obtener 1 g de ciego fresco/g MS de sustrato, se incubaron a 39°C y se midió la producción de gas a las 3, 8, 12, 24 (única que se muestra), 30, 36, 48, 58, 75, 103 y 119 horas. Se realizó un test de Dunnett para identificar las muestras cuya producción de gas no difirió tanto de la pulpa de remolacha como de la paja. A las 24 h del inicio de la incubación se tomó 1 ml de cada bote para determinar la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), si bien, solo se determinó en las muestras que mostraron mayor producción de gas, y se compararon con los resultados de la pulpa de remolacha mediante un test de Dunnett.

Resultados y discusión

Las 5 macroalgas marinas deshidratadas analizadas mostraron una composición química muy variable (**Tabla 1**), con coeficientes de variación que oscilaron entre el 21 y el 48% para la FDT y la FAD, respectivamente. Los coeficientes de digestibilidad CDMSiv y CDPBiv mostraron valores parecidos a los de la pulpa de remolacha, menos en el caso de *Fucus vesiculosus* que, aun así, tuvo una digestibilidad algo superior a la de la paja. Las digestibilidades *in vitro* de la MS y PB se correlacionaron con el nivel de FAD ($r = -0,97$; $P = 0,005$; $n = 5$) y la proporción de proteína ligada a FDT ($r = -0,96$; $P = 0,011$; $n = 5$), respectivamente, sin mostrar correlación alguna con el nivel de fibra soluble o la producción de gas a las 24 horas ($P \geq 0,54$). Esta última, se correlacionó con la diferencia: $[100 - (\text{cenizas} + \text{PB} + \text{FDT})]$ ($r = 0,96$; $P = 0,011$; $n = 5$). Esta diferencia incluiría la fibra soluble que no precipita con etanol y otros compuestos solubles, dado el reducido contenido de grasa y azúcares de estas macroalgas (Bikker *et al.*, 2020). La producción de gas a 24 h *in vitro* de las algas deshidratadas fue baja, mostrando valores muy parecidos a los de la paja, salvo *Saccharina latissima* que produjo una cantidad de gas similar a la de

la pulpa de remolacha. Los carbohidratos más importantes en esta alga son la laminarina (1,3-β-D-glucanos con ramificaciones con enlaces β1,6, y es de reserva), que es soluble en agua y que podría formar parte de la diferencia calculada previamente, el alginato (combinación de 1,4-β-D-ácido manurónico y 1,4-β-L-ácido gulurónico que es soluble a pH entre 6 y 9) y el manitol (Rupérez *et al.*, 2002; Sharma y Horn, 2016). La hidrólisis enzimática del alga redujo el contenido en FDT y FND en *Ulva spp.* y *Undaria pinnatifida*, pero no en *Fucus vesiculosus* e *Himanthalia elongata*. La digestibilidad in vitro de la MS y PB de las algas mejoró al hidrolizarlas (menos para *Fucus vesiculosus*), si bien esto no se reflejó en una mayor producción de gas/fermentabilidad in vitro.

Los extractos acuosos de las algas (directos o tras hidrólisis enzimática) mostraron una gran variabilidad en su composición química, con un coeficiente de variación que osciló entre el 8 y el 106% para la FND y la FS, respectivamente. Por el contrario, la digestibilidad in vitro de la MS y PB fue muy parecida entre muestras y resultó prácticamente completa, lo que sería atribuible a su naturaleza soluble. Sin embargo, en este caso tampoco se observó correlación alguna entre los valores de digestibilidad y los de producción de gas. Solo los extractos de *Saccharina latissima* y *Laminaria ochroleuca* igualaron o superaron (el extracto acuoso del hidrolizado de *Saccharina latissima*) la producción de gas obtenida con la pulpa de remolacha, mientras que la producción de gas del resto de los extractos no difirió del de la paja (salvo para *Ulva spp.*). Cuando se correlacionaron los valores de producción de gas de las 19 muestras de algas/extractos con su composición química, de nuevo se observó una correlación positiva con la diferencia [100 – (cenizas + PB + FDT)] ($r = 0,71$; $P < 0,001$; $n = 19$) y con la suma de la fibra soluble y la diferencia anterior tanto de forma lineal ($r = 0,79$; $P < 0,001$; $n = 19$) como cuadrática ($R^2 = 0,82$; $P < 0,001$), si bien no se correlacionó con el nivel de fibra soluble ($P = 0,85$). Estos resultados indican la complejidad de caracterizar este tipo de muestras con las técnicas habituales utilizadas para los ingredientes vegetales. Igualmente, la solubilidad no equivale a fermentabilidad en este tipo de muestras, lo que podría estar asociado con sustancias que inhiben la acción de las enzimas (Kellogg *et al.*, 2014; Neto *et al.*, 2018), como con la presencia de compuestos muy fermentables no recogidos en la FDT. La producción de AGV de ninguna de las algas/extractos que se evaluaron fue superior al de la pulpa de remolacha (**Tabla 2**), de hecho, solo las muestras procedentes de *Saccharina latissima* lo igualaron. Como era de esperar, la correlación entre la producción de gas y la de AGV fue elevada ($r = 0,84$; $P = 0,018$; $n = 9$). Cabe destacar que la proporción de butirato fue mayor en el extracto acuoso de *Himanthalia elongata* y en el extracto del hidrolizado de *Laminaria ochroleuca* que en la pulpa de remolacha, lo que podría estar asociado a su contenido en fucoidanos (Sweeney *et al.*, 2011).

Tabla 1. Composición química de los productos de algas, pulpa de remolacha y paja (sobre % MS), digestibilidad in vitro de la materia seca y la proteína (%) y producción de gas en 24 h (ml gas/g MS sustrato; n = 4).

		Cenizas	Proteína	FDT	FND	FS	FAD	LAD	CDMSiv	CDPBiv	Gas 24 h
Algas deshidratadas											
Fucus	<i>Fucus vesiculosus</i>	23,1	10,6	52,7	31,3	21,5	30,7	14,2	42,2	22,6	8,3 [†]
Espagueti de mar	<i>Himanthalia elongata</i>	41,4	9,51	41,7	19,4	22,3	17,8	13,3	63,3	25,1	10,3 [†]
Kombu de azúcar	<i>Saccharina latissima</i>	20,8	7,10	43,1	22,6	20,5	10,1	3,63	74,3	55,6	55,9 [§]
Lechuga de mar	<i>Ulva spp.</i>	27,7	16,4	44,1	21,6	22,5	14,7	7,87	75,3	59,0	16,6 [†]
Wakame	<i>Undaria pinnatifida</i>	50,1	14,8	28,6	17,1	11,6	11,6	7,10	74,6	49,8	3,8 [†]
Alga hidrolizada enzimáticamente											
Fucus	<i>Fucus vesiculosus</i>	28,9	10,6	53,2	30,2	23,0	21,3	15,9	42,7	14,1	2,6 [†]
Espagueti de mar	<i>Himanthalia elongata</i>	45,5	8,92	40,9	15,3	25,6	16,4	12,5	73,3	43,2	2,6 [†]
Kombu	<i>Laminaria ochroleuca</i>	43,4	8,36	33,0	11,2	21,8	11,4	3,85	74,0	64,8	23,3 [†]
Lechuga de mar	<i>Ulva spp.</i>	39,1	13,0	34,1	5,63	28,5	6,07	4,19	91,5	100	11,4 [†]
Wakame	<i>Undaria pinnatifida</i>	58,2	14,2	21,3	5,80	15,5	5,68	4,66	92,1	100	3,2 [†]
Extracto acuoso del alga											
Fucus	<i>Fucus vesiculosus</i>	28,7	8,23	10,4	4,83	5,60	4,72	4,32	98,8	100	8,2 [†]
Espagueti de mar	<i>Himanthalia elongata</i>	55,1	3,74	29,9	0,00	29,9	0,14	0,17	99,4	100	22,3 [†]
Kombu de azúcar	<i>Saccharina latissima</i>	13,6	3,49	64,7	0,00	64,7	0,00	0,00	99,6	100	90,2 [§]
Wakame	<i>Undaria pinnatifida</i>	68,7	8,91	18,6	0,26	18,3	0,17	0,16	99,7	100	6,2 [†]
Extracto acuoso del alga hidrolizada enzimáticamente											
Fucus	<i>Fucus vesiculosus</i>	32,0	9,22	29,5	1,61	27,9	1,51	1,29	97,9	100	29,6 [†]
Kombu	<i>Laminaria ochroleuca</i>	44,4	2,37	2,70	0,54	2,16	0,82	0,77	98,7	100	73,6 [§]
Musgo	<i>Mastocarpus stellatus</i>	31,8	10,4	43,4	2,09	41,3	0,14	0,14	99,1	100	11,4 [†]
Kombu de azúcar	<i>Saccharina latissima</i>	19,3	4,09	2,94	0,00	2,94	0,24	0,18	99,2	100	112
Lechuga de mar	<i>Ulva spp.</i>	34,1	4,88	30,2	0,00	30,2	0,09	0,06	99,0	100	30,0
Ingredientes de referencia											
Paja		8,80	2,90	78,1	74,3	3,79	43,8	4,20	19,8	17,7	5,1 [†]
Pulpa de remolacha		4,70	7,99	71,7	36,5	35,2	23,6	1,91	76,8	68,1	67,7 [§]

Proteína: [Nitrógeno] × 5. FDT: fibra dietética total. FND: fibra neutro detergente corregida por cenizas y proteína. FS: fibra soluble (FDT – FND). FAD: fibra ácido detergente secuencial corregida por cenizas. LAD: Lignina ácido detergente secuencial corregida por cenizas. CDMSiv y CDPBiv: Digestibilidad fecal in vitro de la materia seca y de la proteína. Para la producción de gas las medias que tienen igual superíndice que la pulpa de remolacha (§) o la paja (†) no difieren de estas (P > 0,05). Errores estándar de las medias de producción de gas hasta las 24 horas: 5,35.

Tabla 2. Producción ácidos grasos volátiles in vitro (mmol/L) a las 24 h y relaciones molares (%).

		AGV	Ac	Pr	But	Ibut	Val	Ival	Cap
Algas deshidratadas									
Kombu de azúcar	<i>S. latissima</i>	37,9 [§]	70,1 [§]	25,0 [§]	4,67 [§]	0,08 [§]	0,12 [§]	0,03 [§]	0,00 [§]
Extracto acuoso del alga									
Kombu de azúcar	<i>S. latissima</i>	42,6 [§]	67,8 [§]	20,7 [§]	7,60 [§]	1,22 [§]	1,07 [§]	0,95 [§]	0,60 [§]
Espaguete de mar	<i>H. elongata</i>	14,8	62,1	7,40 [§]	27,1	2,90 [§]	0,47 [§]	0,00 [§]	0,00 [§]
Extracto acuoso del alga hidrolizada enzimáticamente									
Fucus	<i>F. vesiculosus</i>	21,1	82,5 [§]	10,2 [§]	4,07 [§]	1,62 [§]	0,57 [§]	1,07 [§]	0,00 [§]
Kombu	<i>L. ochroleuca</i>	18,0	71,2 [§]	13,8 [§]	14,0	0,67 [§]	0,35 [§]	0,00 [§]	0,00 [§]
Kombu de azúcar	<i>S. latissima</i>	52,2 [§]	74,7 [§]	21,2 [§]	3,77 [§]	0,15 [§]	0,12 [§]	0,03 [§]	0,00 [§]
Lechuga de mar	<i>Ulva spp.</i>	20,5	66,2 [§]	14,6 [§]	8,00 [§]	10,7	0,37 [§]	0,05 [§]	0,00 [§]
Ingredientes de referencia									
Pulpa de remolacha		47,4 [§]	83,4 [§]	14,1 [§]	2,20 [§]	0,17 [§]	0,08 [§]	0,00 [§]	0,00 [§]
Paja		4,20	84,0 [§]	10,2 [§]	5,85 [§]	0,00 [§]	0,00 [§]	0,00 [§]	0,00 [§]
EEM (n = 4)		4,73	6,51	5,57	2,94	0,75	0,33	0,37	0,20

AGV: ácidos grasos volátiles. Ac: Acetato. Pr: Propionato. But: Butirato. Ibut: Isobutirato. Val: Valerato. Ival: Isovalerato. Cap: Caproico. Medias con igual superíndice (§) que la p. remolacha no difieren de esta (P > 0,05).

Agradecimientos

Resultados derivados del grupo operativo TIRAC, proyecto de innovación cofinanciado en un 80% por el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) de la Unión Europea y en un 20% por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en el marco del Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014-2020. La Dirección General de Desarrollo Rural, Innovación y Formación Agroalimentaria (DGDRIFA) es la autoridad encargada de la aplicación de dichas ayudas. Presupuesto total: 492.580,38€. Subvención total: 485.043,58 €.

Bibliografía

- Abad R, Ibáñez MA, Carabaño R, García J. 2013. Quantification of soluble fibre in feedstuffs for rabbits and evaluation of the interference between the determinations of soluble fibre and intestinal mucin. *Anim Feed Sci Technol* 182:61-70.
- Bikker P, Stokvis L, van Krimpen MM, van Wijkelaar PG, Cone JW. 2020. Evaluation of seaweeds from marine Waters in Northwestern Europe for application in animal nutrition. *Anim Feed Sci Technol* 263:114460.
- Holdt SL, Kraan S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J Appl Phycol* 23:543-597.
- Kellogg J, Grace MH, Lila MA. 2014. Polorotannins from Alaskan seaweed inhibit carbolytic enzyme activity. *Mar Drugs* 12:5277-5294.
- Michel C, Lahaye M, Bonnet C, Mabeau S, Barry JL. 1996. In vitro fermentation by human faecal bacteria of total and purified dietary fibres from brown seaweeds. *Br J Nutr* 75:263-280.
- Neto RT, Marçal C, Queirós AS, Abreu H, Silva AMS, Cardoso SM. 2018. Screening of *Ulva rigida*, *Gracilaria sp.*, *Fucus vesiculosus* and *Saccharina latissima* as functional ingredients. *Int J Mol Sci*. 19, 2987.

- Ocasio-Vega C, Abad-Guamán R, Delgado R, Carabaño R, Carro MD, García J. 2018. *In vitro* caecal fermentation of carbohydrate-rich feedstuffs in rabbits as affected by substrate pre-digestion and donors' diet. *World Rabbit Sci* 26:15-25.
- Rupérez P, Ahrazem O, Leal A. 2002. Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem* 50:840-845.
- Samarasinghe MB, van der Heide ME, Weisbjerg MR, Sehested J, Sloth J, Bruhn A, Vestergaard M, Norgaard JV, Hernández-Castellano E. 2021. A descriptive chemical analysis of seaweeds, *Ulva* sp., *Saccharina latissima* and *Ascophyllum nodosum* harvested from Danish and Icelandic waters. *Anim Feed Sci Technol* 278:115005.
- Sharma S, Horn SJ. 2016. Enzymatic saccharification of Brown seaweed for production of fermentable sugars. *Bioresour Technol* 213:155-161.
- Sweeney T, Dillon S, Fanning J, Egan J, O'Shea CJ, Figat S, Gutiérrez JJM, Mannion C, Leonard F, O'Doherty JV. 2011. Evaluation of seaweed-derived polysaccharides on indices of gastrointestinal fermentation and selected populations of microbiota in newly weaned pigs challenged with *Salmonella Typhimurium*. *Anim Feed Sci Technol* 165:85-94.
- Sweeney T, O'Doherty JV. 2016. Marine macroalgal extracts to maintain gut homeostasis in the weaning piglet. *Domest Anim Endocrinol* 56:S84-S89.

Efecto del tipo de fibra sobre los rendimientos productivos de gazapos

Effect of type of fibre on performance of growing rabbits

Cegarra E¹, Sevilla L¹, Carabaño R², García J², Nicodemus N^{2*}

¹De Heus Nutrición Animal SAU, 28046 Madrid, España.

²Dpto. Producción Agraria, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España.

*nuria.nicodemus@upm.es

Resumen

Se formularon 4 piensos con distintos niveles de fibra (fibra neutro detergente/fibra soluble, % MS): Control medicado y control sin medicar (T-1) (41,2/9,4), con mayor nivel de fibra soluble (T-2: 39,9/11,8), o mayor nivel de fibra insoluble (T-3: 43,5/8,6). El experimento se realizó en dos granjas (A: ambiente semi-controlado -24 camadas/tratamiento-, y B: 2 salas de ambiente controlado -10 camadas/sala y tratamiento). En el periodo de cebo en la granja A, la medicación redujo la mortalidad respecto al grupo T-1, mientras que tanto el incremento de la fibra insoluble como de la fibra soluble aumentaron la mortalidad ($P < 0,05$). El grupo alimentado con un mayor nivel de fibra insoluble mostró peores valores de la velocidad de crecimiento (-12%) como del índice de conversión (-19%) respecto a los otros tres grupos ($P < 0,05$). En la granja B se observó en la mortalidad durante el cebo una interacción sala \times tratamiento ($P = 0,037$). En la sala 1 los gazapos de los grupos Control y T-1 mostraron las mortalidades más bajas (1,25% de media), mientras que el grupo con el mayor nivel de fibra soluble mostró la mayor mortalidad (12,5%, $P < 0,05$), observándose un valor cercano para el grupo con mayor nivel de fibra insoluble (10%). En cambio, en la sala 2 el grupo alimentado con mayor nivel de fibra soluble mostró la menor mortalidad, mientras que la mayor se observó en los alimentados con el mayor nivel de fibra insoluble (3,75 vs. 18,7%), obteniendo valores intermedios para los grupos alimentados con el pienso Control y T-1. La velocidad de crecimiento de los grupos no difirió en los grupos Control y T-1, mientras que se redujo un 4% en el grupo con mayor nivel de fibra soluble y un 6% en aquél con mayor nivel de fibra insoluble ($P < 0,05$).

Palabras clave: fibra insoluble, fibra soluble, conejo.

Abstract

Four feeds were formulated with different levels of fibre (neutral detergent fibre/soluble fibre, % DM): medicated Control and unmedicated control (T-1) (41.2/9.4), with higher level of soluble fibre (T-2: 39.9/11.8), or higher level of insoluble fibre (T-3: 43.5/8.6). The experiment was conducted in two farms (A: semi-controlled environment -24 litters/treatment-, and B: 2 controlled environment rooms -10 litters/room and treatment). In the fattening period on farm A, medication reduced mortality compared to the unmedicated control (6.8 vs. 10.7%), while both insoluble and soluble fibre increased mortality (18.9 and 15.3%. $P < 0.05$). The group fed a higher level of insoluble fibre showed worse values for growth rate (-12%) and feed conversion ratio (-19%) than the other three groups ($P < 0.05$). On farm B, a room \times treatment interaction was observed for mortality during fattening ($P = 0.037$). In room 1, rabbits from Control and T-1 groups showed the lowest mortalities (1.25% on average), while the group with the highest level of soluble fibre showed the highest mortality (12.5%, $P < 0.05$), not different from that observed for the group with the highest level of insoluble fibre (10%). In contrast, in room 2, the group fed with the highest level of soluble fibre showed the lowest mortality, while the highest one was observed in those fed with the highest level of insoluble fibre (3.75 vs. 18.7%), obtaining intermediate values for the groups fed with the Control feed and T-1. The growth rate of the groups did not differ in the Control and T-1 groups, while it was reduced by 4% in the group with the highest level of soluble fibre and by 6% in the group with the highest level of insoluble fibre ($P < 0.05$).

Keywords: insoluble fibre, soluble fibre, rabbit.

Introducción

La falta de alternativas a los antibióticos en la producción cunícola supone un gran riesgo para el mantenimiento del sector a corto y medio plazo, ya que su limitación está incrementando las tasas de mortalidad durante el periodo de engorde. En este contexto, las estrategias nutricionales que han demostrado que pueden limitar la incidencia de la enteropatía son la inclusión de niveles moderados de fibra soluble (12%; Trocino *et al.*, 2013), y la reducción de los niveles de proteína (Carabaño *et al.*, 2008). Además, algunos efectos (fibra soluble y proteína) se ha comprobado que pueden actuar de forma sinérgica y mejorar la salud intestinal de los gazapos (Martínez-Vallespín *et al.*, 2011). Dentro de estas recomendaciones también es necesario aportar un mínimo de fibra insoluble (30% de fibra neutro detergente en fresco, FND), pudiendo aumentarse este nivel hasta un 32-35% de FND (Gidenne y García, 2006), pero sin llegar al 36% de FND, donde hay mayor riesgo de enteropatía (Gutiérrez *et al.*, 2002; Farias-Kovac *et al.*, 2020). Por otra parte, en trabajos previos se ha observado cómo los efectos beneficiosos de estas estrategias pueden variar dependiendo de la granja donde se apliquen (Margüenda *et al.*, 2006). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es comprobar en dos granjas con distintas características la eficacia de la inclusión de dos niveles de fibra soluble e insoluble sobre la mortalidad y los rendimientos productivos de gazapos en crecimiento, desde una semana antes del destete hasta el sacrificio, como alternativa a un pienso medicado.

Material y métodos

El experimento se llevó a cabo en dos granjas (A: ambiente semi-controlado, y B: ambiente controlado) en las que los animales fueron alimentados con cuatro tratamientos, cuya composición química se muestra en la **Tabla 1** (C: pienso comercial medicado, 35 ppm valnemulina; T-1: pienso control sin antibiótico; T-2: pienso experimental con un mayor nivel de fibra soluble; T-3: pienso experimental con un mayor nivel de fibra insoluble), desde la última semana antes del destete hasta la semana anterior al sacrificio. La última semana del cebo cada grupo recibió un pienso de acabado con características similares a los piensos de cebo, pero retirando el antibiótico en el pienso C. Los piensos se formularon de acuerdo a las recomendaciones de De Blas y Mateos (2020) e INRA (1989). En la granja A, cada pienso se suministró a 24 conejas (96 jaulas) con sus correspondientes 8-10 gazapos hasta el destete (34 d) y 923 gazapos en total. Una vez destetados, los gazapos se trasladaron a una nave de ambiente semi-controlado manteniéndose agrupados en las mismas camadas, y siguieron consumiendo los mismos piensos. En la granja B, los ensayos se realizaron en dos salas similares. En cada sala, cada tratamiento se asignó a 10 conejas (80 conejas en total) con 8-12 gazapos (757 en total) que, una vez destetados, se mantuvieron en sus jaulas de origen donde permanecieron hasta el sacrificio. El comedero era compartido cada dos jaulas. En este momento, se desecharon los gazapos extremos (los pequeños y grandes) con el fin de que existiera la mayor homogeneidad posible, dejando 8 gazapos por jaula y utilizando un total de 640 animales. En las dos granjas, se controlaron los parámetros productivos y la mortalidad desde una semana antes del destete hasta el final del cebo. En ambos casos el número medio de partos de las conejas fue similar entre tratamientos, y se excluyó a las conejas primíparas. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza que incluyó como factor fijo el tratamiento. En el caso de la granja B, se incluyó también como efecto fijo la sala y la interacción sala × tratamiento. Las medias se compararon mediante un test t protegido. La mortalidad se analizó mediante un modelo logístico.

Tabla 1. Composición química de los piensos de cebo y acabado.

	C	T-1	T-2	T-3
<i>Composición química pienso de cebo, % MS</i>				
Proteína bruta	16,1	16,0	16,0	15,8
Fibra dietética total (FDT) ¹	45,1	45,0	47,6	47,5
Fibra neutro detergente ²	40,9	41,5	39,9	43,5
Fibra ácido detergente ²	25,2	26,5	22,9	25,7
Lignina ácido detergente ²	7,54	6,65	5,33	6,76
Fibra soluble (FDT-FND) ¹	9,51	9,30	11,8	8,63
Almidón	13,6	11,9	12,9	14,3
<i>Composición química pienso de acabado, % MS</i>				
Proteína bruta	16,1	17,1	17,6	16,8
Fibra dietética total ¹	46,9	47,4	49,2	47,5
Fibra neutro detergente ²	39,5	40,8	39,5	41,2
Fibra ácido detergente ²	24,5	24,1	22,8	25,3
Lignina ácido detergente ²	4,88	5,01	4,67	5,85
Fibra soluble (FDT-FND) ¹	8,90	10,0	12,8	8,52
Almidón	12,7	10,9	10,8	13,6

Control: Pienso medicado. T-1: control sin medicar. T-2: Fibra soluble. T-3: Fibra insoluble.

¹ Corregido por cenizas y proteína. ² Análisis secuencial corregido por las cenizas de la lignina.

Resultados y discusión

En la última semana previa al destete no se observaron efectos de los tratamientos en la granja A (**Tabla 2**), si bien se observó una interacción tratamiento × sala en la granja B debido a que los gazapos del grupo T-2 pesaron al inicio menos que los del grupo T-1 ($P < 0,05$, **Tabla 3**). En el periodo de cebo en la granja A, la medicación redujo la mortalidad respecto al control sin medicar, mientras que tanto el incremento de la fibra insoluble y como de la fibra soluble aumentaron la mortalidad ($P < 0,05$, **Tabla 1**). El grupo alimentado con un mayor nivel de fibra insoluble mostró peores valores de la velocidad de crecimiento (-12%) como del índice de conversión (-19%) respecto a los otros tres grupos ($P < 0,05$).

La mortalidad media en la granja B fue inferior a la de la granja A (8,4 vs. 12,9). En la granja B se observó en la mortalidad durante el cebo una interacción sala × tratamiento ($P = 0,037$, **Tabla 3**). En la sala 1 los gazapos de los grupos control y T-1 mostraron las mortalidades más bajas (1,25% de media), mientras que el grupo con el mayor nivel de fibra soluble mostró la mayor mortalidad (12,5%, $P < 0,05$), observándose un valor cercano para el grupo con mayor nivel de fibra insoluble (10%). Estos resultados son paralelos a los obtenidos en la granja A. En cambio, en la sala 2 el grupo alimentado con mayor nivel de fibra soluble mostró la menor mortalidad, mientras que la mayor se observó en los alimentados con el mayor nivel de fibra insoluble (3,75 vs. 18,7%), obteniendo valores intermedios para los grupos alimentados con el pienso control y T-1. La velocidad de crecimiento de los grupos no difirió en los grupos Control y T-1, mientras que se redujo un 4% en el grupo con mayor nivel de fibra soluble y un 6% en aquél con mayor nivel de fibra insoluble ($P < 0,05$). Estos experimentos confirman el riesgo que supone formular piensos con un nivel elevado de fibra insoluble (40% FND sobre %MS), independientemente de la granja. Por su parte, los resultados obtenidos al aumentar la fibra soluble parecen sugerir que su aplicación podría no ser adecuada en todas las circunstancias. Además, se observó que la influencia de la medicación fue menor de la esperada, reduciendo la mortalidad solo en una de las granjas.

Agradecimientos

Resultados derivados del grupo operativo TIRAC, proyecto de innovación cofinanciado en un 80% por el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) de la Unión Europea y en un 20% por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en el marco del Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014-2020. La Dirección General de Desarrollo Rural, Innovación y Formación Agroalimentaria (DGDRIFA) es la autoridad encargada de la aplicación de dichas ayudas. Presupuesto total: 492.580,38€. Subvención total: 485.043,58 €.

Tabla 2. Rendimientos productivos en la granja A.

	Control	T-1	T-2	T-3	EEM	P-valor
N	24	24	24	24		
PM 25 d, g	553	551	570	565	11,3	0,58
27-34 d						
GMDcam, g/d	52,7	46,2	48,5	45,8	2,38	0,16
GMDcam+con, g/d	80,4	66	70,1	66,1	10,6	0,76
CMDcam+con, g/d	880	913	856	946	24,6	0,059
IC, g/g	19,0	17,6	14,7	12,5	5,92	0,87
PM 32 d, g	922	875	909	885	20,6	0,35
Mortalidad, %	2,6	0,43	0	0,44	---	0,19
34-56 d						
GMD, g/d	46,0a	43,2a	38,1b	36,5b	1,66	<0,001
CMD, g/d	150ab	148ab	141a	157b	3,6	0,028
IC, g/g	3,34a	3,51ab	4,09bc	4,48c	0,23	0,003
PM 54 d, g	1935a	1824ab	1739bc	1680c	42,4	<0,001
Mortalidad, %	4,3a	8,1ab	11,0b	11,8b	---	0,023
56-65 d						
GMD, g/d	37,4	38,9	48,4	41,7	3,79	0,17
CMD, g/d	167	159	163	170	4,3	0,34
IC, g/g	4,97	4,77	3,97	4,56	0,33	0,17
PM 63 d, g	2244a	2174a	2163a	2027b	38,0	0,001
Mortalidad, %	2,56a	2,56a	7,93b	3,51a	---	0,015
34-65 d						
GMD, g/d	42,7a	41,9a	40,4a	36,8b	1,15	0,003
CMD, g/d	155ab	151a	148a	161b	3,12	0,039
IC, g/g	3,65a	3,62a	3,68a	4,36b	0,18	<0,001
Mortalidad 34-65 d, %	6,8a	10,7b	18,9c	15,3bc	---	<0,001
Mortalidad 27-65 d, %	9,4a	11,1ab	18,9c	15,8bc	---	0,013

EEM: error estándar de la media. De 27 a 34 d de edad la camada estuvo con la coneja. PM: Peso medio de la camada. GMD: ganancia media diaria. CMD: consumo medio diario. IC: índice de conversión. Control: medicado (35 ppm valnemulina). T-1: control sin medicar. T-2: Fibra soluble. T-3: Fibra insoluble. Cuando el tratamiento fue significativo ($P < 0,05$), las diferencias se indicaron con las letras a-c.

Tabla 3. Rendimientos productivos en la granja B.

Sala	Control		T-1		T-2		T-3		EEM	P-trat	P-sala	P-sala x nave
	1	2	1	2	1	2	1	2				
N	10	10	10	10	10	10	10	10				
PM 26 d, g	604 ^{ab}	567	634 ^a	519	570 ^b	547	587 ^{ab}	563	17,7	0,50	<0,001	0,034
26-32 d												
GMDcam, g/d	51	53,6	56,1	51,8	51,2	49,1	55,7	53,2	1,99	0,13	0,27	0,36
GMDcam+con, g/d	465	453	477	467	477	381	438	467	35,7	0,67	0,37	0,36
PM 32 d, g	910 ^{ab}	942	971 ^a	882	877 ^b	891	921 ^{ab}	936	22,5	0,15	0,65	0,036
Mortalidad, %	1,10	1,08	1,05	1,08	0,00	6,2	3,20	1,10	---	1,00	0,84	0,11
32-58 d												
GMD, g/d	46,3	47,9	45,5	47	45	44,6	41,8	46,3	1,35	0,11	0,06	0,35
PM 58 d, g	2114	2140	2153	2057	2049	2006	2009	2093	40,3	0,056	0,81	0,13
Mortalidad, %	0,00 ^A	7,50 ^A	2,50 ^A	7,50 ^A	12,50 ^{AB}	3,75 ^{AB}	10,0 ^B	18,7 ^B	---	0,041	0,99	0,059
58-65 d												
GMD, g/d	46,8	43,8	50,7	46,7	46,4	43,8	39,6	45,9	3,06	0,29	0,69	0,31
CMD, g/d	156 ^{AB}	169 ^{AB}	171 ^B	185 ^B	155 ^A	141 ^A	153 ^B	180 ^B	8,30	0,006	0,096	0,10
IC, g/g	3,71	3,92	3,39	4,22	3,37	3,34	4,43	4,12	0,41	0,18	0,55	0,55
PM 65 d, g	2442 ^{ab}	2446 ^x	2509 ^a	2384 ^{xy}	2374 ^{ab}	2312 ^y	2286 ^b	2415 ^{xy}	45,8	0,033	0,69	0,047
Mortalidad, %	0,00	2,50	0,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	---			
32-65 d												
GMD, g/d	46,4 ^A	47,0 ^A	46,6 ^A	46,9 ^A	45,3 ^{AB}	44,4 ^{AB}	41,4 ^B	46,2 ^B	1,21	0,043	0,15	0,10
Mortalidad, %	0,00 ^a	10,0 ^{xy}	2,50 ^a	10,0 ^{xy}	12,5 ^b	3,75 ^x	10,0 ^{ab}	18,7 ^y	---	0,99	0,071	0,037

EEM: error estándar de la media. PM: peso medio de la jaula. GMDcam: ganancia media diaria de la camada. GMDcam+con: ganancia media diaria de la camada y la coneja. Cuando el tratamiento fue significativo, las diferencias se indicaron con las letras A-B. Cuando la probabilidad de la interacción tratamiento x nave fue <0.05 se compararon los tratamientos dentro de cada nave indicando las diferencias con letras (a-b: nave 1; x-y: nave 2). De 26 a 32 d de edad la camada estuvo con la coneja. Control: medicado (35 ppm valnemulina). T-1: control sin medicar. T-2: Fibra soluble. T-3: Fibra insoluble. Inicialmente en las jaulas hubo entre 8-12 gazapos. Al destete se dejaron en todas las jaulas 8 gazapos retirándose los gazapos más grandes y más pequeños.

Bibliografía

- Carabaño R, Badiola I, Chamorro S, García J, García-Ruiz A., García-Rebollar P, Gomez-Conde MS, Gutiérrez I, Nicodemus N, Villamide MJ, de Blas JC. 2008. New trends in rabbit feeding: Influence of nutrition on intestinal health. *Span J Agric Res* 6:15-25.
- De Blas C, Mateos G.G. 2020. Feed formulation. *Nutrition of the Rabbit*, 3rd ed.; CABI Publishing CAB International: Wallingford, UK, pp. 243-253, ISBN 978-1-78924-127-3.
- Farias-Kovac C, Nicodemus N, Delgado R, Ocasio-Vega C, Noboa T, Allam-Sayed R, Carabaño C, García J. 2020. Effect of dietary insoluble and soluble fibre on growth performance, digestibility, and nitrogen, energy, and mineral retention efficiency in growing rabbits. *Animals* 10:1346.
- Gidenne T, García J. 2006. Nutritional strategies improving the digestive health of the weaned rabbit. En: Maertens L y Coudert P. (Ed.). *Recent advances in rabbit sciences*. ILVO, Melle, Bélgica, pp. 239-238.
- Gutiérrez I, Espinosa A, García J, Carabaño R, De Blas JC. 2002. Effect of levels of starch, fiber, and lactose on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *J Anim Sci* 80:1029-1037.
- INRA (Institut Nationale de la Recherche Agronomique). 1989. *L'alimentation des Animaux Monogastriques: Porc, Lapin, Volailles*. INRA, Versailles, France.
- Margüenda I, Carabaño R, García-Rebollar P, de Blas C, García-Ruiz A.I. 2006. Effect of the substitution of starch sources or wheat straw with beet pulp on growth performance, mortality and carcass yield, under field conditions. *World Rabbit Sci* 15:43-60.

Martínez-Vallespín B, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Cervera C, Pascual JJ, Blas E. 2011. Combined feeding of rabbit female and young: Partial replacement of starch with acid detergent fibre or/and neutral detergent soluble fibre at two protein levels. Livest Sci 141:155-165.

Trocino A, García J, Carabaño R, Xiccato G. 2013. A meta-analysis on the role of soluble fibre in diets for growing rabbits. World Rabbit Sci 21:1-15.

Efecto de la suplementación con xilooligosacáridos en el agua de bebida y la restricción alimenticia sobre la digestibilidad fecal aparente y el balance mineral en conejos en cebo

Effect of xylooligosaccharides supplementation in drinking water and feed restriction on faecal mineral digestibility and mineral retention efficiency in growing rabbits

Fariás-Kovac C, Nicodemus N, Carabaño R, García J*

Departamento de Producción Agraria, ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid.

*javier.garcia@upm.es

Resumen

Se utilizaron 4 tratamientos estructurados de forma factorial: 2 niveles de xilooligosacáridos (XOS: 0, y 7,5 g/L) × 2 sistemas de alimentación (*ad libitum* y restricción desde 32 a 51 d de edad). El grupo restringido recibió una ración que comenzó siendo del 50% respecto al grupo *ad libitum* el día siguiente del destete y se incrementó linealmente hasta alcanzar el 100% de ingestión de los animales *ad libitum* el día 51 de edad. Se utilizaron 106 gazapos destetados a los 32 d de edad y no se medicaron. Entre los 39 y 43 d y entre los 57 y 60 d de edad se determinó la digestibilidad fecal (8-9/tratamiento). No se observaron interacciones entre la suplementación con XOS y la restricción alimenticia. La suplementación con XOS no afectó al balance mineral en el periodo global. La digestibilidad de los minerales aumentó un 19% ($P < 0,001$) en el grupo restringido (durante la restricción). En el periodo global, la restricción alimenticia redujo ($P \leq 0,018$) un 8% la ingesta de minerales digestibles y la retención de minerales en el cuerpo (5%) y en la canal (2%), siendo todavía mayor la reducción de las pérdidas minerales en piel y vísceras (17%) y heces (24%). Esto supuso que la eficiencia de retención de los minerales digestibles aumentase un 5%. Estos resultados indican que la restricción alimenticia mejora sensiblemente el balance mineral durante el cebo reduciendo la excreción mineral al medio ambiente.

Palabras clave: balance mineral, digestibilidad, restricción alimenticia, xilooligosacáridos.

Abstract

Four factorially structured treatments were used: 2 levels of xylooligosaccharides (XOS: 0, and 7.5 g/L) × 2 feeding systems (*ad libitum* and restricted from 32 to 51 d of age). The restricted group received a ration that started at 50% of the *ad libitum* group on the day after weaning and increased linearly until 100% intake of the *ad libitum* animals at 51 d of age. A total of 106 rabbits weaned at 32 d of age were used and were not medicated. Faecal digestibility was determined between 39 and 43 d and between 57 and 60 d of age (8-9/treatment). No interactions were observed between XOS supplementation and feed restriction. In the overall period, XOS supplementation did not affect the mineral balance. During restriction, mineral digestibility increased by 19% ($P < 0.001$) in the restricted group. In the overall period, feed restriction reduced ($P \leq 0.018$) digestible mineral intake (8%) and mineral retention in the body (5%) and carcass (2%) by 8%, with even greater reductions in mineral losses in skin and viscera (17%) and faeces (24%). This meant that the retention efficiency of digestible minerals increased by 5%. These results indicate that feed restriction improves mineral balance during fattening by reducing mineral excretion to the environment.

Keywords: feed restriction, digestibility, mineral efficiency, rabbit, xylooligosaccharides.

Introducción

La liberación de oligosacáridos procedentes de la degradación de carbohidratos estructurales (Pedersen *et al.*, 2015) puede estar asociada al efecto positivo de la fibra soluble observado previamente cuando se produce un brote de enteropatía (Trocino *et al.*, 2013). En datos previos publicados de este estudio la suplementación de XOS en agua (7,5 g/L) redujo el consumo y la velocidad de crecimiento, y tendió a empeorar la eficiencia en retención del nitrógeno y energía digestibles en la canal, sin afectar a la mortalidad (Farias-Kovac *et al.*, 2021). Por su parte, en este estudio la restricción alimenticia aumentó la eficiencia en retención del nitrógeno y energía digestibles en la canal. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial efecto de los xilooligosacáridos (XOS) y la posible sinergia con la restricción alimenticia sobre la eficiencia en la utilización de la fracción mineral en gazapos en cebo.

Materiales y métodos

Se utilizaron 4 tratamientos estructurados de forma factorial, 2 niveles de XOS en agua × 2 sistemas de alimentación (Restricción -R- y *ad libitum* -AL-). Los niveles de XOS evaluados fueron 0 y 7,5 g/l. Estos XOS han sido suplementados en el agua de bebida de los gazapos, porque en gazapos enfermos el consumo de agua se ve menos afectado que el consumo de pienso el cual se ve claramente reducido en comparación con animales sanos (Delgado *et al.*, 2015). Fue formulado un pienso con características similares a las comerciales con un nivel de 20,3% de proteína, 34,8% FND (corregido por cenizas y proteína), 9,0% de fibra soluble, 15,1% de almidón, 6,4% de cenizas y sin antibióticos. Los XOS fueron suministrados durante toda la duración del experimento. El grupo restringido recibió una ración que comenzó siendo del 50% respecto al grupo *ad libitum* el día siguiente del destete y se incrementó linealmente hasta alcanzar el 100% de ingestión de los animales *ad libitum* el día 51 de edad, inspirado en los sistemas de alimentación estudiados por Duperray y Guyonvarch (2009) y Birolo *et al.* (2016), y los tres días siguientes se les ofreció la misma cantidad ingerida por los gazapos alimentados *ad libitum*. Posterior al día 53 los animales en restricción tuvieron libre acceso al pienso. Para estimar la ración a proporcionarse al grupo en restringido, el consumo de un grupo representativo de animales *ad libitum* era controlado diariamente. Un total de 106 gazapos destetados a los 32 d de edad (687 ± 126 g), y bloqueados por camada, fueron asignados al azar entre los tratamientos. Debido al diseño de las instalaciones de la granja los tratamientos no estuvieron equilibrados (AL/XOS- = 29 gazapos, R/XOS- = 25, AL/XOS+ = 26, R/XOS+ = 26). Los gazapos fueron alojados individualmente, teniendo acceso *ad libitum* al agua, libre de medicación. Entre los 39 y 43 d de edad, y entre los días 57 y 60 d de edad, se determinó la digestibilidad fecal de la fracción mineral, utilizando gazapos elegidos al azar entre los animales que formaban parte del experimento (9/tratamiento). Se determinó la composición corporal y la composición de la canal, mediante la técnica de impedancia bioeléctrica a los 32, 51 y 59 d de edad utilizando las ecuaciones descritas por Saiz *et al.* (2013a, b y 2017). El contenido en minerales del pienso y las heces se cuantificó mediante la determinación de las cenizas. Los balances minerales se estimaron siguiendo la metodología utilizada por Delgado *et al.* (2018). Los datos fueron analizados mediante un modelo mixto que consideró la heterogeneidad de varianzas causada por la restricción y que incluyó como factores fijos el sistema de alimentación, el nivel de XOS y las interacciones entre estos factores, y el peso inicial al destete se incluyó como covariable.

Resultados y discusión

No se observaron interacciones entre la suplementación con XOS y la restricción alimenticia. La suplementación con XOS no afectó la digestibilidad de los minerales (**Tabla 1**), a diferencia del efecto positivo que tuvo sobre otros componentes del pienso como la fibra dietética u otros (Farias-Kovac *et al.*, 2021). Además, tendió a empeorar la eficiencia de retención de los minerales digestibles en la canal durante el periodo de restricción ($P = 0,051$. **Tabla 2**) y tendió a reducir las pérdidas minerales en heces ($P = 0.076$), si bien estos efectos no se observaron al considerar el periodo de cebo completo.

Tabla 1. Efecto de la restricción y la suplementación con xilooligosacáridos sobre la digestibilidad fecal aparente durante la restricción (39-43 d y 57-60 d de edad) en gazapos.

	XOS-		XOS+		Error std ¹		P-valor	
	Ad.Lib	Rest	Ad.Lib	Rest	Ad.Lib	Rest	XOS	Rest
Peso inicial 39 d, g	1167	1007	1122	987	38,9	40,1	0,44	0,001
Consumo, g MS/d	134	104	118	102	7,64	2,00	0,046	<0,001
Digestibilidad fecal aparente, %								
Fibra dietética total	33,4	34,7	36,5	40,1	1,10	1,65	0,005	0,094
Minerales	55,7	65,1	57,1	69,4	3,05	1,74	0,26	<0,001
Peso inicial 57 d, g	2,319	1,933	2,195	2,263	77	68,9	0,17	0,03
Consumo, g MS/d	126	139	123	140	6,36	4,33	0,89	0,014
Digestibilidad fecal aparente, %								
Fibra dietética total	31,9	35,1	31,4	32,7	1,20	1,58	0,31	0,13
Minerales	55,1	50,1	56,8	54,1	1,70	2,20	0,14	0,065

Ad.Lib/XOS- L = sin suplementación XOS, alimentación *Ad libitum*; Rest/XOS- = sin suplementación XOS, restringidos; Ad.Lib/XOS+ = suplementados con XOS, alimentación *Ad libitum*; Rest/XOS+ = suplementados con XOS, restringidos. ¹ n = 8-9 gazapos/tratamiento.

La digestibilidad de los minerales aumentó un 19% ($P < 0,001$) en el grupo restringido (durante la restricción), lo que supera la mejora que experimenta la digestibilidad de la materia seca y energía (6%, Farias *et al.*, 2019). Esta diferencia podría explicarse porque la digestibilidad de la fracción mineral podría beneficiarse más que la de otros componentes del pienso (como la fibra dietética) del incremento del tiempo medio de retención que provoca la restricción alimenticia (Ledin, 1984). Por el contrario, durante el periodo de alimentación *ad libitum* la digestibilidad de la fracción mineral tendió a empeorar ($P = 0,065$), lo que concordaría con lo comentado anteriormente. La digestibilidad de la fracción mineral en el grupo *ad libitum* sin suplementar fue ligeramente superior a la obtenida con un pienso similar (55,1 vs. 50,5%, respectivamente) con un contenido superior de cenizas (8,4% sobre MS) (Farias-Kovac *et al.*, 2020).

En el periodo global, la restricción alimenticia redujo ($P \leq 0,018$) un 8% la ingesta de minerales digestibles (reducción inferior que la de la energía: 12%. Farias-Kovac *et al.*, 2021) así como la retención de minerales en el cuerpo (5%) y en la canal (2%) (ambas inferiores a la de la energía: 11 y 8%), pero se produjo una reducción todavía mayor de las pérdidas minerales en piel y vísceras (17%) y heces (24%). Por su parte, las pérdidas minerales en orina se redujeron un 9% con la restricción. Esto supuso que la eficiencia de retención de los minerales digestibles aumentase un 5%, valor superior al observado para la energía (4%). La eficiencia de retención de la fracción mineral digestible en la canal de los gazapos del grupo *ad libitum* sin suplementar fue similar a la obtenida previamente con un pienso similar (0,258 vs. 0,261, respectivamente) (Farias-Kovac *et al.*, 2020).

Estos resultados indican que la restricción alimenticia mejora sensiblemente el balance mineral durante el cebo reduciendo la excreción mineral al medio ambiente, sin apreciarse efectos relevantes de la suplementación con XOS.

Tabla 2. Efecto de la restricción y la suplementación con xilooligosacáridos (XOS) sobre el balance de la fracción mineral (MI).

	XOS-		XOS+		Error std		P-valor	
	Ad,Lib	Rest	Ad,Lib	Rest	Ad,Lib	Rest	XOS	Rest
N ²	29	25	26	26				
32 - 51 d de edad								
GMD, g/d	64,3	50,8	59,5	48,8	2,82	0,78	0,11	<0,001
CMD, g/d	154	106	149	101	7,50	1,03	0,37	<0,001
Mortalidad, %	17,2	0,0	11,5	0,0	-	-	0,50	0,001
Peso metabólico, PV ^{0,75}	1,22	1,13	1,19	1,12	0,02	0,005	0,11	<0,001
MI digeribles ingeridos, g/kg PV ^{0,75} d, MIDi	4,55	3,82	4,60	3,93	0,19	0,04	0,59	<0,001
MI retenidos, g/kg BW ^{0,75} d, MIR								
MIR cuerpo	1,578	1,301	1,464	1,314	0,04	0,02	0,10	<0,001
MIR canal	1,258	1,150	1,204	1,119	0,03	0,02	0,12	<0,001
Eficiencia de retención de los minerales digeribles								
MIR cuerpo/MIDi	0,353	0,340	0,325	0,335	0,01	0,01	0,079	0,85
MIR canal/MIDi	0,283	0,301	0,267	0,285	0,01	0,01	0,051	0,026
Pérdidas minerales, g MI/kg PV ^{0,75} d								
Piel y vísceras,	0,319	0,151	0,259	0,196	0,03	0,02	0,75	<0,001
Heces	3,39	2,13	3,33	1,83	0,14	0,02	0,076	<0,001
Orina	2,98	2,52	3,14	2,61	0,18	0,04	0,34	<0,001
32 - 59 d de edad								
GMD, g/d	61,0	56,7	59,3	54,2	1,41	0,89	0,076	<0,001
CMD, g/d	164	136	160	130	5,24	1,73	0,18	<0,001
Mortalidad, %	24,1	0,0	15,4	0,0	-	-	1,0	<0,001
Peso metabólico, PV ^{0,75}	1,349	1,324	1,343	1,329	0,03	0,02	0,99	0,42
MI digeribles ingeridos, g/kg PV ^{0,75} d, MIDi	4,29	3,93	4,23	3,89	0,12	0,03	0,56	<0,001
MI retenidos, g/kg BW ^{0,75} d, MIR								
MIR cuerpo	1,348	1,264	1,310	1,251	0,02	0,02	0,15	<0,001
MIR canal	1,088	1,067	1,071	1,037	0,01	0,01	0,42	0,018
Eficiencia de retención de los minerales digeribles								
MIR cuerpo/MIDi	0,319	0,321	0,311	0,322	0,01	0,004	0,57	0,28
MIR canal/MIDi	0,258	0,271	0,255	0,267	0,01	0,003	0,47	0,009
Pérdidas minerales, g MI/kg PV ^{0,75} d								
Piel y vísceras,	0,259	0,196	0,238	0,214	0,02	0,02	0,92	0,008
Heces	3,30	2,52	3,21	2,42	0,14	0,05	0,36	<0,001
Orina	2,94	2,67	2,92	2,64	0,11	0,03	0,74	<0,001

¹ No se encontraron diferencias significativas para la interacción XOS × Restricción (Rest). ² Algunos animales fueron considerados solo para mortalidad debido a desordenes digestivos o datos aberrantes para consumo o impedancia: 3, 1, 4, 2 para los tratamientos Ad.Lib/XOS-, Rest/XOS-, Ad.Lib/XOS+ y Rest/XOS+.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado gracias al proyecto Mineco-FEDER AGL2015-66485-R y al contrato BES-2016-076649.

Bibliografía

- Birolò M, Trocino A, Zuffellato A, Xiccato G. 2016. Effect of feed restriction programs and slaughter age on digestive efficiency, growth performance and body composition of growing rabbits. *Anim Feed Sci Technol* 222:194-203.
- Delgado R, Abad-Guamán R, Nicodemus N, Sastre J, Menoyo D, Carabaño R, García J. 2015. Efecto del nivel de fibra soluble y de la relación omega-6/omega-3 sobre el consumo de agua en gazapos en cebo. En: *Actas del XL Symposium de Cunicultura de ASESCU, Santiago de Compostela*, pp. 90-93.
- Delgado R, Nicodemus N, Abad-Guamán R, Sastre J, Menoyo D, Carabaño R, García J. 2018. Effect of dietary soluble fibre and n-6/n-3 fatty acid ratio on growth performance and nitrogen and energy retention efficiency in growing rabbits. *Anim Feed Sci Technol* 239:44-54.
- Duperray J, Guyonvarch A. 2009. Effet de différents plans de rationnement sur les performances des lapins en engraissement. Intérêt d'un aliment concentré en énergie et protéines. In *Proc. 13 Journées de la Recherche Cunicole*, pp. 59-62. November, Le Mans, France.
- Farias C, Simbaña F, Reyes D, Gallego M, Nicodemus N, Carabaño R, García J. 2019. Efecto de la suplementación con xilooligosacáridos en el agua de bebida y de la restricción alimenticia sobre la digestibilidad y los rendimientos productivos en gazapos en cebo. *Actas del 44 Symposium de Cunicultura, Aranda de Duero*, pp. 60-63.
- Farias-Kovac C, Nicodemus N, Delgad R, Ocasio-Vega C, Noboa T, Abdelrasoul RAS, Carabaño R, García J. Effect of dietary insoluble and soluble fibre on growth performance, digestibility, and nitrogen, energy, and mineral retention efficiency in growing rabbits. *Animals* 10, 1346; doi:10.3390/ani10081346
- Farias-Kovac C, Simbaña F, Reyes M, Carabaño R, Nicodemus N, García J. 2021. Effect of xylooligosaccharides supplementation in drinking water and feed restriction on faecal digestibility, growth traits and energy and nitrogen retention efficiency in growing rabbits. *Proceedings 12th World Rabbit Congress, November 3-5 2021, Nantes, France, Communication N-14*, 4 pp.
- Ledin I. 1984. A note on the effect of different feeding levels on the rate of digesta passage in rabbits. *Acta Agric Scand* 34:67-70.
- Pedersen MB, Yu S, Arent S, Dalsgaard S, Bach Knudsen KE, Larke HN. 2015. Xylanase increased the ileal digestibility of nonstarch polysaccharides and concentration of low molecular weight nondigestible carbohydrates in pigs fed high levels of wheat distillers dried grains with solubles. *J Anim Sci* 93:2885-2893.
- Saiz A, García-Ruiz AI, Martín E, Fernández A, Nicodemus N. 2013a. Aplicación de la técnica de Impedancia Bioeléctrica al estudio de la composición química de la canal de conejos de 35 a 63 días de edad. In: *XXXVIII Symposium de Cunicultura de ASESCU, Zamora, Spain*. pp. 162-165.
- Saiz A, García-Ruiz AI, Martín E, Fernández A, Nicodemus N. 2013b. Evaluación de la técnica de Impedancia Bioeléctrica (BIA) para estimar la composición química de la canal de conejos de 35 a 63 días de edad. In: *XXXVIII Symposium de Cunicultura de ASESCU, Zamora, Spain*. pp. 166-169.
- Saiz A, García-Ruiz AI, Fuentes-Pila J, Nicodemus N. 2017. Application of bioelectrical impedance analysis to assess rabbit's body composition from 25 to 77 days of age. *J Anim Sci* 95:2782-2793.
- Trocino A, García J, Carabaño R, Xiccato G. 2013. A meta-analysis on the role of soluble fibre in diets for growing rabbits. *World Rabbit Sci* 21:1-15.

Efeitos de uma restrição alimentar sobre digestibilidade da dieta em coelhos no final do período de engorda

Efectos de una restricción alimenticia sobre la digestibilidad de la dieta en conejos al final del período de engorde

Effects of a feed restriction on the digestibility in rabbits at the end of the fattening period

Ribeiro J^{1,2}, Andrade E¹, Monteiro D^{1,2,3}, Pinheiro V^{1,2,3*}

¹Departamento de Zootecnia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), ²Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV), ³Al4animals, Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal.

*vpinheir@utad.pt

Resumo

No presente estudo pretendemos avaliar o efeito de uma restrição alimentar moderada, na ingestão e digestibilidade de coelhos sujeitos a uma engorda. O estudo foi realizado no sector de cunicultura da UTAD, Portugal. Foram utilizados 24 coelhos com 62 dias de idade (12 machos e 12 fêmeas) da raça Nova Zelândia Branca x Californiana, que foram controlados até aos 86 dias de idade. Os coelhos foram alojados individualmente e distribuídos de acordo com o sexo, aleatoriamente entre os dois tratamentos; um com alimentação à vontade (grupo *ad libitum*) e outro com alimentação restringida a 80% do grupo *ad libitum* (grupo restringido). Entre os dias 75 e 80 de idade, foi controlada a ingestão e recolhidas as fezes, que foram depois analisadas para calcular a digestibilidade dos componentes da dieta. O sexo dos coelhos não afectou nenhum parâmetro da digestibilidade. A restrição alimentar reduziu significativamente ($P < 0,05$) a ingestão de alimento (-17%) e a excreção de matéria seca (-21%) e aumentou a digestibilidade da proteína (de 71,7 para 76,1%). A digestibilidade da fracção fibrosa e da gordura não foram afectadas. De acordo com os resultados obtidos e de acordo com as condições de realização do trabalho, a restrição alimentar moderada reduziu a ingestão e apenas a digestibilidade da proteína foi melhorada.

Palavras-chave: coelhos, digestibilidade, restrição alimentar.

Resumen

En el presente estudio pretendemos evaluar el efecto de una restricción alimenticia moderada sobre el consumo y la digestibilidad de conejos sometidos a ceba. El estudio se llevó a cabo en el sector de la cría de conejos de UTAD, Portugal. Se utilizaron 24 conejos de 62 días de edad (12 machos y 12 hembras) de la raza New Zealand White x Californian, los cuales fueron controlados hasta los 86 días de edad. Los conejos fueron alojados individualmente y distribuidos según sexo, al azar entre los dos tratamientos; uno con alimentación *ad libitum* (grupo *ad libitum*) y otro con alimentación restringida al 80% del grupo *ad libitum* (grupo restringido). Entre los días 75 y 80 de edad se monitoreó el consumo y se recolectaron las heces, las cuales luego fueron analizadas para calcular la digestibilidad de los componentes de la dieta. El sexo de los conejos no afectó ningún parámetro de digestibilidad. La restricción alimenticia redujo significativamente ($P < 0,05$) el consumo de alimento (-17 %) y la excreción de materia seca (-21 %) y aumentó la digestibilidad de las proteínas (de 71,7 a 76,1 %). La digestibilidad de la fracción fibrosa y la grasa no fueron afectadas. Según los resultados obtenidos y según las condiciones de trabajo, la restricción moderada de alimentos redujo el consumo e solo mejoró la digestibilidad de las proteínas.

Palabras clave: conejos, digestibilidad, restricción alimenticia.

Abstract

In the present study we intend to evaluate the effect of a moderate food restriction on the intake and digestibility of rabbits during a fattening period. The study was carried out in the rabbit farming sector of UTAD, Portugal. 24 rabbits with 62 days of age (12 males and 12 females) of the New Zealand White x Californian breed were used, which were controlled until 86 days of age. Rabbits were housed individually and distributed according to gender, randomly between the two treatments; one with *ad libitum* feed (*ad libitum* group) and another with feed restricted to 80% of the *ad libitum* group (restricted group). Between days 75 and 80 of age, intake was monitored and faeces collected, which were then analyzed to calculate the digestibility of the diet components. The sex of the rabbits did not affect any digestibility parameters. Feed restriction significantly ($P < 0.05$) reduced feed intake (-17%) and dry matter excretion (-21%) and increased protein digestibility (from 71.7 to 76.1%). The digestibility of the fibrous fraction and the fat were not affected. According to the results obtained and according to the conditions of the work, moderate food restriction reduced intake and protein digestibility was improved.

Keywords: rabbits, digestibility, feed restriction.

Introdução

A restrição alimentar durante o período pós-desmame também é geralmente aplicada para reduzir os distúrbios digestivos, ocorrência de enteropatia epizoótica do coelho (ERE) que ocorre na fase inicial da engorda. Esta prática também melhora a eficiência digestiva das dietas (Gidenne *et al.*, 2012), o que melhora o índice de conversão alimentar, sem prejudicar os resultados do abate e as características da carcaça (Birolo *et al.*, 2017). A alimentação dos animais representa a maior percentagem do custo de produção que interessa reduzir e ajustar para produzir com mais eficiência e ter proveitos económicos e ambientais. Assim, importa definir dietas e estratégias alimentares para uma produção mais racional e eficiente (Faria *et al.*, 2008).

O consumo limitado de alimento tem um efeito positivo na eficiência alimentar (Gidenne *et al.*, 2012), pois reduz a deposição de gordura. O trânsito digestivo pode estar também relacionado com a ingestão de alimento, aumentando o tempo médio de permanência do digesta no tubo digestivo e melhorando a utilização digestiva da dieta (Di Meo *et al.*, 2007; Knudsen *et al.*, 2014; Abdel-Wareth *et al.*, 2015). Todavia, os resultados não são consensuais pois a composição da dieta e o nível de restrição, entre outros factores, podem afectar a digestibilidade (Gidenne *et al.*, 2012). Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos do sexo e de uma restrição alimentar sobre a digestibilidade da dieta em coelhos sujeitos a uma engorda prolongada.

Materiais e métodos

Animais e delineamento experimental

O ensaio foi realizado na unidade de produção de coelhos da Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, em Vila Real, Portugal. Durante o trabalho, os animais foram alojados em gaiolas de arame galvanizado com dimensões de 40 cm de profundidade, 25 cm de largura e 30 cm de altura, com bebedouros e comedouros individuais. As gaiolas estavam instaladas num pavilhão fechado, com controlo de temperatura (18 a 23 °C) e foram sujeitos a um fotoperíodo das 7h00 às 19h00, atendendo à legislação de bem-estar aplicada a estes animais (Port. N.º 1005-1092). Foram utilizados 24 animais da raça Nova Zelândia Branca x Californiana com 62 dias de idade (peso vivo médio de 1914g), sendo 12 fêmeas e 12 machos. Foram distribuídos aleatoriamente, de acordo com o sexo, entre os dois tratamentos (grupo alimentação *ad libitum* e grupo alimentação restringida (80% da ração consumida calculada pela ingestão do grupo controlo na semana anterior). Durante o trabalho foi utilizado alimento comercial balanceado, segundo (De Blas e Mateos, 2010), sem substâncias medicamentosas e com a seguinte composição química: 89,3 de matéria orgânica, 16% de proteína bruta, 3,2% de gordura bruta, 40,3% de NDF e 22,0% de ADF.

Os animais foram submetidos a um período de 4 dias de adaptação ao ambiente e dieta alimentar e o ensaio durou três semanas. Semanalmente, durante o período do ensaio foi controlada a ingestão de alimento e a evolução do peso vivo. Diariamente foi distribuído o alimento e os animais foram observados para registo da mortalidade e de outras ocorrências.

Determinações

Entre os dias 75 e 80 de idade foi feita a recolha das fezes e controlada a ingestão de alimento, num grupo de 10 animais por tratamento, tendo em vista a determinação da digestibilidade, de acordo com o método de Perez *et al.* (1995). Amostras de fezes e alimentos foram recolhidas, processadas e posteriormente analisadas (metodologia AOAC, 1990, Van Soest et Robertson, 1991) para determinar a digestibilidade das diferentes fracções; Matéria Seca (MS), Matéria Orgânica (MO), Fibra em Detergente Neutro (NDF), Fibra em Detergente Ácido (ADF), Proteína Bruta (PB) e Gordura Bruta (GB).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa JMP, versão 14 (SAS, 2018). Os dados foram sujeitos a uma análise de variância unilateral (ANOVA) com alimentação, como factor testado, utilizando o procedimento do Modelo Linear Geral. A significância estatística foi aceite para $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

O sexo dos coelhos não afectou a digestibilidade de qualquer das fracções consideradas. Os resultados do efeito da restrição alimentar e sexo nas características da carcaça são apresentados na **Tabela 1**.

A restrição alimentar reduziu a ingestão de matéria seca em cerca de 17% e a excreção de fezes em 21% (expressas em matéria seca). Das restantes fracções da dieta, apenas a digestibilidade da proteína bruta foi afectada, tendo aumentado cerca de 5 pontos percentuais. A restrição não afectou significativamente a digestibilidade da matéria orgânica e da fracção fibrosa, embora tenham melhorado ligeiramente.

Abdel-Wareth *et al.* (2015) e Knudsen *et al.* (2014) observaram um aumento da digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, gordura bruta, NDF e ADF, nos animais sujeitos à restrição alimentar. Já Di Meo *et al.* (2007), não encontraram melhoria na digestibilidade da proteína bruta. As diferenças encontradas entre os resultados do nosso trabalho e outros referenciados na bibliografia, podem ser justificados pelo nível de restrição, idade dos animais do ensaio e composição química da dieta, tal como refere Gidenne *et al.* (2012).

Tabela 1. Efeitos da restrição alimentar na ingestão, excreção e digestibilidade de diversas fracções da dieta

	Alimentação		EPM	Valor de P
	Ad libitum	Restringida		
Ingestão (MS)	164,5	136,5	4,75	<0,001
Excreção (MS)	63,9	50,4	2,68	0,002
Digestibilidade (%)				
Matéria Seca	64,0	65,6	0,94	ns
Matéria Orgânica	65,7	67,4	0,93	ns
Proteína Bruta	71,7	76,1	1,21	0,018
Gordura Bruta	86,3	86,1	1,19	ns
Fibra Neutro Detergente	37,8	40,0	1,52	ns
Fibra Ácido Detergente	22,2	24,9	1,59	ns
Celulose	17,3	20,0	4,70	ns

EPM: erro padrão da média. $P < 0,05$: diferença significativa. ns: não significativo

Em conclusão, a restrição alimentar reduziu a ingestão de alimento e a excreção de fezes, aumentou a digestibilidade da proteína da dieta e não afectou a digestibilidade da fracção fibrosa.

Agradecimentos

Para os investigadores pertencentes ao CECAV, a participação foi suportada pelos projetos UIDB/CVT/00772/2020 e LA/P/0059/2020 financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

Bibliografia

- Abdel-Wareth A, Saskia Kehrausn SK, Abdalla A, Zeinhom I, Südekum K-H. 2015. Effects of temporary intensive feed restriction on performance, nutrient digestibility and carcass criteria of growing male Californian rabbits. *Arch Anim Nutr* 69:69-78.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Birolo M, Trocino A, Tazzoli M, Xiccato G. 2017. Effect of feed restriction and feeding plans on performance, slaughter traits and body composition of growing rabbits. *World Rabbit Sci* 25:113-122.
- De Blas C, Mateos GG. 2010. Feed formulation, In: De Blas JC, Wiseman J. (Eds.). *The Nutrition of the rabbit*, 2 edição. CAB International. Oxfordshire, UK, pp. 222-232.
- Di Meo C, Bovera F, Marono S, Vella N, Nizza A. 2007. Effect of feed restriction on performance and feed digestibility in rabbits, *Ital J Anim Sci* 6:sup1: 765-767.
- Faria HG, Ferreira WM, Scapinello C, Oliveira CEA. 2008. Efeito da utilização de dietas simplificadas, à base de forragem, sobre a digestibilidade e o desempenho de coelhos Nova Zelândia. *R Bras Zootec* 37(10):1797-1801.
- Gidenne T, Combes S, Fortun-Lamothe L. 2012. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *Animal* 6:1407-1419.
- Knudsen C, Combes S, Briens C, Coutelet G, Duperray J, Rebours G, Salaun JM, Travel A, Weissman D, Gidenne T. 2014. Increasing the digestible energy intake under a restriction strategy improves the feed conversion ratio of the growing rabbit without negatively impacting the health status. *Livest Sci* 169:96-105.
- Perez JM, Lebas F, Gidenne T, Maertens L, Xiccato G, Parigi Bini R, Dalle Zotte A, Cossu ME, Carazzolo A, Villamide M.J, Carabano R, Fraga MJ, Ramos MA, Cervera C, Blas E, Fernandez Carmona J, Falcão-e-Cunha L, Bengala Freire J. 1995. European reference method for in vivo determination of diet digestibility in rabbits. *World Rabbit Sci* 3:41-43.
- SAS Institute. 2018. JMP® 14. SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.
- Van Soest JP, Robertson JB, Lewis BA 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74:3583-3594.

REPRODUCCIÓN

Rendimiento reproductivo de las conejas de líneas paternas: reconciliando crecimiento y resiliencia

Peixoto-Gonçalves C, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Blas E, Cambra-López M, Pascual JJ

Renovación de grupos completos de reproductoras y utilización de multiparas como reposición ocasional: Resultados reproductivos y de mortalidad

López M, Campo MM, Olleta JL, Campanales M, Resconi VC

Inducción de ovulación de conejas con rrβNGF microencapsulado

Quiroga AC, García-García RM, Arias-Álvarez M, Gimeno-Martos S, Lorenzo PL, Rebollar PG

Caracterización de exosomas en el plasma seminal de conejos fértiles y subfértiles: resultados preliminares

Sakr OG, Cañón-Beltrán K, Cajas YN, Rizos D, Rebollar PG

Inseminación Artificial como alternativa reproductiva para la cunicultura dominicana: Valoración técnica y económica en granja de conejos (*Oryctolagus cuniculus*), bajo condiciones comerciales

Durán M, Choque J, Ariztegui M, Guzman N

Rendimiento reproductivo de las conejas de líneas paternas: reconciliando crecimiento y resiliencia

Reproductive performance of rabbit females from paternal lines: reconciling growth rate and resilience

Peixoto-Gonçalves C*, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Blas E, Cambra-López M, Pascual JJ

Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n. 46022 Valencia, Spain.

**capeigon@upvnet.upv.es*

Resumen

Para este experimento se utilizaron los datos de 197 conejas pertenecientes a tres líneas paternas, R, RF y RLP. La línea R ha sido seleccionada por velocidad de crecimiento durante el período de engorde durante 36 generaciones, la línea RF se fundó a través de una elevada intensidad de selección de animales élite de la línea R y la línea RLP, que se obtuvo por retrocruzamientos de animales RF con la línea LP. La LP es una línea maternal longevo-productiva, caracterizada por una elevada resiliencia. Se controló el peso corporal, el espesor de la grasa perirrenal, la ingestión y la producción de leche de las hembras desde el primer hasta el tercer parto. Las hembras RF fueron más ligeras que las R y RLP (en media de -5.0%; $P < 0.05$). En general, las conejas RLP produjeron más leche que las R y RF a lo largo del experimento (en media +18.5%; $P < 0.001$). Los resultados obtenidos permiten concluir que la fundación de una línea paternal con animales élite parece favorecer la reproducción temprana. Sin embargo, la introducción de genética resiliente permitió mejorar casi todos los parámetros reproductivos de las hembras.

Palabras clave: reproducción, genética, velocidad de crecimiento, robustez, conejo.

Abstract

For this trial, data from 197 does belonging to three paternal lines, R, RF and RLP, were used. The R line was selected for growth rate during the growing period for 36 generations, the RF line was founded through a high selection intensity of elite animals of the R line and the RLP line, which was obtained by backcrossing RF animals with the LP line. The LP is a longevous-productive maternal line, characterised by high resilience. Body weight, perirenal fat thickness, ingestion, and milk production of females from the first to third parturition were monitored. RF females were lighter than R and RLP females (on av. -5.0%; $P < 0.05$). In general, RLP rabbit females yielded more milk than R and RF throughout the trial (on av. +18.5%; $P < 0.001$). The results obtained allow us to conclude that the foundation of a paternal line with elite animals seems to favour early reproduction. However, the introduction of resilient genetics allows to improve almost all the reproductive traits of the females.

Keywords: reproduction, genetic, growth rate, robustness, rabbit.

Introducción

La selección por velocidad de crecimiento en conejos ha permitido una mejora en la ganancia media diaria (GMD) cercana a los 1.2 g/d por generación de selección (De Rochambeau *et al.*, 1989; Estany *et al.*, 1992; Piles y Blasco, 2003), pero algunos autores indican que el progreso genético ha sido inferior al esperado en los últimos años (Blasco *et al.*, 2018). Además, este criterio de selección se ha relacionado con posibles consecuencias negativas en los parámetros reproductivos de sus animales. Algunos trabajos muestran respuestas insatisfactorias a la ovulación y pérdidas exacerbadas durante la implantación embrionaria de las conejas de una línea paternal

(Vicente *et al.*, 2012; Naturil-Alfonso *et al.*, 2015). Además, los machos de una línea paternal de conejos mostraron un comportamiento sexual anormal, como baja libido y conteo de espermatozoides (Pascual *et al.*, 2004).

El grupo de Mejora Genética de la Universitat Politècnica de València ha desarrollado dos líneas genéticas experimentales dirigidas a mejorar el progreso genético y la resiliencia de las líneas paternas, mediante la fundación de una nueva línea a partir de una población de animales de élite (RF; crecimiento elevado y buena reproducción) y la creación una otra línea mediante el retrocruzamiento de estos animales élite con una línea maternal caracterizada por una elevada robustez (RLP). En un primer trabajo de nuestro grupo (Gonçalves *et al.*, 2021) observamos que la línea RF mejoró su fertilidad durante el primer ciclo reproductivo, y la RLP tuvo una fertilidad elevada a lo largo de los 3 primeros ciclos y una mayor supervivencia tanto de las hembras como de las camadas.

El objetivo de este trabajo es conocer cómo gestionan los recursos las conejas de dichas líneas para relacionarlo con los resultados reproductivos obtenidos.

Material y métodos

El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universitat Politècnica de València (UPV) y se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del European Group on Rabbit Nutrition (Fernández-Carmona *et al.*, 2005) y el Real Decreto español 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos.

Durante el experimento se utilizaron dos piensos comerciales, uno para conejas jóvenes en crecimiento hasta el primer parto (con un 15,82% de proteína bruta 15.82%; y un 23.08% de fibra bruta) y otra para conejas reproductoras hasta el tercer parto (con un 19.33% de proteína y un 16.89% de fibra bruta). Los animales fueron alimentados *ad libitum* a lo largo del experimento y las camadas fueron estandarizadas al parto. Se utilizaron los datos de 197 hembras de las líneas R, RF y RLP. La línea R fue seleccionada por velocidad de crecimiento en el periodo de engorde durante 36 generaciones (Estany *et al.*, 1992), la línea RF se fundó a partir de una población de animales de élite obtenida de diferentes núcleos, eligiendo aquellos que mostraron una alta velocidad de crecimiento y buenos índices de reproducción. La línea RLP fue fundada por retrocruzamiento de la línea RF y la línea maternal LP, generando animales con 7/8 de RF y 1/8 de RLP.

Desde la primera inseminación artificial (IA) y hasta el tercer parto, se controló el peso vivo, la grasa perirrenal y la ingestión de pienso de las conejas a la primera IA, y al parto y a los 18 y 28 días post parto (dpp). La producción de leche de la coneja se controló 5 días semanales durante las dos primeras lactaciones.

Los datos de las conejas fueron analizados mediante un modelo mixto que incluyó los efectos de línea genética, el número de parto, la estación del año como efectos fijos y sus interacciones (PROC MIXED de SAS, 2009), y los efectos permanentes del animal (p) y el término de error (e), asumiendo que ambos tuvieron una media de 0 y una varianza σ_p^2 y σ_e^2 , respectivamente.

Resultados y discusión

En la **Tabla 1** podemos observar los efectos del tipo genético en la productividad de las hembras, desde la primera IA hasta el tercer parto.

Tabla 1. Efecto del tipo genético sobre algunos parámetros reproductivos de las conejas hasta su tercer parto.

	Tipo Genético		
	R	RF	RLP
No. observaciones	65	63	69
Peso vivo (g):			
Primer IA	5578 ± 71 ^b	5328 ± 71 ^a	5586 ± 72 ^b
Parto	5555 ± 74 ^b	5237 ± 67 ^a	5570 ± 64 ^b
18 dpp	5950 ± 85 ^b	5645 ± 75 ^a	5914 ± 78 ^b
28 dpp	5951 ± 87 ^b	5694 ± 77 ^a	5995 ± 80 ^b
Grosor de la grasa perirenal (mm):			
Primer IA	8.87 ± 0.09	8.80 ± 0.09	8.74 ± 0.09
Parto	8.35 ± 0.09 ^a	8.45 ± 0.08 ^{ab}	8.60 ± 0.08 ^b
18 dpp	8.71 ± 0.10	8.79 ± 0.09	8.81 ± 0.09
28 dpp	8.80 ± 0.1	8.86 ± 0.09	8.95 ± 0.09
Ingestión (g MS/d):			
Gestación	198.1 ± 4.4 ^b	185.8 ± 3.8 ^a	210.6 ± 3.6 ^c
0 - 18 dpp	304.3 ± 8.9	312.3 ± 7.9	321.8 ± 8.0
19 - 28 dpp	341.7 ± 11.3 ^a	341.0 ± 10.1 ^a	371.1 ± 10.3 ^b
Producción de leche (g/d):			
1 - 18 dpp	132.2 ± 6.4 ^a	139.0 ± 5.1 ^a	158.3 ± 4.9 ^b
19 - 28 dpp	147.5 ± 7.6 ^a	153.0 ± 6.8 ^a	182.4 ± 6.9 ^b

^{a,b,c} Las medias que no comparten superíndice en una misma línea fueron significativamente diferentes a $P < 0.05$.

Las hembras de la línea RF fueron significativamente más ligeras que las hembras R y RLP a lo largo de la prueba (en promedio -4.6, -5.9, -4.8 y -4.7% en la primera IA, parto, 18 y 28 dpp, respectivamente; $P < 0.05$). En general, el tipo genético no pareció afectar significativamente la condición corporal de las hembras, pero las hembras de la línea RLP mostraron un grosor de la grasa perirrenal más elevado que las hembras R al parto (+3,0%; $P < 0,05$). Estos resultados pueden estar relacionados con cambios en la gestión de recursos por parte de las conejas al introducir la genética LP. Varios trabajos previos (Savietto *et al.*, 2015; Arnau-Bonachera *et al.*, 2018) han mostrado que las conejas LP son capaces de ajustar la adquisición de recurso para disponer una condición corporal que le permitiese asegurar su permanencia en el rebaño. De hecho, Savietto *et al.* (2016) observa que las conejas que se quedaron preñadas durante la lactación tuvieron un mayor grosor de la grasa perirrenal en dicho parto, y Gonçalves *et al.* (2021) para estas mismas conejas observa una mayor fertilidad y supervivencia de las conejas de la línea RLP respecto a la R.

La ingestión diaria durante la gestación de las hembras de la línea RLP fue más elevada que la de las hembras de la línea RF (+6.3%; $P < 0,001$) y esta última más elevada que la de las hembras de la línea R (+6.6%; $P < 0,001$). Durante los últimos 10 días de lactación, las hembras de la línea RLP mostraron una mayor ingestión que los otros tipos genéticos (en promedio +8.7%; $P < 0.05$), esto debido principalmente a su mayor ingestión durante la segunda lactación (**Figura 1 izquierda**). Varios estudios realizados con anterioridad han mostrado que las conejas de la línea LP mostraban una mayor capacidad de ingestión durante la lactación que las hembras de otras líneas maternas (Savietto *et al.*, 2015).

En general, las hembras de la línea RLP produjeron más leche que los otros tipos genéticos durante toda la lactación (en promedio +18.5%; $P < 0.001$). Sin embargo, tanto las hembras RF como las RLP produjeron más leche que las hembras R durante el primer ciclo, mientras que las hembras RLP produjeron más leche que las hembras RF y R durante el segundo ciclo (**Figura 1 derecha**). Arnau-Bonachera *et al.* (2018) observó que las conejas de la línea R parecen priorizar la recuperación de la condición corporal sobre las necesidades de la descendencia en comparación con otras dos líneas maternas, por lo que podría ser el motivo que la producción de leche sea inferior a la esperada para su peso metabólico.

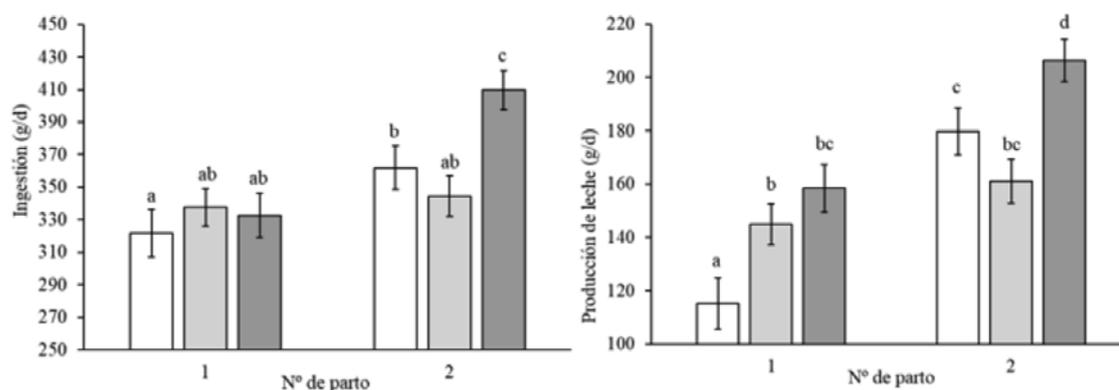


Figura 1. Efecto del tipo genético (R ◻, RF ◐ and RLP ◑) sobre la ingestión (izquierda) y la producción de leche (derecha) de las conejas durante las dos primeras lactaciones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen indicar que la fundación de una nueva línea paterna utilizando animales de élite podría generar hembras más ligeras con una mejor reproducción temprana, con una mejor fertilidad (Gonçalves *et al.*, 2021) y producción de leche durante el primer ciclo reproductivo. Sin embargo, la introducción de genética resiliente en la línea paterna a través del retrocruce con la línea robusta LP, ha aumentado la capacidad de las hembras para obtener y utilizar eficazmente los recursos, lo que les permite mantener un adecuado desarrollo de sus camadas, sin comprometer su reproducción y supervivencia (Gonçalves *et al.*, 2021).

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España (AGL2017-85162-C2-1-R). También se agradece el contrato Grisolia de Catarina Peixoto Gonçalves de la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana (GRISOLIAP/2019/149).

Bibliografía

- Arnau-Bonachera A, Cervera C, Blas E, Larsen T, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Pascual JJ. 2018. Long-term implications of feed energy source in different genetic types of reproductive rabbit females: I. Resource acquisition and allocation. *Animal* 12:1867-1876.
- Blasco A, Nagy I, Hernández P. 2018. Genetics of growth, carcass and meat quality in rabbits. *Meat Sci* 145:178-185.
- De Rochambeau H, de La Fuente LF, Rouvier R, Ouhayoun J. 1989. Sélection sur la vitesse de croissance post-sevrage chez le lapin. *Genet Selec Evol* 21:527-546.
- Estany J, Camacho J, Baselga M, Blasco A. 1992. Selection response of growth rate in rabbits for meat production. *Genet Selec Evol* 24:527-537.
- Fernández-Carmona J, Blas E, Pascual JJ, Maertens L, Gidenne T, Xiccato G, García J. 2005. Recommendations and guidelines for applied nutrition experiments in rabbits. *World Rabbit Sci* 13:209-228.
- Gonçalves C, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Blas E, Cambra-López M, Pascual JJ. 2021. Parámetros reproductivos de 3 líneas paternas con distinto potencial de crecimiento y resiliencia. En: 45º Symposium de Cunicultura, virtual, pp. 108-113.
- Naturil Alfonso C, Marco Jiménez F, Jiménez Trigós E, Saenz de Juano MD, Viudes de Castro MP, Lavara R, Vicente JS. 2015. Role of embryonic and maternal genotype on prenatal survival and foetal growth in rabbit. *Reprod Domest Anim* 50:312-320.
- Pascual JJ, García C, Martínez E, Mocé E, Vicente JS. 2004. Rearing management of rabbit males selected by high growth rate: the effect of diet and season on semen characteristics. *Reprod Nut Develop* 44:49-63.

Piles M, Blasco A. 2003. Response to selection for growth rate in rabbits estimated by using a control cryopreserved population. World Rabbit Sci 11:53-62.

Savietto D, Friggens NC, Pascual JJ. 2015. Reproductive robustness differs between generalist and specialist maternal rabbit lines: the role of acquisition and allocation of resources. Genet Select Evol 47: 2.

Savietto D, Marono S, Martínez I, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Cervera C, Pascual JJ. 2016. Patterns of body condition use and its impact on fertility. World Rabbit Sci 24:39-45.

SAS Institute. 2009. SAS/STAT® 9.2 User's Guide; Sas Institute Inc.: Cary, NC, USA.

Vicente JS, Llobat L, Viudes-De-Castro MP, Lavara R, Baselga M, Marco-Jiménez F. 2012. Gestational losses in a rabbit line selected for growth rate. Theriogenology 77:81-88.

Renovación de grupos completos de reproductoras y utilización de múltiparas como reposición ocasional: Resultados reproductivos y de mortalidad

Renewal of does as a whole group and use of multiparous females as occasional replacement: reproductive and mortality results

López M^{1*}, Campo MM¹, Olleta JL¹, Campanales M², Resconi VC¹

¹Dept. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España.

²Campanales Balaguer Agrícola SL., 50793 Fabara, Zaragoza, España.

*marina@unizar.es

Resumen

Para evitar jaulas vacías y conejas poco productivas, se recomienda una reposición anual del 120%, que supone la incorporación periódica de nulíparas. En este trabajo se propone la renovación de grupos completos de reproductoras utilizando múltiparas como reposición, analizándose los resultados reproductivos y de mortalidad en una granja comercial que implementó este manejo. Los datos corresponden a 1854 jaulas-madre distribuidas en cuatro naves durante 2019-20. Los grupos se constituyeron con nulíparas y se mantuvieron sin reposición hasta el quinto parto para mejorar la bioseguridad. Desde el sexto parto las hembras muertas+desechadas se repusieron con múltiparas productivas y sanas procedentes de otros grupos que finalizaban como tales. La sobreocupación en los lotes recién constituidos fue de 149,0%, con una media de 131,7% en el periodo analizado, que está bien ajustada a la fertilidad de la granja (75,5%). Una moderada prolificidad (8,57 gazapos/parto) se acompañó de muy baja mortalidad al nacimiento y en lactación: 0,94% y 8,12% respectivamente. La mortalidad+eliminación de las madres fue de 5,23% en cada ciclo de 42 días. Se obtuvieron 7,82 gazapos destetados/parto como media. El manejo propuesto proporciona una baja mortalidad general y una extraordinaria longevidad en las madres respecto al manejo convencional.

Palabras clave: bioseguridad, longevidad, manejo reproductivo alternativo, reposición con múltiparas, mortalidad.

Abstract

To avoid empty cages and unproductive does, an annual replacement of 120% is recommended, which means the periodic incorporation of nulliparous does. In this work, the renewal of complete groups of reproducers using multiparous as replacement is proposed, analyzing the reproductive and mortality results in a commercial farm that implemented this management. The data correspond to 1854 mothers' cages distributed in four buildings during 2019-20. The groups were made up of nulliparous does and were kept without replacement until the fifth parturition to improve biosecurity. From the sixth parturition, the dead+discarded females were replaced with productive and healthy multiparous does from other groups that ended as such. The occupation rate in the newly constituted batches was 149.0%, with an average of 131.7% in the analyzed period, which is well adjusted to the fertility of the farm (75.5%). A moderate prolificacy (8.57 kits/parturition) was accompanied by very low mortality at birth and in lactation: 0.94% and 8.12%, respectively. The mothers' mortality+culling was 5.23% in each cycle of 42 days. An average of 7.82 weaned rabbits/parturition were obtained. The proposed management provides low overall mortality and extraordinary longevity in mothers compared to conventional management.

Keywords: biosecurity, longevity, alternative reproductive management, replacement with multiparous, mortality.

Introducción

Para evitar jaulas vacías y conejas poco productivas, en cunicultura se recomienda un 120% de reposición anual. Este valor supone el ingreso mensual de un 10% de conejas nulíparas gestantes en cada grupo/banda de maternidad (alrededor de un 14% cada ciclo de 42 días). Las conejitas entrantes hacen su primer parto 6-8 días después de su incorporación, de modo que tienen que adaptarse a las condiciones higio-sanitarias del nuevo ambiente mientras realizan su primer parto y, a su vez, pueden ser fuente de patógenos que comprometan la salud de las mayores si la cría y primera parte de su gestación se ha realizado en un recinto distinto a la nave de reproductoras. En el presente trabajo se analizan los resultados reproductivos y de mortalidad de cuatro naves de maternidad de una granja comercial que, para mejorar la bioseguridad, aplica un manejo tipo "todo dentro/todo fuera" adaptado a las posibilidades que ofrece una granja cunícola. Así, no se incorpora reposición de nulíparas en cada ciclo a los grupos/bandas de madres, y las nulíparas solo se utilizan para la constitución de los nuevos grupos de reproductoras: todas tienen la misma edad, han nacido y crecido en la misma nave porque proceden del mismo parto de las abuelas y van a ocupar una maternidad en la que se ha realizado vacío sanitario durante una semana tras la limpieza. En los grupos no se introduce ninguna coneja de reposición hasta la realización del 5º parto, y después solo se repone con múltiparas procedentes de aquellos grupos que han finalizado su vida reproductiva como grupo, pero en los que hay conejas válidas y sanas que pueden seguir reproduciéndose.

Material y métodos

Se evaluaron cuatro grupos de conejas híbridas ubicados en naves independientes, con ciclo reproductivo de 42 d y destete a 35 d. Proceden del cruce de dos líneas maternas adquiridas anualmente como abuelas y abuelos en granja Jordán (Fabara, Zaragoza). El semen cárnico se obtiene de machos adquiridos en la misma granja pertenecientes a una línea de color pardo.

Los grupos se constituyeron con 2760 cruzadas nulíparas de cuatro meses de edad distribuidas en las naves como se indica en la **Tabla 1**. Se han analizado (**Figura 1**):

- N-A: dieciocho primeros partos (ciclos) del grupo (enero 2019 – diciembre 2020).
- N-B: catorce primeros partos del grupo (noviembre 2018 – mayo 2020) más los cinco primeros partos del nuevo grupo que ocupó esta nave (junio – diciembre 2020).
- N-C: catorce primeros partos del grupo (mayo 2019 – diciembre de 2020).
- N-D: partos 8º a 25º del grupo (enero 2019 – diciembre 2020), que había iniciado la reproducción en marzo de 2018.

En la granja hay una quinta nave (N-1) constituida por las abuelas y por madres cruzadas. No se incluye en el estudio porque su manejo difiere debido a que las abuelas son sustituidas anualmente por la siguiente generación.

La sobreocupación a lo largo del tiempo se consiguió mediante la incorporación a cada uno de los cuatro grupos (nunca antes del 5º parto) de hembras múltiparas, residuales pero válidas, procedentes de los grupos que finalizaban su vida reproductiva. Por ejemplo, cuando el grupo N-B realizó su parto 14º en mayo de 2020 en él había más de 400 conejas interesantes tanto por los resultados anotados en su ficha como por su condición corporal y sanitaria. Esas múltiparas se repartieron entre los otros tres grupos como se indica con las flechas de la **Figura 1**. Igual se manejó el grupo de híbridas de N-1 cuando en su parto 29º fue sustituido por nulíparas nuevas, o, cuando cada año llega la nueva generación de abuelas, las abuelas múltiparas sobrantes también se distribuyen.

Se han analizado los resultados reproductivos y de mortalidad, evaluándose el efecto del grupo y de la estación mediante análisis de varianza y aplicando test de Duncan o de Tukey en caso de diferencias significativas (SPSS 26.0).

Año	Nave	2019										2020									
N-A	FECHA PARTO	15-1	25-2	9-4	21-5	2-7						28-1	10-3	21-4	2-6	14-7	25-8	6-1	17-11	29-12	
	CICLO	1°	2°	3°	4°	5°						10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°	18°	
N-B	FECHA PARTO	13-11	25-12	5-2	19-3	1-5	11-6					7-1	18-2	31-3	12-5	23-6	4-8	15-9	27-10	8-12	
	CICLO	1°	2°	3°	4°	5°	6°					11°	12°	13°	14°	1°	2°	3°	4°	5°	
N-C	FECHA PARTO					28-5	9-7					4-2	17-3	28-4	9-6	11-7	1-9	13-10	24-11		
	CICLO					1°	2°					7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°		
N-D	FECHA PARTO		8-1	19-2	2-4	14-5	25-6					21-1	3-3	14-4	26-5	7-7	18-8	29-9	10-11	22-12	
	CICLO		8°	9°	10°	11°	12°					17°	18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°	25°	
N-1	FECHA PARTO		1-1	12-2	26-3	7-5	18-6					14-1	25-2	7-4	19-5	30-6	11-8	22-9	3-11	15-12	
	CICLO	ABUELAS	1°	2°	3°	4°	5°					3°	4°	5°	6°	1°	2°	3°	4°	5°	
N-1	FECHA PARTO		1-1	12-2	26-3	7-5	18-6					14-1	25-2	7-4	19-5	30-6	11-8	22-9	3-11	15-12	
	CICLO	CRUZADAS	18°	19°	20°	21°	22°					27°	28°	29°	1°	2°	3°	4°	5°	6°	

Figura 1. Número de ciclos en cada grupo y representación de la redistribución de múltiparas al finalizar la vida reproductiva del grupo (flechas)

Tabla 1. Número de jaulas madre, conejas iniciales, total muertas+eliminadas, conejas inseminadas (IA) y tasa de sobreocupación en noviembre de 2020, y ciclos reproductivos estudiados.

Nave	Jaulas - madre	Iniciales	Muertas + eliminadas 2019-20 (%)	IA	Sobre-ocupación	Ciclos
N-A	452	684	612 (90%)	532	118%	18
N-B	502	726 + 726*	355 + 181 (49% + 25%)	670	134%	14 + 5
N-C	450	690	518 (75%)	545	121%	14
N-D	452	660**	518 (79%)	525	116%	18

* Segundo grupo en nave B, desde junio 2020. ** múltiparas.

Resultados y discusión

El número inicial de conejas fue de 2760 (2100 nulíparas + 660 múltiparas) que suponen un 149% de sobreocupación de las jaulas-madre. Esta tasa es elevada, pero imprescindible para asegurar la reproducción en prácticamente todas las jaulas-madre durante los cinco primeros partos de cada nuevo grupo, puesto que el manejo requiere no introducir animales hasta ese quinto parto. La sobreocupación media durante todo el periodo 2019-20 fue 131,7%, valor muy bien ajustado a la fertilidad al parto de la granja (75,47%), permitiendo un 99% de partos en las jaulas-madre durante el experimento (Tabla 2). El número de conejas presentes en las maternidades en noviembre de 2020, contabilizadas el día de la inseminación correspondiente al último parto en estudio, osciló entre 525 y 670 (Tabla 1); es decir, había una sobreocupación del 116-134%, con 122% de media, valor por debajo de la media del periodo y consecuente a la reducción de la intensidad reproductiva por disminución puntual de la mano de obra. Durante 2019-20 murieron o se dieron de baja 2184 conejas que en la Tabla 1 presentamos distribuidas en las correspondientes naves y expresadas en valor absoluto y en porcentaje sobre las hembras iniciales de cada nave. Tras las nulíparas iniciales, únicamente un lote de 726 nulíparas accedió a la granja durante los dos años de control, renovando al grupo de N-B en junio de 2020.

Tabla 2. Resultados reproductivos por maternidades y estación durante los años 2019-20.

		Media/ parto	N-A	N-B	N-C	N-D	Prim.	Verano	Otoño	Inv.
Sobreocupación	%	132	132	126	133	136	130ab	138b	131ab	127a
Ocupación	%	99	97a	97a	102b	101b	100	101	99	96
Fertilidad	%	75,47	74,12	76,33	76,68	74,9	77,61	73,44	74,84	76,44
Prolificidad	n°	8,57	8,64ab	9,17b	8,57ab	7,94a	8,15	8,15	8,93	8,99
NV/parto	n°	8,49	8,57ab	9,10b	8,50ab	7,83a	8,08	8,06	8,87	8,88
Destetados /parto	n°	7,82	7,92ab	8,47b	7,66ab	7,23a	7,48	7,33	8,10	8,31

NV: nacidos vivos; Prim: Primavera; Inv: Invierno.

a,b: letras diferentes indican diferencias significativas entre medias ($p < 0,05$).

Los resultados de prolificidad de los 31.268 partos estudiados son moderados, tanto en número de gazapos totales (8,57 gazapos/parto) como vivos (8,49 gazapos/parto) (**Tabla 2**), y muy inferiores a los obtenidos en 697 granjas francesas que, desde 2014 a 2017, presentaron una prolificidad media de 10,7-10,8 y 10,1-10,2 gazapos nacidos vivos/parto (Lebas, 2018). No obstante, nuestra moderada prolificidad se acompañó de muy baja mortalidad en el nido, concretamente 0,94% de mortinatalidad y 8,12% de mortalidad en lactación (**Tabla 3**), valores inferiores al 6% y 10-14%, respectivamente, observados en granjas con manejo estándar de la reposición (Rosell y González, 2009; Gómez *et al.*, 2016), y también inferiores al 8% de gazapos muertos+retirados al nacimiento y 15-16% muertos en lactación de granjas francesas (Lebas, 2018). En nuestro estudio la mortalidad ha aumentado entre el verano y diciembre de 2020 pues, en un control de estas naves de junio de 2020, la mortalidad total en nido durante el año y medio previo había sido de 7,99% (López *et al.*, 2021), prácticamente 1 punto por debajo del 8,97% de mortalidad total del periodo completo (**Tabla 3**). Así, en los resultados finales se refleja una patología esporádica detectada en los partos de junio-julio 2020 que persistió con alta mortalidad en todos los partos de otoño, posiblemente agravada porque en octubre se retiró el uso de neomicina de las maternidades. Aún en estas condiciones, las tasas de mortalidad de gazapos son muy inferiores a las de las granjas citadas anteriormente.

En relación con las madres, la tasa de hembras muertas + desechadas por ciclo fue de 5,23% (**Tabla 3**). Su equivalente es un 3,74% mensual, valor también inferior a los obtenidos en granjas con manejo estándar de la reposición según resultados de Rosell y González (2009), que encuentran un 8-9,5%. En valores absolutos, se retiraron 31,65 conejas por ciclo y nave, lo que indica que la eliminación fue inferior a 1 coneja/día y nave.

Al destete las camadas presentaron 7,82 gazapos/parto (**Tabla 2**), con tendencia ($p=0,059$) a aumentar en otoño e invierno de acuerdo con la misma tendencia de la prolificidad ($p=0,067$), y con una importante penalización en verano y, especialmente, otoño debido al proceso patológico (8,60 gazapos destetados/parto en otoño de 2019 vs. 8,10 gazapos/parto como media de otoño de los dos años de control). El tamaño de camada fue inferior a los 8,2 gazapos destetados/parto de las granjas del programa bdcuni (Pascual *et al.*, 2012) así como a los 8,54-8,60 que indica Lebas (2018). No obstante, si solo consideramos los diez primeros partos (**Tabla 4**) encontramos 8,33-8,44 gazapos destetados, sin diferencia estadística hasta el parto 20°, y ya significativa con las camadas de los partos 21°-25° ($p < 0,001$). Los partos 21°-25° procedían únicamente de N-D, grupo que fue muy castigado por la patología (aumentó 1,92 puntos la mortalidad en nido respecto a sus resultados de junio, 7,37%), que concentró la mayor proporción de conejas mayores y que tuvo la menor prolificidad (**Tabla 2**), contrastando sus resultados especialmente con N-B que fue el que agrupaba mayor proporción de partos de jóvenes.

Tabla 3. Mortalidad de las reproductoras por ciclo y de los gazapos, en valores absolutos y en porcentaje, según la nave y la estación del año.

Mortalidad		Media/ parto	N-A	N-B	N-C	N-D	Prim.	Verano	Otoño	Inv.
Conejas	n°	31,65	34,00	28,21	37,00	28,78	33,47	32,83	31,05	29,47
	%	5,23	5,69 ab	4,45 a	6,22 b	4,77 a	5,73	5,14	5,12	5,03
Gazapos	n°	347	340	327	414	324	305	397	363	315
	%	8,97	8,97	7,59	10,43	9,29	8,35	10,26	9,24	7,85
Mortinatalidad	n°	36	35	34	33	43	33	46	28	38
	%	0,94	0,90	0,80	0,85	1,18	0,91	1,17	0,70	0,98
Lactación	n°	311	305	293	381	282	273	351	335	277
	%	8,12	8,14	6,86	9,66	8,23	7,51	9,20	8,61	6,96

a,b: letras diferentes indican diferencias significativas entre medias ($p < 0,05$).

Tabla 4. Prolificidad, gazapos nacidos vivos y gazapos destetados en función del orden de parto.

Orden parto (n° ciclos†)	1°-5° (20)	6°-10° (18)	11°-15° (18)	16°-20° (8)	21°-25° (5)
Prolificidad	9,08 b	9,13 b	8,00 ab	8,37 b	6,95 a
NV/parto	9,01 b	9,07 b	7,89 ab	8,26 b	6,86 a
Destetados/parto	8,33 b	8,44 b	7,22 b	7,70 b	5,85 a

†n° ciclos totales de las 4 naves en conjunto.

a,b: letras diferentes indican diferencias significativas entre medias ($p < 0,001$).

En conclusión, el manejo aplicado proporciona una mortalidad reducida respecto a la publicada para granjas estándar (mortinatalidad, lactación y madres) y una extraordinaria longevidad en las conejas, con camadas al destete competitivas durante los 10 primeros partos del grupo y, en nuestras condiciones, solo significativamente inferiores desde el parto 20°. También se observa una baja utilización de nulíparas durante el periodo estudiado.

Agradecimientos

A la empresa Campanales Balaguer (Fabara, Zaragoza), de quien partió la idea original y aplicó el manejo en granja, y a M. Martín y J. Comenge por sus valiosos comentarios al manuscrito. Financiación: convocatoria PDR del Gobierno de Aragón GCP2019003700.

Bibliografía

- Gómez EA, Pascual M, Serrano P. 2016. ¿Cómo aumentar la rentabilidad mediante la gestión? <https://cunicultura.info/aumentar-la-rentabilidad-mediante-la-gestion/>
- Lebas F. 2018. Performances moyennes des élevages cynicoles en France pour l'année 2017. Résultats RENACEB. *Cuniculture Magazine* 45:22-26.
- López M, Campo MM, Olleta JL, Resconi VC. 2021. Manejo de la maternidad sin reposición periódica de conejas nulíparas. Resultados reproductivos y de mortalidad. En: XIX Jornadas de Producción Animal, Zaragoza, pp. 18.
- Rosell J, González FJ. 2009. Gestión técnica de explotaciones cynícolas 1992-2008. *Cunicultura* 200:27-28.
- Pascual M, Serrano P, Gómez EA. 2012. Evolución de resultados técnicos 2008-2011 con bdcuni. En: XXXVIII Symposium de Cunicultura ASESCU, Barbastro, pp. 83-87.

Inducción de ovulación de conejas con rrβNGF microencapsulado

Ovulation induction in rabbit does using micro encapsulated rrβNGF

Quiroga AC¹, García-García RM¹, Arias-Álvarez M², Gimeno-Martos S^{1,4}, Lorenzo PL¹, Rebollar PG^{3*}

¹Dept. Fisiología, Fac. Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

²Dept. Producción Animal, Fac. Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

³Dept. Producción Agraria, E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, 28040 Madrid, España.

⁴Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, España.

*pilar.grebollar@upm.es

Resumen

Los tratamientos de inducción de ovulación en las conejas que son sometidas a inseminación artificial (IA) están en continuo estudio. La identificación del Factor de crecimiento nervioso (βNGF) en el plasma seminal del conejo sugirió que podría intervenir en este proceso fisiológico. No obstante, el estímulo nervioso debido a la introducción de la cánula también colabora de manera significativa en esta especie. En este trabajo se ha estudiado el papel del NGF recombinante de conejo microencapsulado con quitosano y administrado por vía vaginal. Para ello, se han utilizado conejas nulíparas sincronizadas con 20 UI de eCG 48 horas antes de la IA (Serigan. Lab. Ovejero. España). Para inducir la ovulación se ha utilizado: βNGF recombinante microencapsulado que fue introducido en vagina inmediatamente antes de aplicar la dosis seminal (NGFch0, n=10), o 30 minutos antes de la inseminación (NGFch30, n=10) con cánulas de un solo uso. Estos grupos se compararon con uno tratado con 20 µg de gonadorelina (Gestavet, Lab. Hypra, España), vía i.m. (Grupo GnRH, n=10), y con otro al que sólo se introdujo la cánula vacía (Grupo C, n=10). La fertilidad fue 100, 60 y 90%, para NGF_Ch30, NGF_Ch0 y GnRH, respectivamente ($P<0.05$) y no hubo diferencias en la prolificidad ($12\pm 0,6$ nacidos vivos y $0,6\pm 0,2$ nacidos muertos). Las altas concentraciones de progesterona plasmática determinadas el día 7 post-IA indicaron que un elevado porcentaje de las conejas a las que sólo se les introdujo la cánula vacía también habían ovulado. En conclusión, los buenos resultados de fertilidad obtenidos en este estudio no se pueden atribuir solamente a la encapsulación del NGF con quitosano, ya que no se pueden disociar del estímulo nervioso provocado por la introducción de la cánula en este tipo de hembras tan receptivas.

Palabras clave: ovulación, quitosano, estimulación, rrβNGF, progesterona.

Abstract

Ovulation induction treatments in rabbits undergoing artificial insemination (AI) are under continuous study. The identification of nerve growth factor (βNGF) in rabbit seminal plasma suggested that it might be involved in this physiological process. However, the nervous stimulus due to the introduction of the cannula also collaborates significantly in this species. In this work, the role of recombinant rabbit NGF microencapsulated with chitosan and administered vaginally has been studied. To achieve this goal, synchronized nulliparous rabbits with 20 IU of eCG 48 hours before AI (Serigan. Ovejero, Spain) have been used. To induce ovulation, the following treatments have been used: recombinant βNGF encapsulated in Chitosan spheres that was introduced into the vagina immediately before applying the seminal dose (Group NGFch0, n=10), or 30 minutes before insemination (Group NGFch30, n=10) with single use cannulas. These groups were compared with one treated with 20µg gonadorelin (Gestavet, Hypra), i.m. (GnRH Group, n=10), and with another in which only the empty cannula was introduced (Group C, n=10). Fertility was 100, 60 and 90% for NGF_Ch30, NGF_Ch0, and GnRH, respectively ($P<0.05$) and there were no differences in prolificacy (12 ± 0.6 born alive and 0.6 ± 0.2 stillborn). The high concentrations of plasma progesterone determined on day 7 post-AI indicate that a high percentage of does that were only inseminated with the empty cannula also ovulated. In conclusion, the excellent fertility results obtained in this study cannot be attributed solely to the encapsulation of NGF with chitosan since they cannot be dissociated from the nervous stimulus caused by the introduction of the cannula in these highly receptive females.

Keywords: ovulation, chitosan, stimulation, rrβNGF, progesterone.

Introducción

En el manejo reproductivo de las conejas con inseminación artificial (IA) se aplican tratamientos hormonales para inducir la ovulación que reemplazan el estímulo nervioso de la monta. Para ello se utilizan análogos sintéticos de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) mediante vía intramuscular o vía vaginal (Rebollar *et al.*, 2012). En la segunda vía, que se desarrolló para aumentar el bienestar de los procedimientos de IA de conejas, ha sido necesario incrementar las dosis de los análogos de GnRH (Rebollar *et al.*, 2012), utilizar análogos de mayor potencia (Quintela *et al.*, 2004) o modificar la composición de los diluyentes de semen para evitar la actividad de las aminopeptidasas del plasma seminal (Viudes de Castro *et al.*, 2014).

En las conejas y en otras especies que también son de ovulación inducida, se ha descrito la presencia en el plasma seminal de un factor de crecimiento nervioso (NGF) que podría tener un papel importante sobre todos los procesos fisiológicos reproductivos (García-García *et al.*, 2020). Tras la secuenciación, síntesis y purificación del βNGF recombinante de la próstata del conejo (rrβNGF) (Gene bank: KX528686), se ha valorado su papel fisiológico sobre la inducción de ovulación cuando es añadido vía vaginal en la dosis seminal. De este modo, hemos descrito unas tasas de ovulación del 60% cuando se administra por vía vaginal una dosis de 1 μg de rrβNGF en la dosis seminal (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019). No obstante, este resultado no es suficiente para ser considerado un método que se pueda aplicar en cunicultura a gran escala, ya que no es comparable al que se obtiene con los análogos de GnRH por esta vía o por la vía intramuscular, debido a que posiblemente el NGF sea degradado antes de ser absorbido.

Por ello, hemos recurrido a la microencapsulación de moléculas, que permite incluir ingredientes activos, en este caso el rrβNGF, en un sistema particulado a base de materiales poliméricos como el quitosano. Se trata de un derivado de la quitina natural con notables propiedades en los campos relacionados con la ingeniería de tejidos (Madhally y Matthew, 1999). Es un polisacárido no tóxico, biodegradable y biocompatible de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidas con enlaces β (1-4). La encapsulación de análogos de GnRH en nanopartículas a base de quitosano añadidas al diluyente de semen ha permitido reducir la concentración hormonal utilizada para inducir la ovulación en las conejas inseminadas sin afectar a su fertilidad (Casares-Crespo *et al.*, 2018). La hipótesis de este trabajo es que este método de encapsulación podría evitar que el rrβNGF sea destruido por las sustancias presentes en la dosis seminal y se vaya liberando de manera paulatina favoreciendo así su absorción. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la introducción de la cánula y manipulación de la hembra en el momento de la IA pueden provocar un estímulo nervioso que induzca la ovulación, ya sea con la cánula vacía (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019) o con semen diluido (Rebollar *et al.*, 2012).

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue comprobar si la encapsulación con quitosano del rrβNGF puede favorecer la absorción de dicho factor a nivel vaginal y si su efecto a dicho nivel se puede disociar del estímulo nervioso provocado por la introducción de la cánula.

Material y métodos

La microencapsulación del rrβNGF se realizó mediante gelificación ionotrópica entre las moléculas de rrβNGF (Genscript) cargadas negativamente y los cationes de quitosano, seguido de un proceso de atomización para la obtención de un polvo seco (Aranaz *et al.*, 2009 y 2014). Se obtuvieron microesferas de un tamaño inferior a 10 μm y con una relación de 0,24-0,44 μg de rrβNGF por cada mg de microesferas. Las microesferas de rrβNGF liofilizadas se resuspendieron en PBS filtrado y autoclavado justo antes de la IA a una concentración final de 1 μg/ml de rrβNGF. El perfil de liberación de rrβNGF de las microesferas se determinó previamente analizando la concentración de rrβNGF libre en el medio 30 min, 1, 2 y 4 h después de la resuspensión de las microesferas mediante enzimoanálisis (Rabbit Nerve Growth Factor ELISA Kit, Abexxa abx259154, Cambridge, RU) según Sánchez-Rodríguez *et al.* (2019). La mayor parte de la liberación de rrβNGF se produjo entre los 30 min y 1 h, manteniéndose estables pasadas 2 y 4 h.

Se utilizaron 40 conejas nulíparas de 18 semanas de edad, alojadas en la granja experimental del Departamento de la ETSIAAB (UPM) en jaulas individuales y sometidas a un fotoperiodo de 16HL/8HO y una temperatura de 20-22°C (PROEX 302/15). Todas fueron sincronizadas con eCG (20 UI, Serigán, Lab. Ovejero, León, España) vía i.m., 48 horas antes de la IA. Se recogieron los eyaculados de 3 machos con vagina artificial y fueron valorados satisfactoriamente desde el punto de vista macro (color blanco y volumen >0,5 ml) y microscópico (motilidad >80%). Se realizó una mezcla heterospémica para evitar diferencias individuales, se estimó la concentración del pool con cámara de Bürker y, con un diluyente comercial (Inserbo S.L., Lérida, España) se prepararon las dosis seminales (1 ml) con una concentración de 28 millones de espermatozoides/ml. Para la IA se utilizaron cánulas de plástico de un solo uso y la coneja se inseminó por un solo operador que sujetó a la coneja sobre su jaula.

Las conejas se dividieron en 4 grupos:

-Grupo NGFch30: se depositó 0,5 µg de rrβNGF encapsulado en esferas de quitosano (0,5 ml) con una cánula de plástico de un solo uso y pasados 30 minutos se depositó la dosis de semen.

-Grupo NGFch0: se depositó 0,5 µg de rrβNGF encapsulado en esferas de quitosano (0,5 ml) con una cánula de plástico de un solo uso e inmediatamente después se depositó la dosis de semen con otra cánula.

-Grupo GnRH: se depositó la dosis de semen e inmediatamente después se administró una dosis de 20 µg de gonadorelina, vía i.m (Gestavet GnRH, Lab. Hypra. Gerona, España).

-Grupo C: sólo se introdujo una cánula vacía en la vagina simulando una IA.

Para comprobar la existencia de cuerpos lúteos funcionales que indicaran que las conejas habían ovulado, se tomaron muestras de sangre de todos los animales inmediatamente antes de la IA (día 0) y 7 días después para determinar las concentraciones de progesterona plasmática. La sangre se recogió en tubos heparinizados, se centrifugó (700g, 15 minutos) y el plasma se conservó a -20°C. Las concentraciones de progesterona se determinaron utilizando un kit de enzimoimmunoanálisis (Progesterone ELISA, DE 1561 Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany) con un rango de detección entre 0,140 y 40,0 ng/ml, una sensibilidad de 0,045 ng/ml y unos coeficientes de variación intra e inter ensayo de 6,9 y 5,6%. Se consideró que las conejas en día 0 debían tener concentraciones inferiores a 3 ng/ml y el día 7, si habían ovulado, serían superiores a 20 ng/ml (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2020). La fertilidad se calculó con el cociente: (n° de conejas paridas/n° de conejas inseminadas) x100. El día del parto se anotó la prolificidad de cada animal incluyendo los gazapos nacidos vivos y muertos.

Para el análisis estadístico de los datos de los 3 grupos inseminados, se compararon los resultados de fertilidad y de porcentaje de conejas ovuladas con un test Chi² y los de prolificidad con un análisis de varianza considerando el tratamiento como efecto principal. Las medias se muestran como medias corregidas por mínimos cuadrados (SAS, 2001).

Resultados y discusión

Los resultados productivos obtenidos de los 3 grupos experimentales inseminados se muestran en la **Tabla 1**. Con la encapsulación del rrβNGF con quitosano y su aplicación 30 minutos antes de la deposición del semen se consiguió la misma fertilidad que con GnRH por vía i.m. Durante este periodo de tiempo antes de la deposición de la dosis seminal, el rrβNGF encapsulado probablemente pudo liberarse y poco a poco absorberse a través de la mucosa vaginal. De hecho, el quitosano tiene buenas propiedades mucoadhesivas debido a su carga positiva (Lehr *et al.*, 1992), lo que podría haber aumentado el tiempo de contacto para la penetración de la proteína recombinante a través de la mucosa vaginal. Todas las conejas eran nulíparas y altamente receptivas cuando se les aplicó el tratamiento, ya que habían sido sincronizadas con eCG. La vagina presenta un epitelio con una capacidad de absorción que puede ser modificada dependiendo del grado de receptividad sexual que tenga la hembra, ya que los estrógenos presentes en la sangre cuando la hembra está en celo podrían aumentar la vascularización de la zona (Dal Bosco *et al.*, 2011). El tratamiento con eCG, por tanto, así como la inherente elevada receptividad sexual de las conejas nulíparas ha podido favorecer el excelente resultado de fertilidad del grupo tratado con rrβNGF 30 minutos antes de la IA.

Con la aplicación del rrβNGF encapsulado inmediatamente antes de la dosis seminal no se consiguieron resultados tan satisfactorios ya que, aunque estadísticamente no se observan diferencias significativas con el grupo tratado con GnRH, en valores absolutos sí las hubo, y no se mejoró el porcentaje previamente obtenido con el rrβNGF sin encapsular (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2020). Quizás, la mezcla en el fondo vaginal del rrβNGF encapsulado junto con la dosis seminal diluyó en exceso el producto y afectó a las propiedades de adhesión y absorción anteriormente descritas. La prolificidad obtenida fue similar entre los tres grupos experimentales ($p > 0,05$).

Tabla 1. Parámetros productivos de conejas inseminadas y tratadas con 20 µg de gonadorelina (GnRH) vía i.m., con 0,5 µg de rrβNGF encapsulado con quitosano por vía vaginal 30 minutos antes (NGFch30) o inmediatamente antes (NGFch0) de la inseminación artificial y con una cánula vacía (C).

	Tratamiento				RSM	P>f
	GnRH	NGFch30	NGFch0	C		
n	10	10	10	10		
Fertilidad (%)	90 (9/10) ab	100 (10/10) a	60 (6/10) b	-	-	*
Conejas ovuladas ¹ (%)	90 (9/10)	100 (10/10)	66,7 (6/9)	83,3 (5/6)	-	n.s.
Partos	9	10	6	-		
Nacidos vivos	12,3±0,93	12,3±0,82	10,8±1,25	-	2,79	n.s.
Nacidos muertos	0,33±0,34	0,50±0,32	1,00±0,41	-	1,01	n.s.

n: n° de conejas. RSM: cuadrado medio del error. *: p<0,05. n.s: no significativo. ¹Calculadas a partir de las concentraciones de progesterona plasmática el día 7 post-IA (mirar el texto).

La gestación indicó que indiscutiblemente las conejas habían ovulado, pero en las no gestantes o en las del grupo C, determinamos las concentraciones de progesterona. El día 7 post-IA hemos confirmado bajas concentraciones de progesterona (<2,1 ng/ml) en las conejas no gestantes y altas (>40 ng/ml) en las 9 conejas gestantes del grupo GnRH, y en las 10 del grupo NGFch30. En el grupo C, hubo 5 conejas con altas concentraciones de progesterona el día 7 y, por lo tanto, consideramos que la introducción de la cánula vacía les indujo la ovulación. En este grupo, sólo 1 coneja tuvo concentraciones bajas de progesterona el día 7, por lo que suponemos que no ovuló. Paradójicamente, 4 conejas del grupo C y 1 del grupo NGFch0 ya tenían concentraciones altas de progesterona (entre 6 y 40 ng/ml) el día de la IA, por lo que en ese momento ya eran pseudogestantes. Esto pudo ser debido a la manipulación recibida al ser tratadas con eCG 48 h antes de la IA. Por tanto, si las excluimos del experimento, el porcentaje de conejas que ovularon por la introducción de la cánula en el grupo C también fue elevado. Como consecuencia, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de conejas ovuladas de los 4 tratamientos estudiados (**Tabla 1**).

En conclusión, cuando se trata de conejas nulíparas receptoras y tratadas con eCG, el estímulo mecánico de la cánula es suficiente para provocar la ovulación en un alto porcentaje de ellas, por lo que los buenos resultados de ovulación obtenidos en este estudio no se pueden atribuir solamente a la encapsulación del NGF con quitosano.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España (RTI 2018-094404-B-C-21y 22). Gimeno-Martos S. disfruta de un Contrato Margarita Salas financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y la Unión Europea-NextGenerationEU.

Bibliografía

- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, et al. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. 3:203-230.
- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, et al. et al. 2014. Role of physicochemical properties of chitin and chitosan on their functionality. 8:27-42.
- Casares-Crespo L, Fernández-Serrano P, Viudes-de-Castro MP. 2018 Protection of GnRH analogue by chitosan-dextran sulfate nanoparticles for intravaginal application in rabbit artificial insemination. 116:49-52.
- Dal Bosco A, Rebollar PG, Boiti C, Zerani M, Castellini C. 2011. Ovulation in induction in rabbit does: current knowledge and perspectives. 129:106-117.
- García-García RM, Arias-Álvarez M, Sánchez-Rodríguez A, Lorenzo PL, Rebollar PG. 2020. Role of nerve growth factor in the reproductive physiology of female rabbits: a review 150:321-328.

- Lehr CM, Bouwstra JA et al. 1992. *In vitro* evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers 78:43-48.
- Madhally SV, Matthew HWT 1999. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. 20:1133-1142.
- Quintela LA, Peña AI, Vega MD, Gullón J, Prieto C, Barrio M, et al. 2004. Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose. 44:79-88.
- Rebollar PG, Dal Bosco A, Millán P, Cardinali R, Brecchia G, Sylla L, Lorenzo PL, Castellini C. 2012. Ovulating induction methods in rabbit does: the pituitary and ovarian responses. 77:292-298.
- Sánchez-Rodríguez A, Abad P, Arias-Alvarez M, Rebollar PG, Bautista JM, Lorenzo PL, García-García RM. 2019. Recombinant rabbit beta nerve growth factor production and its biological effects on sperm and ovulation in rabbits. 14(7): e0219780.
- Sánchez-Rodríguez A, Arias-Alvarez M, Millán P, Lorenzo PL, García-García RM, Rebollar PG. 2020. Physiological effects on rabbit sperm and reproductive response to recombinant rabbit beta nerve growth factor administered by intravaginal route in rabbit does. 157:327-334.
- SAS Institute. 2001. SAS/STAT® User's Guide (Release 8.2). SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.
- Viudes-de-Castro MP, Mocé E, Lavara R, Marco-Jiménez F, Vicente JS. 2014. Aminopeptidase activity in seminal plasma and effect of dilution rate on rabbit reproductive performance after insemination with an extender supplemented with buserelin acetate. 81:1223-1228.

Caracterización de exosomas en el plasma seminal de conejos fértiles y subfértiles: resultados preliminares

Characterization of exosomes in seminal plasma of fertile and subfertile rabbit bucks: preliminary results

Sakr OG^{1,2}, Cañón-Beltrán K³, Cajas YN³, Rizos D³, Rebollar PG^{1*}

¹Dept. Producción Agraria, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España.

²Dept. Animal Production, Faculty of Agriculture, Cairo University, Cairo, Egipto.

³Dept. Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC), Carretera de la Coruña, km 5,9. 28040 Madrid, España.

*pilar.grebollar@upm.es

Resumen

En este estudio se han puesto a punto los métodos para aislar e identificar vesículas extracelulares (VEs), entre ellas, exosomas del plasma seminal (PS) de 3 conejos de alta (ACS) y 3 de baja (BCS) calidad seminal. La ultracentrifugación y la cromatografía de exclusión por tamaño han permitido aislar diferentes concentraciones de partículas ($8,53 \times 10^{11} \pm 1,04 \times 10^{11}$ y $1,84 \times 10^{12} \pm 1,75 \times 10^{11}$ partículas/ml de PS; $p=0,008$) y con un tamaño medio similar ($121,1 \pm 15,6$ y $115,5 \pm 2,4$ nm ($p=0,7422$)) en los machos ACS y BCS, respectivamente. Además, las VEs se han identificado con microscopía electrónica y sus proteínas marcadoras por Western blot. La concentración de VEs del PS se correlacionó positivamente con el porcentaje de formas anormales ($r=0,94$; $p<0,05$) y con el porcentaje de espermatozoides inmóviles ($r=0,88$; $p<0,05$). El tamaño de las partículas no se correlacionó significativamente con ningún parámetro cinético. Son necesarios otros análisis para determinar el tipo de micro ARNs que transportan estas partículas y determinar si pueden tener relación con la capacidad fecundante de los eyaculados de conejo.

Palabras clave: vesículas extracelulares, calidad seminal.

Abstract

In this study, the methods to isolate and identify extracellular vesicles (EVs) including exosomes, from the seminal plasma (SP) of 3 rabbits of high (HSQ) and 3 of low (LSQ) seminal quality have been developed. Ultracentrifugation and size exclusion chromatography analysis have made it possible to isolate different SP-EVs concentrations ($8.53 \times 10^{11} \pm 1.04 \times 10^{11}$ and $1.84 \times 10^{12} \pm 1.75 \times 10^{11}$ particles/ml of SP; $p=0,008$) and with a similar average size (143.9 ± 11.9 and 115.5 ± 2.4 nm; $p=0.7422$) in HSQ and LSQ males, respectively. Also, EVs have been identified by electron microscopy and their marker proteins by Western blot. The concentration of SP-EV was positively correlated with the percentage of abnormal forms ($r=0.94$; $p<0.05$) and with the percentage of immotile spermatozoa ($r=0.88$; $p<0.05$). Particle size was not significantly correlated with any kinetic parameter. Further analyses are necessary to determine the type of micro RNAs that these particles carry and determine if they may be related to the fertilizing capacity of rabbit ejaculates.

Keywords: extracellular vesicles, seminal quality.

Introducción

El eyaculado es una mezcla de espermatozoides (SPZ, aproximadamente un 5%) y un líquido no celular que llamamos plasma seminal (PS, 95%) procedente de testículos, epidídimo y glándulas accesorias. El PS contiene

azúcares, oligosacáridos, glucanos, lípidos, iones inorgánicos (calcio, magnesio, potasio, sodio y zinc), proteínas, moléculas de ARN y lípidos que pueden estar encapsulados en vesículas extracelulares (VEs) (Candenas y Chianese, 2020). En el PS del conejo, Davis y Davis (1983) ya describieron la existencia de VEs que intervenían en la capacitación, decapitación y en la modulación de la reacción acrosómica de los SPZ. Las VEs de 40-120 nm de diámetro, también llamadas exosomas, son partículas secretadas que median la comunicación de célula a célula y están presentes en todos los fluidos biológicos, incluidos los reproductivos, transportando componentes moleculares que afectan la maduración de los gametos, la fertilización, el desarrollo embrionario temprano y la comunicación embrionaria-materna (van Niel *et al.*, 2018). Estas partículas al unirse a los SPZ se pueden internalizar en ellos dando como resultado una amplia variedad de modificaciones epigenéticas y fenotípicas que afectan a la viabilidad, la adhesividad, la resistencia a los factores ambientales y a la capacidad regenerativa de la célula receptora. Existen VEs limitadas por membranas ricas en colesterol y esfingomiélinas que pueden favorecer la adquisición de capacidad fecundante de los SPZ de conejo (Minelli *et al.*, 2003) y pueden prevenir la reacción acrosómica (Castellini *et al.*, 2012). Las VEs contienen moléculas funcionales que incluyen microARN (miARN), ARNm, ADN, lípidos y proteínas que son una fuente novedosa de biomarcadores para diagnosticar problemas de infertilidad y de terapias potenciales para las tecnologías de reproducción asistida (Candenas y Chianese, 2020). El estudio de la composición de las VEs presentes en el PS y su correlación con la capacidad fecundante puede ayudarnos a modular o potenciar los resultados productivos de los sementales (Minelli *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2016) y en el caso de los conejos sería un estudio muy novedoso. No obstante, todavía hay muchos obstáculos tecnológicos y científicos que superar como la falta de protocolos de medición estandarizados y de tecnologías de aislamiento y cuantificación absoluta de VEs que sean robustas y clínicamente adecuadas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue poner a punto los procedimientos para aislar y caracterizar las VEs del PS de sementales de conejos de diferente calidad seminal por si existieran diferencias entre ellos y contribuir al progreso tecnológico que debe realizarse para que las VEs se puedan aplicar en entornos clínicos o productivos.

Material y métodos

Se utilizaron inicialmente 14 conejos machos blancos de California x Nueva Zelanda sexualmente maduros de 10-12 meses de edad, alojados en jaulas individuales y en condiciones ambientales estándar (ciclo de luz/oscuridad de 16 h/8 h, temperatura de 22–24 °C y 55–60 % de humedad relativa) (PROEX 302/15). De estos animales se recolectó un eyaculado dos veces por semana con vaginas artificiales durante 1 mes (8 eyaculados de cada animal). En cada eyaculado se valoró la calidad macroscópica desechando los eyaculados con colores anómalos (amarillos o rojos) y escasos volúmenes (<0,2 ml). También se evaluó la viabilidad espermática con la prueba de tinción con eosina y el porcentaje de formas anormales (10 µl de semen + 10 µl de semen, recuento de 200 células), la concentración (con cámara de Bürker) y los parámetros cinéticos mediante el programa CASA (Microptic S.L., Barcelona, España) observando un mínimo de 200 células en cada uno de los 3 replicados que se analizaron de cada eyaculado. En los ajustes del sistema CASA se definió un 70% del índice de rectitud (STR) para la motilidad progresiva, y velocidades medias (VAP) de <10 µm/s < 25 µm/s < 50 µm/s para los SPZ lentos, medios y rápidos, respectivamente. A partir de estos análisis, se eligieron 3 machos de alta (ACS) y 3 de baja (BCS) calidad seminal, cuyos resultados medios se muestran en la **Tabla 1**. Posteriormente, 153 conejas (núlparas y múltiparas) se inseminaron con el semen diluido individualmente (inseminación artificial homoespérmica) de cada uno de los machos (alrededor de 25 hembras/macho) utilizando concentraciones de 5x10⁶ SPZ/ml en un volumen de 0,5ml. Todas las conejas fueron tratadas con 20 µg de gonadorelina vía i.m. (Gestavet, Hypra, Gerona, España) para inducir la ovulación. Posteriormente se calculó la fertilidad ([número de conejas preñadas/nº de conejas inseminadas]/100) y la prolificidad (nacidos vivos y muertos por parto) analizando estadísticamente los resultados con un análisis de varianza para comprobar si la calidad seminal afectaba a dichos parámetros (SAS, 2001).

Tabla 1. Valores medios de 8 eyaculados de conejos de alta (ACS) y baja calidad seminal (BCS).

	ACS (n=3)	BCS (n=3)
Volumen (ml)	1,29 ± 0,04	1,36 ± 0,37
Viabilidad (%)	91,33 ± 0,27	37,57 ± 4,46
Formas anormales (%)	4,17 ± 0,69	44,77 ± 7,87
Concentración (x10 ⁶ /ml)	479,7 ± 50,79	219,7 ± 42,91
No progresivos (%)	30,03 ± 0,34	10,93 ± 1,11
Progresivos (%)	53,83 ± 4,57	9,77 ± 3,44
Motilidad (%)	83,2 ± 2,92	20,87 ± 4,22
Rápidos (%)	61,83 ± 5,09	10,30 ± 3,0
Medios (%)	11,17 ± 1,64	4,53 ± 1,27
Lentos (%)	10,67 ± 1,07	8,40 ± 0,56
VCL (µm/s)	103,1 ± 9,10	53,4 ± 8,92
VSL (µm/s)	67,70 ± 6,75	38,92 ± 3,28
VAP (µm/s)	79,53 ± 7,10	46,97 ± 2,11
LIN (%)	64,87 ± 1,25	62,57 ± 5,35
STR (%)	83,90 ± 1,37	89,17 ± 1,41
WOB (%)	76,80 ± 0,55	72,97 ± 3,98
ALH (µm)	2,83 ± 0,15	2,67 ± 0,48
BCF (Hz)	8,80 ± 0,35	6,23 ± 1,87

Velocidad curvilínea [VCL], rectilínea [VSL], media [VAP], linealidad [LIN], rectitud [STR], coeficiente de tambaleo [WOB], ancho de la trayectoria de la cabeza [ALH], frecuencia de intersecciones entre la trayectoria rectilínea y curvilínea [BCF].

Para el aislamiento de las VEs del PS de los conejos ACS y BCS, se obtuvieron otros 6 eyaculados de cada animal durante 3 semanas (2 por semana) que fueron sometidos a 3 series de centrifugación a 4°C (800 × g 20 minutos, 2000 × g 20 minutos y 16000 × g 60 minutos) y el PS resultante de cada macho se congeló a -80°C. Posteriormente, se utilizó el método de Cañón-Beltrán *et al.* (2021), basado en cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) PURE-EV® (HansaBioMed Life Sciences), seguido de centrifugación. Brevemente, las columnas primero se lavaron con 30 ml de PBS y luego el PS de cada macho (2,5 ml) se cargó en la parte superior de una columna. Cuando la muestra estuvo completamente dentro de la columna, se cargaron 11 ml de PBS. Después, se descartaron los primeros 3 ml y se recolectaron los siguientes 2,5 ml de fracciones ricas en VEs. A continuación, estas muestras se sometieron a centrifugación durante 30 min a 2000 × g para concentrar las VEs a través de un filtro Amicon® Ultra-15 (Merck-Millipore Ltd., Irlanda) en un volumen final de 100 µL y luego se adicionó PBS frío para obtener un volumen final de 200 µL. De este volumen final, se utilizaron 5 µL de cada muestra de cada macho para determinar la concentración y el tamaño de las partículas mediante un análisis de rastreo de nanopartículas (NTA, Nanosight Ltd., Minton, Park, UK). Para identificarlas, otros 5 µL fueron observados por microscopio electrónico de transmisión (Jeol Ltd., Tokio, Japón) equipado con una cámara CCD Megaview II integrada en el software iTEM Olympus Soft Imagen Solutions (Olympus, Tokio, Japón), y otros 90 µL para realizar un análisis de Western blot que permitiera identificar las proteínas marcadoras de los exosomas (HSP70, CD9 y ALIX) con la proteína CANX como control negativo (Lötvall *et al.*, 2014). El volumen restante (100 µL) ha sido almacenado para el estudio de los miARN presentes en cada muestra cuyos resultados están en proceso. Se realizó un análisis de varianza de la concentración y el tamaño de partículas con el tipo de semental como efecto principal y un análisis de correlación de Pearson para comprobar si la calidad seminal podía estar relacionada con el tamaño y concentración de las partículas del PS (SAS, 2001).

Resultados y discusión

En la **Tabla 2** se muestra la fertilidad y prolificidad obtenidas tras la IA homoespérmica realizada que fueron estadísticamente mejores en los machos ACS que en los BCS. Desde un punto de vista zootécnico la predicción de la fertilidad a partir de los valores de la calidad seminal es muy importante. En cunicultura se suele utilizar la IA heteroespérmica, donde el efecto del macho sobre la fertilidad queda diluido, pero según Lavara *et al.* (2005), con concentraciones bajas (6 10⁶ SPZ/ml), como las que se han utilizado en este trabajo, se obtienen correlaciones significativas entre la fertilidad y

el porcentaje total de células móviles ($r=0,31$), el índice LIN ($r=-0,32$) y el porcentaje de SPZ anormales ($r=0,32$). Por otro lado, en inseminaciones homoespérmicas y diluciones altas (1:19), Theau-Clément *et al.* (2016) afirman que la selección de los eyaculados por motilidad masal puede aumentar la productividad en 1 gazapo nacido vivo por inseminación.

Tabla 2. Parámetros reproductivos de conejas inseminadas con conejos de alta (ACS) y baja calidad seminal (BCS).

	ACS	BCS	RSM	P>f
n	82	71		
Fertilidad (%)	71,95±5,22	40,85±5,61	47,24	***
Nacidos vivos	11,56± 0,31	8,10±0,44	2,38	***
Nacidos muertos	0,08±0,07	0,76±0,11	0,57	***

n: n° de conejas inseminadas. RSM: cuadrado medio del error. ***: $p<0,001$.

El estudio biofísico y molecular para la caracterización de las VEs del PS de los conejos ACS y BCS se muestra en la **Figura 1**. La cromatografía utilizada para extraer las VEs resultó una técnica eficiente para separarlos de las proteínas circulantes. Según Monguió-Tortajada *et al.* (2019) este procedimiento no afecta a su forma ni a su funcionalidad original. La observación al microscopio electrónico y los resultados de NTA (**Figura 1A**) demostraron la presencia de VEs/exosomas con un tamaño medio similar ($143,9 \pm 11,9$ y $115,5 \pm 2,4$ nm; $p=0,7422$) en los machos ACS y BCS, respectivamente. Su concentración fue más baja en ACS que en BCS ($8,53 \times 10^{11} \pm 1,04 \times 10^{11}$ y $1,84 \times 10^{12} \pm 1,75 \times 10^{11}$ partículas/ml de PS, respectivamente; $p=0,008$) y se correlacionó positivamente con el porcentaje de formas anormales ($r=0,94$; $p<0,05$) y con el de SPZ inmóviles ($r=0,88$; $p<0,05$). Entre los parámetros cinéticos de los SPZ y el tamaño de las VEs/exosomas no se observó ninguna correlación significativa. El análisis mediante Western blot validó la expresión de 3 de los marcadores clásicos de los exosomas en las VEs de ambos grupos de machos: HSP70, CD9 y ALIX (Lopera-Vásquez *et al.*, 2016 y 2017; Almiñana *et al.*, 2017; Théry *et al.*, 2018, Hamdi *et al.*, 2021). Además, verificamos la ausencia de CANX, una proteína del retículo endoplásmico, que sirve como control negativo para la contaminación celular y que por ello no suele estar presente en las VEs (**Figura 1B**).

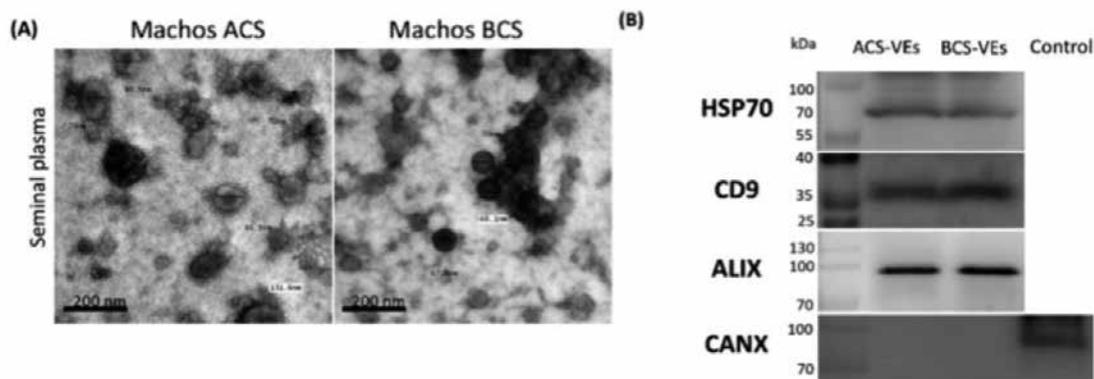


Figura 1. (A) Imágenes representativas de vesículas extracelulares (VEs) tomadas mediante microscopía electrónica y (B) Western blot de marcadores de proteínas de exosomas del plasma seminal de conejos alta (ACS) y baja calidad seminal (BCS).

Podemos concluir que las técnicas utilizadas para la extracción y caracterización de las VEs/exosomas han sido válidas para observar y confirmar su existencia en el PS de conejos, detectando algunas diferencias en la concentración de estas partículas dependiendo de la calidad seminal de los machos estudiados. Una vez aislados, pretendemos aplicar análisis más complejos e identificar parámetros indicativos de subfertilidad en los sementales.

Agradecimientos

Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI 2018-094404-B-C-21, PID2019-111641RB-I00) y al Ministerio de Educación de Egipto.

Bibliografía

- Almiñana C, Corbin E, Tsikis G, Alcántara-Neto AS, Labas V, Reynaud K, Galio L, Uzbekov R, Garanina AS, Druart X. 2017. Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction* 154:153-168.
- Candenas L, Chianese R. 2020. Exosome composition and seminal plasma proteome: a promising source of biomarkers of male infertility. *Int J Mol Sci* 21:7022.
- Cañón-Beltrán K, Hamdi M, Mazzarella R, et al. 2021. Isolation, characterization, and microRNA analysis of extracellular vesicles from bovine oviduct and uterine fluids. In: Brevini TAL, Fazeli A, Turksen K, eds. *Next Generation Culture Platforms for Reliable In Vitro Models: Methods and Protocols*. Springer US; 219-238.
- Castellini C, Mourvaki R, Cardinali R, Collodel G, Lasagna E, Del Vecchio M-T, Dal Bosco A. 2012. Secretion patterns and effect of prostate-derived granules on the sperm acrosome reaction of rabbit buck. *Theriogenology* 78:715-723.
- Davis BK, Davis NV 1983. Binding by glycoproteins of seminal plasma membrane vesicles accelerates decapacitation in rabbit spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 727:70-76.
- Du J, Shen J, Wang Y, Pan C, Pang W, Diao H, Dong W. 2016. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget* 7:58832-58847.
- Hamdi M, Cañón Beltrán K, Mazzarella R, Cajas YN, Leal CL, Gutiérrez Adán A, Rizos D. 2021. Characterization and profiling analysis of bovine oviduct and uterine extracellular vesicles and their miRNA cargo through the estrous cycle. *FASEB J*, 35(12), e22000.
- Lavara R, Mocé E, Lavara F, Viudes de Castro MP, Vicente JS. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology* 64:1130-1141.
- Lopera-Vásquez R, Hamdi M, Fernández-Fuertes B, Maillo V, Beltrán-Breña P, Calle A, Redruello A, López-Martín S, Gutiérrez-Adán A, Yáñez-Mó M. 2016. Extracellular vesicles from BOEC in in vitro embryo development and quality. *PLOS ONE* 11 e0148083.
- Lopera-Vásquez R, Hamdi M, Maillo V, Gutiérrez-Adán A, Bermejo-Álvarez P, Ramírez MA, Yáñez-Mo M, Rizos D. 2017. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality in vitro. *Reproduction* 153(4):461-470.
- Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P et al. 2014. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 3.
- Minelli A, Liguori L, Bellezza I, Renieri T, Castellini C. 2003. Effects of diadenosine polyphosphates and seminal fluid vesicles on rabbit sperm cells. *Reproduction* 125:827-835.
- Mongiú-Tortajada M, Morón-Font M, Gámez-Valero A. 2019. Extracellular-vesicle isolation from different biological fluids by size-exclusion chromatography. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 49:e82.
- SAS Institute. 2001. *SAS/STAT® User's Guide (Release 8.2)*. SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.
- Theau-Clément M, Ailloud E, Sánchez A, Saleil G, Brun JM. 2016. Relationships between rabbit semen characteristics and fertilising ability after insemination. *Animal* 10 3:426-431.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK et al. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018: a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7(1):1535750.
- Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(4):213-228.

Inseminación Artificial como alternativa reproductiva para la cunicultura dominicana: Valoración técnica y económica en granja de conejos (*Oryctolagus cuniculus*), bajo condiciones comerciales

Artificial insemination as a reproductive alternative for Dominican rabbit farming: Technical and economic valuation in rabbit farms (Oryctolagus cuniculus), under commercial conditions

Durán M^{1*}, Choque J¹, Ariztegui M², Guzman N²

¹Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, República Dominicana.

²Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña (UNPHU), República Dominicana.

*mary.duran02@gmail.com

Resumen

Diversas razones justifican la aplicación de la Inseminación Artificial en conejos. Todas ellas permiten aportar una serie de ventajas que no sólo mejoran la calidad de las producciones, sino también el costo final de la producción, porque se espera que su utilización garantice una disminución del mismo. Por ello, el objetivo de esta investigación fue efectuar la valoración técnica y económica de la implementación de la inseminación artificial como alternativa reproductiva en granjas de conejos de la República Dominicana. El estudio fue realizado bajo un diseño completamente al azar con tres tratamientos (T1: monta natural; T2: IA sin sincronización de celo y T3: IA con sincronización de celo) y 8 repeticiones. Una coneja reproductora, alojada en una jaula individual, fue considerada la unidad experimental. Las variables evaluadas fueron: la fecundidad y la prolificidad. Los resultados indican que el porcentaje de fecundidad favoreció a la monta natural (T1) con un 100% con relación a la IA sin y con sincronización de celo, que obtuvieron un 69.12 y un 88.88 %, respectivamente. Aunque los valores de prolificidad fueron superiores en las hembras inseminadas, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El análisis de retorno marginal arrojó resultados similares para las tres tecnologías evaluadas, permitiendo valores de retorno por cada peso invertido de RD\$ 1.32, 1.35 y 1.35 para T1, T2 y T3, respectivamente.

Palabras clave: conejo, inseminación artificial, reproducción, sincronización.

Abstract

Different reasons justify the application of Artificial Insemination in rabbits. All of them allow providing a series of advantages that not only improve the quality of the productions, but also the final cost of the production, because it is expected that their use will guarantee a decrease in it. The purpose of this research was to carried out the technical and economic assessment of the implementation of artificial insemination as a reproductive alternative in rabbit farms in the Dominican Republic. The study was carried out under a completely randomized design with three treatments (T1: natural mating; T2: AI without estrus synchronization and T3: AI with estrus synchronization) and 8 repetitions per treatment. A breeding rabbit, housed in an individual cage, was considered the experimental unit. The variables evaluated were: fertility and prolificity. The results indicate that the percentage of fertility favored natural mating (T1) with 100% in relation to AI with and without heat induction, which

obtained 69.12 and 88.88%, respectively. Although the prolificity values were higher in the inseminated females, these differences were not statistically significant ($p < 0.05$). The marginal return analysis yielded similar results for the three technologies evaluated, allowing returns of RD\$ 1.32, 1.35 and 1.35 for T1, T2 and T3, respectively, for each coin invested.

Keywords: rabbit, artificial insemination, reproduction, synchronization.

Introducción

La aplicación de técnicas reproductivas en la ganadería permite aprovechar al máximo el potencial productivo de los animales de renta, a diferencia de los parámetros generados por la producción animal convencional (Valdés, 2016). Por ello, la aplicación de la biotecnología en la reproducción animal representa una oportunidad para buscar optimizar el potencial reproductivo y productivo de los animales (Córdova Izquierdo *et al.*, 2011). Así, por ejemplo, la Inseminación Artificial (IA) ha contribuido notablemente al desarrollo de la cunicultura industrial, debido a que la IA es un poderoso medio de mejora genética y de selección. Son varias las razones que justifican la aplicación de esta técnica. Todas ellas permiten aportar una serie de ventajas que no sólo mejoran la calidad de las producciones, sino también el costo final de la producción, porque su utilización garantiza una disminución del mismo.

El presente trabajo tiene la finalidad de valorar la factibilidad técnica y económica de la inseminación artificial en granjas cunícolas, bajo condiciones comerciales, en la República Dominicana.

Material y métodos

El estudio se realizó en el módulo cunícola del Centro de Producción Animal (CPA) del IDIAF. La investigación fue realizada bajo un diseño completamente al azar evaluando tres tratamientos con 8 repeticiones cada uno. La unidad experimental estuvo compuesta por una coneja adulta múltipara. Los tratamientos consistieron en: un grupo testigo cuyas hembras fueron servidas mediante monta natural (T1); otro en el cual las hembras fueron inseminadas sin sincronización de celo (T2) y un tercero el que las reproductoras fueron inseminadas con sincronización de celo mediante la aplicación intramuscular de 0.2 ml de prostaglandina F_{2α} 48 horas previas a la IA (T3). Fueron utilizados un total de 29 reproductores (24 hembras y 5 machos).

El efecto de la implementación de la IA en la producción de conejos, se evaluó a través de las siguientes variables: reproductivas (la fecundidad –porcentaje de hembras positivas a la palpación respecto a hembras cubiertas– y la prolificidad) y económica. La tasa de prolificidad fue evaluada a través de un análisis de varianza con la ayuda del software estadístico INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2008). Mientras que el estudio de factibilidad económica fue realizado mediante un análisis de costo marginal (CIMMYT, 1988).

Resultados y discusión

Tasa de fecundidad

En la **Figura 1** se puede observar que el porcentaje de fecundidad durante el período experimental favoreció a la monta natural (T1) con un 100% de hembras fecundadas. Aunque, los valores del referido parámetro en las conejas inseminadas se encuentran dentro de los considerados normales para esta especie. Estos valores concuerdan con los encontrados por Milanés *et al.* (2004), ya que obtuvieron una fecundidad promedio de 73.27% al evaluar diferentes métodos de sincronización del celo.

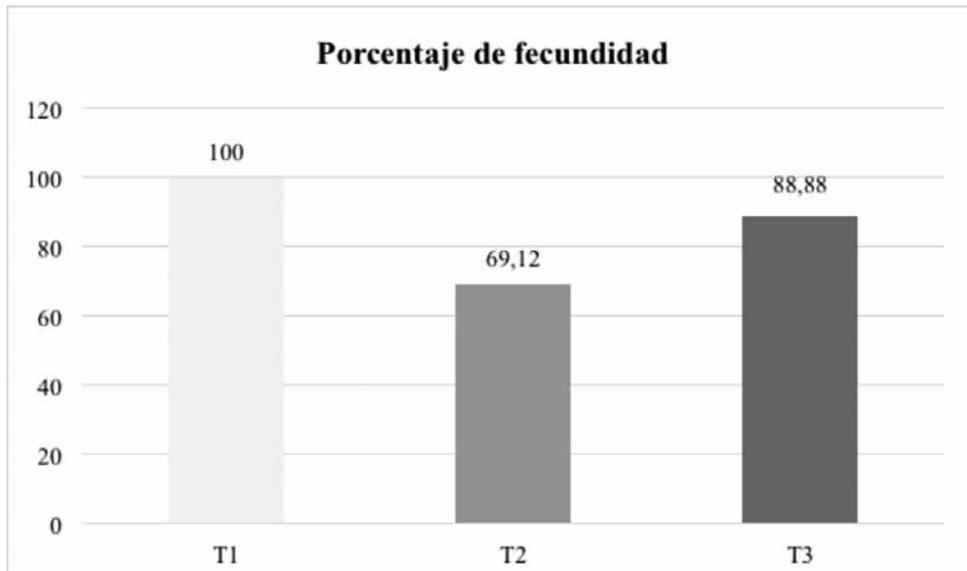


Figura 1. Tasa de fecundidad obtenida de la monta natural y la inseminación artificial con y sin sincronización de celo en conejos.

T1= monta natural; T2: inseminación artificial sin sincronización de celo T3: inseminación artificial + sincronización de celo.

Tasa de prolificidad

En la **Figura 2** se puede constatar que, aunque los valores de prolificidad resultaron superiores numéricamente en las hembras donde se implementó la inseminación artificial (T2 y T3), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas con relación a la monta natural.

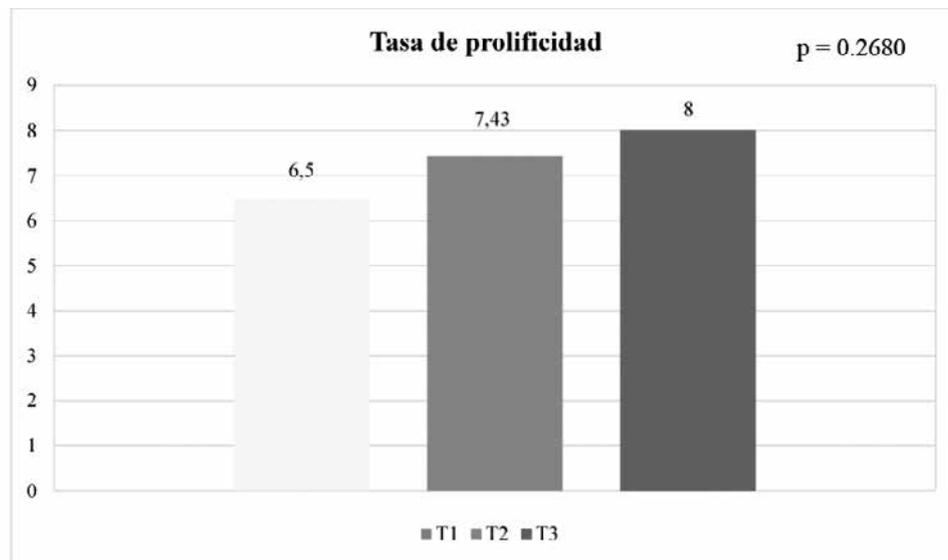


Figura 2. Tasa de prolificidad resultante de la monta natural y la inseminación artificial con y sin sincronización de celo en conejos.

T1= monta natural; T2: inseminación artificial sin sincronización de celo T3: inseminación artificial + sincronización de celo.

Análisis económico

El beneficio económico neto obtenido de los diferentes tratamientos mostró que la inseminación artificial + sincronización de celo fue mayor que la monta natural y la inseminación artificial sin sincronización (**Tabla 1**). Este resultado se atribuye a que el valor de prolificidad en este grupo experimental fue mayor (48 gazapos en total) con relación a 44 y 33 gazapos, producidos por los grupos experimentales 1 y 2, respectivamente. Sin embargo,

el análisis de retorno marginal aplicado a los tratamientos de reproducción (natural o asistida) revela que las ganancias por cada peso invertido en los tratamientos es similar (**Tabla 2**).

Tabla 1. Beneficio neto generado por monta natural y la inseminación artificial con y sin sincronización de celo en conejos.

Variable económica	Unidad	T1	T2	T3
Rendimiento	(g) PV	53,697.60	42,517.52	59,003.90
Rendimiento ajustado	(g) PV	48,327.84	38,265.76	53,103.51
Beneficio bruto	\$RD/periodo	17,720.21	14,030.78	19,471.29
Costo salto padrote	\$RD/periodo	63.00		
Costo dosis semen	\$RD/periodo		60.00	67.00
Alimento otros períodos	\$RD/periodo	7564	6000	8312
Costos totales que varían	\$RD/periodo	7,627.00	6,060.00	8,379.00
Beneficio neto	\$RD/periodo	10,093.21	7,970.78	11,092.29

T1= monta natural; T2= inseminación artificial sin sincronización de celo;
T3 = inseminación artificial + sincronización de celo y PV = peso vivo. Decimales indicados con punto y millares con coma.

Tabla 2. Análisis de retorno marginal que se obtiene al cambiar de monta natural a inseminación artificial.

Tratamiento	CTV \$RD	CTV \$RD/cambio	BN \$RD	BN \$RD/cambio	TRM (%)
T1	7,627.00	7,627.00	10,093.21	10,093.21	132
T2	6,060.00	(1,567.00)	7,970.78	(2,122.43)	135
T3	8,379.00	2,319.00	11,092.29	3,121.51	135

T1= monta natural; T2= inseminación artificial sin sincronización de celo T3; = inseminación artificial + sincronización de celo;
CTV = costos totales que varían; BN = beneficio neto y TRM = tasa de retorno marginal. Decimales indicados con punto y millares con coma.

Al realizar el análisis de costos beneficios para las tecnologías en estudio (**Tabla 3**), se encontró que el costo-beneficio generado por el tratamiento testigo (monta natural) fue ligeramente superior al de los tratamientos 2 y 3. Este resultado se atribuye a que el porcentaje de fecundidad en este tratamiento testigo fue superior a los demás.

Tabla 3. Análisis de costo beneficio de la monta natural y la inseminación artificial con y sin sincronización de celo.

Tratamiento	Costos totales que varían	Beneficio neto	Costo/Beneficio
T1	5,591.04	10,093.21	1.81
T2	6,392.00	7,970.78	1.25
T3	8,379.00	11,092.29	1.32

T1= monta natural; T2= inseminación artificial sin sincronización de celo T3 = inseminación artificial + sincronización de celo.
Decimales indicados con punto y millares con coma.

En conclusión, en este estudio la aplicación de la inseminación artificial redujo los porcentajes de fecundidad sin afectar las ganancias netas generadas por las tecnologías alternativas. Ello debido al aumento en la eficiencia de los machos utilizados en IA; por ejemplo, en el T2 el uso de la dosis seminal resultó más económica que el precio relativo al salto por hembra. Además, se evidenció que la mayor cantidad de gazapos obtenidos en las reproductoras inseminadas influyó de manera positiva el rendimiento en campo de estas tecnologías.

Bibliografía

CIMMYT. 1988. *La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos: un manual metodológico de evaluación económica*. CIMMYT, México.

Córdova Izquierdo A, Ruiz Lang CG, Xolalpa Campos V, Córdova Jiménez MS, Córdova Jiménez CA. 2011. *Animal biotechnologies play with possibility of implementation to optimize the reproductive and productive potential of animals. A review*. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, España*, 5(2):1-10.

Di Rienzo JA et al. 2008. *InfoStat, version 2008*. Córdoba: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Milanés A, Pereda N, Burgos I, Lorenzo PL, Rebolgar PG. 2004. *Parámetros reproductivos de conejas sometidas a diferentes métodos de sincronización de celo*. *XXIX Symposium de Cunicultura de ASESCU*. España, pp. 101-105.

Valdés J. 2016. *Efecto del tipo genético materno sobre el embrión, la supervivencia fetal y las características de crecimiento en conejos*. Tesis de Máster. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

PATOLOGÍA Y BIENESTAR

Eficacia de diferentes planes de vacunación frente a mixomatosis

Ramirez-Oliveras S, Baratelli M, Pedrola-Garrido, P, Fontseca-Presta M, Gascon S

Presentación de proyecto de investigación en estafilococia: pasado, presente y futuro

Mascarós-Núñez P, Martínez-Seijas C, Arnau A, Selva Martínez L, Viana D, Corpa JM

Epidemiología molecular y evolución de *Staphylococcus aureus*: resultados preliminares

Martínez Seijas C, Mascarós Núñez P, Arnau A, Selva Martínez L, Viana Martín D, Corpa Arenas JM

Estudio de la evolución de la sensibilidad antibiótica de los principales patógenos bacterianos en cunicultura de 2019 a 2021

del Caso S, Sanz C, Domínguez L, Chacón L

Efecto de diferentes técnicas de manejo como alternativa al uso de antibióticos sobre parámetros de estrés en conejos de cebo

Ramón-Moragues A, Carulla P, Gonçalves C, Escribano D, Torres R, Romero T, Martínez-Paredes E, Villagrà A

Efecto del enriquecimiento con bloques de heno y de la diferenciación de grupo por sexo sobre parámetros productivos, uso del espacio y resultados al sacrificio en conejos de engorde alojados en parques

Birolo M, Xiccato G, Zuffellato A, Pirrone F, Bordignon F, Trocino A

Los diferentes tipos de vacunas frente a RHDV-2 producen un diferente inicio en la respuesta de anticuerpos

Ramirez-Oliveras S, Baratelli M, Pedrola-Garrido, P, Fontseca-Presta M, Gascon S

Evaluación de la eficacia de ERAVAC® contra una cepa de la enfermedad hemorrágica del conejo tipo 2 (RHDV2) aislada en Francia en 2020

Perozo E, Montbrau C, Fontseca M, Gascon S

Biossegurança nas cuniculturas do norte de Portugal: Presente e Futuro

Morais, D, Coelho A, Pinheiro V, Monteiro, J

Biossegurança como ferramenta preventiva da colibacilose em coelhos

Morais, D, Coelho A, Pinheiro V, Monteiro, J

Eficacia de diferentes planes de vacunación frente a mixomatosis

Efficacy of different vaccination plans against myxomatosis

Ramirez-Oliveras S, Baratelli M, Pedrola-Garrido P, Fontseca-Presta M, Gascon S*

HIPRA, Amer (Girona), Spain.

*sandra.gascon@hipra.com

Resumen

Los planes de vacunación actuales frente a RHDV-2 y mixomatosis incluyen la administración de vacunas mono o polivalentes. Este estudio pretende evaluar la eficacia clínica de diferentes planes de vacunación contra dichas enfermedades. Para este propósito, se distribuyeron aleatoriamente conejas New Zealand White (n=85) en 6 grupos. Dos grupos se vacunaron respectivamente con una vacuna viva atenuada frente a mixomatosis administrada por vía subcutánea simultáneamente o no con una vacuna inactivada frente a RHDV-2, otro grupo con la misma vacuna viva atenuada frente a mixomatosis por vía intradérmica, otro grupo con una vacuna viva atenuada recombinante trivalente (RHD, RHDV-2 y mixomatosis), otro grupo con una vacuna inactivada frente a RHDV-2 y finalmente un grupo con una solución salina estéril. Todos los animales, menos el grupo control vacunado con la solución salina, se desafiaron con mixomatosis y la sintomatología clínica se monitorizó durante 21 días. La respuesta de anticuerpos producida en suero se monitorizó periódicamente mediante un ELISA indirecto frente a mixomatosis. Los resultados mostraron que la administración de la vacuna viva atenuada protegió a la mayoría de los animales del estudio, independientemente del tipo de plan vacunal aplicado. En particular, cuando esta vacuna se administró por vía intradérmica, ninguno de los animales del estudio desarrolló síntomas de mixomatosis. La vacuna viva atenuada recombinante protegió un 30-40% de los animales. La respuesta de anticuerpos frente a mixomatosis producida por la vacuna administrada por vía intradérmica destacaba entre los otros planes de vacunación probados. Ésta produjo un 93,3% de animales positivos mientras que los otros planes de vacunación entre 33,3 y 60%. Este estudio muestra que las vacunas actualmente disponibles presentan diferentes eficacias y producción de anticuerpos; dicha información es importante para el diseño y la monitorización de planes de vacunación en conejo frente a mixomatosis.

Palabras clave: mixomatosis, vacunas, eficacia, anticuerpos.

Abstract

Current vaccination plans against RHDV-2 and myxomatosis include the administration of monovalent or polyvalent vaccines. The aim of the present study was to evaluate the clinical efficacy of different vaccination plans against these diseases. For this purpose, New Zealand White rabbits (n=85) were randomly distributed into 6 groups. Two groups were vaccinated subcutaneously, both of them with a live attenuated vaccine against myxomatosis, and one of them with an inactivated vaccine against RHDV-2 in addition. Another group received the same live attenuated vaccine against myxomatosis administered intradermally, another group was given a trivalent recombinant live attenuated vaccine (RHD, RHDV-2 and myxomatosis), another one was vaccinated with an inactivated vaccine against RHDV2 and finally a last group was given a sterile saline solution. All the animals, except the control group vaccinated with the saline solution, were challenged with myxomatosis and clinical signs were monitored for 21 days. The antibody response produced in serum was periodically monitored by an indirect ELISA against myxomatosis. The results showed that the live attenuated vaccine that was administered protected most of the study animals regardless of the type of vaccination plan applied. Notably, when this vaccine was administered intradermally, none of the study animals developed symptoms of myxomatosis. The recombinant live attenuated vaccine protected 30-40% of the animals. The antibody response against myxomatosis produced by the intradermally administered vaccine stood out among the other vaccination plans tested. This produced 93.3% positive animals compared to the other vaccination plans with between 33.3% and 60%. The present study

helped to show that currently available vaccines have different efficacy and antibody production. This information is important for the design and monitoring of vaccination plans against myxomatosis in rabbits.

Keywords: myxomatosis, vaccines, efficacy, antibodies

Introducción

La mixomatosis y la enfermedad hemorrágica son las enfermedades víricas más importantes del conejo. Las medidas de control actuales incluyen la administración de vacunas mono o polivalentes frente a estas enfermedades. El presente estudio pretende comparar la eficacia frente a la mixomatosis utilizando diferentes estrategias de vacunación que implican la administración de una o dos vacunas monovalentes o de una vacuna polivalente.

Materiales y métodos

Se seleccionaron conejas libres de patógenos específicos de raza New Zealand White de 8 semanas de edad (Granja San Bernardo, España) y se distribuyeron en 5 grupos de 15 animales y un grupo control de 10 animales (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de los animales en grupos experimentales.

	Grupo A (n=15)	Grupo B (n=15)	Grupo C (n=15)	Grupo D (n=15)	Grupo E (n=15)	Grupo I (n=10)
VACUNAS	ERAVAC [®] y MIXOHIPRA [®] H (HIPRA) FRENTE A RHDV-2y MIXOMATOSIS	MIXOHIPRA [®] H (HIPRA) FRENTE A MIXOMATOSIS	MIXOHIPRA [®] H (HIPRA) FRENTE A MIXOMATOSIS	VACUNA VIVA RECOMBINANTE TRIVALENTE FRENTE A MIXOMATOSIS Y RHD	NO VACUNADOS FRENTE A MIXOMATOSIS	CONTROL PBS
Aplicación	Subcutáneo		Intradérmico	Subcutáneo		
Infección	Infección con 10 CCID50 cepa Lausanne (mixomatosis) D21p.v., intradérmica en el costado.					NO

Parte de los animales (n=10 grupos A, B, C, D y E y n=5 grupo I), fueron infectados con 10 CCID50 de la cepa Lausanne de mixomatosis a los 21 días post vacunación (dpv). El virus se administró en el costado de los animales por vía intradérmica. El estado de salud de las conejas se monitorizó hasta 21 días después del desafío. La respuesta de anticuerpos frente a mixomatosis se monitorizó periódicamente en la sangre de todos los animales mediante el kit ELISA CIVTEST[®] CUNI MIXO. Los resultados del ELISA se muestran como Índice Relativo (IR) como expresados por el fabricante. La comparación de los niveles de anticuerpos entre grupos se efectuó con la prueba de Kruskal-Wallis.

Resultados

La administración de la vacuna monovalente (A, B y C) frente a la mixomatosis produjo, antes del desafío (18 dpv), diferentes proporciones de animales seropositivos dependiendo de la vía de administración. Por vía intradérmica (C) un 93,3% de los animales fueron positivos y por vía subcutánea (A y B) produjo un mayor porcentaje de animales positivos cuando se administraba simultáneamente con la vacuna de RHD (A - 60%) que cuando se administraba sola (B - 35,7%). Sin embargo, dichas diferencias no son significativas debido al bajo número de animales. La vacuna trivalente (D) produjo un 33.3% de animales seropositivos. En cuanto a los niveles de anticuerpos, se observaron diferencias similares, aunque no estadísticamente significativas (**Figura 1**).

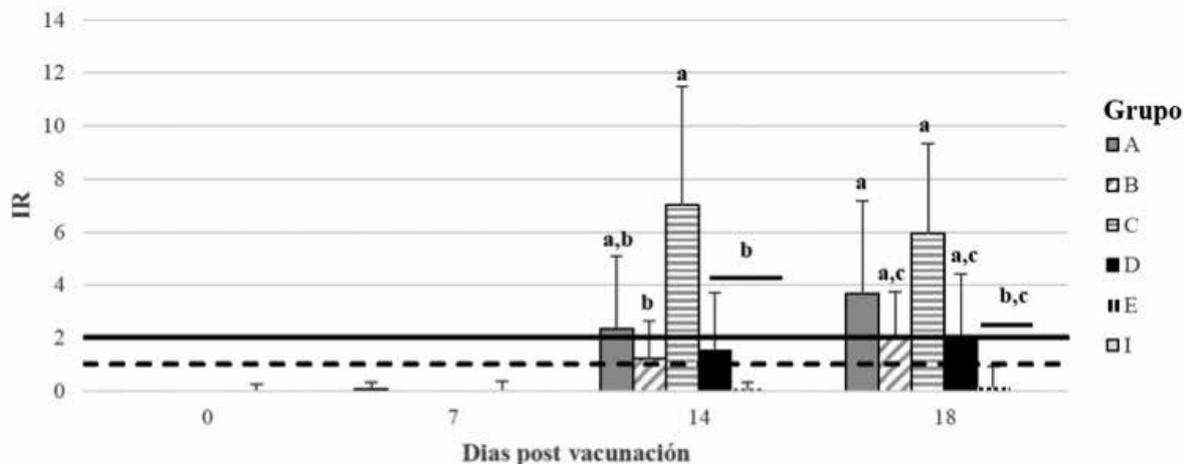


Figura 1. Respuesta de anticuerpos contra MYXV en sueros durante el periodo previo al desafío. Las líneas negras continuas y discontinuas representan, respectivamente, los puntos de corte positivo (>2 IR) y negativo (>1 IR) del ensayo. Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Kruskal-Wallis; n=14-15, p>0,05).

El desafío con mixomatosis produjo síntomas clínicos en el punto de administración y/o generales (p.ej. nódulos, edema, disnea) en un 100% de los animales no vacunados. En los grupos vacunados por vía subcutánea, únicamente el 10% (A) y el 22,22% (B) de los animales desarrollaron síntomas generales y un 30% (A) y 33,33% (B) presentaron síntomas (nódulo) en el punto de administración. Al contrario, ninguno de los animales vacunados por vía intradérmica (C) desarrolló síntomas clínicos. Finalmente, en el grupo vacunado con la vacuna trivalente, el 70% de los animales presentaron síntomas locales y el 60% presentó síntomas generales.

Discusión y conclusiones

Este es el primer estudio en evidenciar que, según el tipo de vacuna administrada, existen diferentes niveles de protección frente a la sintomatología clínica y diferentes títulos de anticuerpos. MIXOHIPRA® H confirió los niveles más altos de protección entre las vacunas estudiadas. Cabe destacar que los resultados sugieren que la vía de administración podría llegar a influenciar dicha eficacia. Además, la administración simultánea de dos vacunas monovalentes (A) no alteró este parámetro.

En lo que se refiere a los anticuerpos frente a la mixomatosis, no se considera que haya correlación con el nivel de protección frente a la enfermedad (Kerr y McFadden, 2002). A pesar de ello, el presente estudio sugiere que la vía de administración y la administración conjunta con ERAVAC® podrían ser factores importantes para mejorar la respuesta de anticuerpos.

En conclusión, el presente estudio identificó que tanto la vía de administración, como el tipo de vacuna utilizada, son factores clave que se deben tener en cuenta para poder optimizar los planes de vacunación frente a la mixomatosis.

Bibliografía

Kerr P, McFadden G. 2022. Immune responses to myxoma virus. *Viral Immunol* 15(2):229-246.

Presentación de proyecto de investigación en estafilococia: pasado, presente y futuro

Exposition of a research project on Staphylococcus aureus infection: past, present and future

Mascarós-Núñez P*, Martínez-Seijas C, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM

Grupo de investigación "Patología y Sanidad Animal", PASAPTA, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, c/ Assegadors nº 2, 46115 Alfara del Patriarca, Valencia, Spain.

*patricia.mascarosnunez@uchceu.es

Resumen

Esta presentación tiene como objetivo presentar al sector cunícola el proyecto "*Epidemiología molecular y evolución de Staphylococcus aureus en conejos, con especial atención a su virulencia y resistencia a meticilina*" financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-117897RB-I00) que tiene como principal objetivo caracterizar genéticamente los aislados de *S. aureus* obtenidos en granjas de la Península Ibérica (tanto de animales como de personal trabajador y veterinarios) para encontrar nuevos genes o mutaciones que pudieran explicar el aumento de la virulencia de los brotes de *S. aureus*, y probar distintos productos terapéuticos. Esta información acerca de las cepas nos permitirá poder relacionarla con su patogenicidad; así como realizar antibiogramas para conocer sus posibles resistencias y facilitar la utilización precoz de los antibióticos más eficaces. Esta información se transmitirá, de forma anónima, en una plataforma online de acceso restringido que pretende mantener informados a los participantes en el proyecto de la distribución por comunidades autónomas de las cepas y su sensibilidad antibiótica. Esto ayudará a disminuir el uso de antibióticos genéricos y, por tanto, de las resistencias a los mismos, además de establecer un protocolo de prevención y tratamiento temprano, favoreciendo la salud de los animales y disminuyendo el impacto económico que produce actualmente *S. aureus* en las granjas. Se trata de un proyecto en curso, abierto a la participación voluntaria del sector cunícola a través de sus veterinarios.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), epidemiología, virulencia, antibióticos, tratamiento.

Abstract

This exposition aims to disclose the project "*Staphylococcus aureus's molecular epidemiology and evolution in rabbits, with special attention to its virulence and methicillin resistance*". It is funded by the Ministry of Science and Innovation (PID 2020-117897RB-I00), and has as objective to genetically characterize *S. aureus* isolates obtained in farms in the Iberian Peninsula (from animals, workers and veterinarians), to find new genes or mutations which could explain the increase on outbreak's virulence, and the trial of new therapies. This information obtained about the strains would allow us to correlate with their pathogenicity, as well as elaborate antibiograms to find out their resistances and fast-track the use of correct and efficient antibiotherapies. This information will be transmitted anonymously to an online platform with restricted access, whose intention is to maintain informed to every participant on this project about the distribution of strains throughout the autonomous communities and their antibiotic sensibility testing results. This will help diminish the use of generic antibiotics, and as a consequence, their resistance profile; as well as to establish a prevention protocol and prompt treatment, stimulating animal's health and lowering the economic impact that nowadays is producing *S. aureus* in rabbit farms. This project has been launched this year, open to voluntary participation of all the sector through their veterinarians.

Keywords: *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA), epidemiology, virulence, antibiotics, treatment.

Introducción

Staphylococcus aureus es una importante bacteria patógena tanto para el hombre como para los animales debido a la gran variedad de infecciones que es capaz de producir y a la aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos. En los últimos años, se ha incrementado el número de infecciones producidas por cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA, por sus siglas en inglés) y vancomicina (VRSA, por sus siglas en inglés) constituyendo un grave problema de salud pública (McGuinness *et al.*, 2017). Por este motivo, organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) consideran que la resistencia a los antibióticos constituye una emergencia sanitaria, incluyendo a los MRSA en su lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos.

La aplicación de las técnicas de tipado molecular en cepas de *S. aureus* humanas y animales ha revelado que se encuentran predominantemente asociadas con una única especie de hospedador, permitiendo definir qué grupos de cepas están adaptadas a cada hospedador (Haag *et al.*, 2019).

En los últimos años, veterinarios y cunicultores han mostrado su preocupación por la aparición de brotes de estafilococia especialmente virulentos y resistentes a los tratamientos antibióticos tradicionales. Esto podría ser debido a la evolución y/o aparición de nuevas cepas de *S. aureus* en las granjas cunícolas que podrían haber desarrollado nuevos mecanismos de virulencia y capacidad de resistencia a los antibióticos.

Material y métodos

Con el fin de confirmar esta hipótesis en este proyecto de investigación se van a realizar los siguientes estudios:

Estudio 1

Identificación de nuevos clones de *S. aureus* responsables de la estafilococia en conejos. Basándonos en resultados preliminares de nuestro grupo, la hipótesis de partida es que, en los últimos 4-5 años, están apareciendo nuevas cepas virulentas de *S. aureus* en las granjas comerciales cunícolas que están desplazando a las descritas hace 10-15 años. En algunos casos, se está produciendo un intercambio de cepas asociadas a la ganadería, propias de los conejos, entre los animales y los trabajadores de las granjas. Por ello, se está realizando un muestreo general en todas las comunidades autónomas españolas y, en ocasiones, portuguesas, no solo de animales, sino también de ganaderos y veterinarios (atendiendo, por supuesto, al régimen de protección de datos y sin vulnerar la privacidad de los participantes en el proyecto en ningún caso).

Estudio 2

Creación de una plataforma online donde se muestre geográficamente, por comunidades autónomas, la distribución de los diferentes genotipos y complejos clonales de *S. aureus*, así como su sensibilidad a los antibióticos y su evolución en el tiempo. Aunque en una granja puede haber varias cepas de *S. aureus*, es habitual que los brotes de estafilococias estén ocasionados por una única cepa que ha evolucionado debido a la elevada presión antibiótica. Ante un brote virulento compatible con estafilococias, es común que se realice una primera administración de antibióticos de amplio espectro, antes de conocer la sensibilidad antibiótica de la/s bacteria/s involucrada/s. Este procedimiento favorece la selección de bacterias resistentes. Por lo tanto, con este objetivo se contribuiría a una administración precoz de antibióticos más efectiva y, por tanto, contribuir a reducir las resistencias. El mantenimiento en el tiempo de esta plataforma permitiría obtener información muy valiosa sobre la evolución de esta bacteria a lo largo de los años en las granjas.

Estudio 3

Definir y caracterizar elementos genéticos que potencialmente puedan contribuir a que nuevos clones de *S. aureus* hayan incrementado la virulencia de las infecciones y/o permitan adaptarse a un nuevo hospedador. La hipótesis, señalada anteriormente y que surge de resultados preliminares de nuestro grupo de investigación, es que hay cepas que han mutado a lo largo de los últimos años, apareciendo nuevas variantes de ciertos genes no descritos hasta la fecha. Mediante la comparación de secuencias se pretende identificar mutaciones comunes entre los nuevos clones de *S. aureus* pero que no estén presentes en cepas homólogas descritas previamente, tanto en conejos como en ganaderos o veterinarios que trabajan en las explotaciones. Esta metodología, llamada vigilancia genómica, se está convirtiendo en la técnica de referencia para el análisis, vigilancia y control de patógenos.

Estudio 4

Caracterización *in vitro* e *in vivo* de genes de *S. aureus* esenciales en la evasión de la respuesta inmunitaria. En este estudio se pretende seguir profundizando en el conocimiento sobre la patogenia de las infecciones por *S.*

aureus. Se ha demostrado que los genes de virulencia se regulan por dos sistemas globales, que son esenciales en las cepas humanas y de conejos. A partir de estos hallazgos, se pretende estudiar el comportamiento de estos genes y caracterizar los cambios que varíen la virulencia de las cepas.

Estudio 5

Tratamientos alternativos a los antibióticos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye a *S. aureus* resistente a metilina entre los patógenos de prioridad elevada, con el objeto de promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos y tratamientos alternativos. En esta línea, la evaluación del nivel de resistencia de las diferentes cepas de *S. aureus* y en especial las MRSA frente a diferentes compuestos con actividad antimicrobiana supondría una hipótesis de partida interesante para el desarrollo de tratamientos alternativos, como el estudio de virus bacteriófagos, nanopartículas de plata y ácido láurico, que han demostrado tener cierta eficacia en estudios previos.

Resultados y discusión

Los resultados preliminares obtenidos en los primeros meses de ejecución de este proyecto se muestran en la comunicación titulada "Epidemiología molecular y evolución de *Staphylococcus aureus*: resultados preliminares" presentada en este mismo Symposium.

Hasta la fecha, más de 6000 tipos de secuencias (STs) representando diferentes genotipos de *S. aureus*, han sido identificadas y depositadas en bases de datos públicas online. Estos STs pueden, además, agruparse en complejos clonales (CC). Múltiples trabajos en ganado, incluyendo vacas, ovejas, cabras, aves de corral y conejos, han estudiado su relación con las ST humanas representadas en estas bases de datos (Guinane *et al.*, 2010; Lowder *et al.*, 2009), y han demostrado que la gran mayoría de los aislamientos en ganado pertenecen a un pequeño número de clones asociados con animales: CC1 (ganado), CC5 (aviar) CC130 (multi-huésped), CC133 (rumiantes), CC151 (rumiantes), CC398 (ganado) y CC425 (rumiantes y mamíferos salvajes) (Harrison *et al.*, 2017; Haag *et al.*, 2019).

En el caso de conejos, se realizó una caracterización molecular de aislados de *S. aureus*, determinándose que las lesiones estaban producidas principalmente por unos pocos genotipos, destacando el clon ST121 con más del 75% de los casos, seguido del clon ST96 (Viana *et al.*, 2007). Estos resultados coincidían con otros trabajos que describían la aparición de un clon epidémico altamente virulento, el ST121, que se asociaba con abscesos cutáneos y mastitis en conejos comerciales en toda Europa (Vancraeynest, 2006). Por otra parte, se ha demostrado como las cepas ST121 presentan mayor virulencia que los aislados ST96, tanto de forma *in vitro* como en modelos *in vivo* (Penadés *et al.*, 2020). Como se ha indicado anteriormente, a pesar de que el número de genotipos aislados de estafilococias en conejos ha sido limitado, en los últimos años se ha reportado un incremento en el número y gravedad de los casos en cunicultura, los cuales, según indicaciones de los veterinarios y ganaderos, son más virulentos, no responden a los tratamientos antibióticos tradicionales y persisten en las granjas, afectando a su viabilidad económica (Pérez-Fuentes *et al.*, 2017).

Los objetivos del proyecto, por lo tanto, se basan en estos hallazgos previos, y se orientan en resolver principalmente problemas incluidos en el Plan Estatal: "sostenibilidad de los sistemas de producción primaria y forestales, seguridad y calidad alimentaria". En un primer momento, los resultados afectarán a los ganaderos, en concreto al sector cunícola, pero podría tener impacto en otros sectores ganaderos y en consecuencia a los veterinarios y la medicina humana.

Como conclusión, este proyecto no solo fomenta ampliar el conocimiento que tenemos hasta la fecha del patógeno *S. aureus*, sino que pretende ser una fuente de información tremendamente valiosa para el sector cunícola. Cada cepa bacteriana está asociada a unas características específicas, que permiten establecer el tratamiento y la prevención necesaria en cada caso de forma individualizada. Se trata de un proyecto abierto a participación por parte de los ganaderos a través de sus veterinarios de confianza, que no solo aportará información puntual de los problemas de forma individualizada, sino que arrojará luz sobre un futuro común para todo el sector cunícola.

Toda la información obtenida acerca de las cepas aisladas en el proyecto será transmitida a los remitentes de forma individualizada y, de igual forma, serán continuamente informados sobre los hallazgos en sus cepas durante el transcurso del proyecto de investigación. Por lo tanto, animamos a todos los veterinarios, técnicos y ganaderos a participar en este interesante proyecto mediante el envío de muestras a nuestro laboratorio. Nuestro correo de contacto es patricia.mascarosnunez@uchceu.es

Agradecimientos

Este proyecto está financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-117897RB-I00). Los contratos predoctorales de Carmen Martínez Seijas y Patricia Mascarós Núñez están financiados por la Universidad CEU

Cardenal Herrera. Asimismo, quisiéramos poner de manifiesto nuestro agradecimiento a todos los ganaderos y veterinarios que participan activamente tomando muestras y facilitándonos información sobre los casos. En especial, quisiéramos agradecer su colaboración al laboratorio Exopol S.L. por compartir parte de sus cepas.

Bibliografía

Guinane CM, Ben Zakour NL, Tormo-Mas MA et al. 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol Evol* 2:454-466.

Haag AF, Fitzgerald JR, Penadés JR. 2019. *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiol Spect* 7(3).

Harrison EM, Coll F, Toleman MS et al. 2017. Genomic surveillance reveals low prevalence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the East of England. *Sci Rep* 7(1):7406.

Lowder BV, Guinane CM, Ben Zakour NL et al. 2009. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19545-19550.

McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. 2017. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Bio Med* 90(2):269-281.

Penadés M, Viana D, García-Quirós A et al. 2020. Differences in virulence between the two more prevalent *Staphylococcus aureus* clonal complexes in rabbitries (CC121 and CC96) using an experimental model of mammary gland infection. *Vet Res* 51(1):1-15.

Pérez-Fuentes S, Muñoz-Silvestre A, Moreno-Grúa E et al. 2017. Estado actual de las cepas de *Staphylococcus aureus* en granjas cunícolas. XLII Symposium de cunicultura. ASESCU. Murcia. España.

Vancraeynest D, Haesebrouck F, Deplano A et al. 2006. International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53(9):418-422.

Viana D, Selva L, Segura P, Penades JR, Corpa JM. 2007. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit lesions. *Vet Microbiol* 121:288-298.

Epidemiología molecular y evolución de *Staphylococcus aureus*: resultados preliminares

Molecular epidemiology and evolution of Staphylococcus aureus: preliminary results

Martínez-Seijas C*, Mascarós-Núñez P, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM

Grupo de investigación "Patología y Sanidad Animal", PASAPTA, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, c/ Assegadors nº 2, 46115 Alfara del Patriarca, Valencia, Spain.

*carmen.martinezseijas@uchceu.es

Resumen

Staphylococcus aureus es una bacteria de gran relevancia para el sector cunícola, debido a su impacto económico. La preocupación crece en las granjas, sobre todo en los últimos años, debido al aumento del número de casos de estafilococias y a su mayor virulencia. El grupo de Patología y Sanidad Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera está liderando un proyecto financiado por el MICINN (PID2020-117897RB-I00) que tiene como principal objetivo caracterizar genéticamente los aislados de *S. aureus* obtenidos en granjas de la Península Ibérica para encontrar nuevos genes o mutaciones que pudieran explicar el aumento de la virulencia. Para ello, hasta la fecha, se han tomado muestras de animales con diferentes lesiones compatibles con estafilococias en 155 explotaciones. En los aislamientos se han encontrado tanto cepas descritas con anterioridad como nuevas. Esto podría justificar un cambio en la virulencia de los brotes. No obstante, esta hipótesis hay que confirmarla mediante estudios genéticos más detallados, que se llevarán a cabo en los próximos años. En este documento se muestran los resultados obtenidos hasta el momento.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, SARM, epidemiología, virulencia, antibióticos, tratamiento.

Abstract

Staphylococcus aureus is a major pathogen in commercial rabbitries due to its economic impact. The increase in the number and virulence of staphylococcal cases in the last years concerns both veterinarians and farmers. The Animal Pathology and Health group of the CEU Cardenal Herrera University leads a project funded by the MICINN (PID2020-117897RB-I00) whose main objective is to genetically characterize *S. aureus* isolates obtained from farms in the Iberian Peninsula to find new genes or mutations that may explain the increase in virulence. For this purpose, to date, samples have been taken from animals with different lesions compatible with *S. aureus* in 155 farms. Both previously described and new strains have been found among the isolates. This could justify a change in the virulence of the outbreaks. However, this hypothesis needs to be confirmed by more detailed genetic studies, which will be carried out in the coming years. This article shows the results obtained so far.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, epidemiology, virulence, antibiotics, treatment.

Introducción

Las estafilococias suponen uno de los principales desafíos sanitarios a los que se enfrenta la producción animal. En el ámbito de la cunicultura comercial es especialmente relevante dado que afecta a todos los estratos de producción y da lugar a diferentes lesiones de carácter supurativo como mastitis, abscesos, pododermatitis, etc. (Segura *et al.*, 2007).

La caracterización de *S. aureus* es una herramienta esencial para poder entender en profundidad la patogenicidad de las cepas y desarrollar estrategias de tratamiento y prevención. El análisis filogenético de las cepas se

realiza mediante el MLST ("Multi locus sequence typing"), técnica basada en la secuenciación de siete regiones conservadas del genoma. Cada tipo de cepa de *S. aureus* tiene asignado un ST (tipo de secuencia). A su vez cepas con diferentes ST se agrupan en CC (complejos clonales) en base a su filogenia. Cada complejo clonal puede llevar asociado una serie de factores de virulencia y elementos genéticos móviles distintivos. Por tanto, el estudio del acervo genético de las cepas puede ayudar a entender cómo se comportan durante el proceso de infección (Peacock *et al.*, 2002).

La cepa más extendida, clásicamente, en cunicultura es la ST121 seguida de la ST96 (Viana *et al.*, 2015; Vancraeynest *et al.*, 2006). Las pruebas *in vitro* e *in vivo* ponen de manifiesto las diferencias entre ellas, siendo el ST121 un clon altamente virulento (Penadés *et al.*, 2020). Sin embargo, en los últimos años, se ha reportado un aumento en el número y la gravedad de casos de estafilococias en granja (Pérez-Fuentes *et al.*, 2017). El análisis molecular de las cepas implicadas hace pensar que se está produciendo un cambio en la tendencia de las cepas aisladas que, en algunos casos, son resistentes a varios tipos de antibióticos (Moreno-Grúa *et al.*, 2018).

Para confirmar estos indicios se ha iniciado un proyecto de investigación (PID2020-117897RB-I00) financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) que se enfoca en el estudio y caracterización de las cepas actuales, con el fin de entender cómo ha sido la evolución desde las cepas tradicionales hasta la actualidad. Los objetivos principales del proyecto son: (1) recopilación y estudio de las cepas actuales de *S. aureus* y su distribución a lo largo del país; (2) analizar y caracterizar sus elementos genéticos que potencialmente puedan contribuir a que nuevos clones de *S. aureus* hayan incrementado la virulencia de las infecciones; y (3) creación de una plataforma web pública, de acceso restringido, donde se muestre la distribución de los diferentes genotipos, así como su resistencia a los antibióticos y su evolución en el tiempo. En este trabajo se presentan los resultados preliminares del primer objetivo.

Material y métodos

Muestreo

Se muestrearán 50 granjas en cada comunidad autónoma, siempre que sea posible. En cada granja, se tomarán dos muestras de animales que presenten lesiones compatibles con una infección por *S. aureus* (pododermatitis, mastitis, abscesos, etc.) mediante una torunda estéril.

Identificación

Las muestras se siembran en placas de agar sangre y se incuban a 37°C durante 24h. Tras 24h, se identifican las colonias compatibles con *S. aureus* en base a su morfología y capacidad hemolítica y son sembradas en caldo de tripton de soja (TSB) para la posterior extracción del ADN. Con este ADN se realiza la amplificación del gen coagulasa (*coa*), que sirve como confirmación del aislamiento de *S. aureus*.

Caracterización de cepas

La caracterización inicial de las cepas se realiza mediante el análisis de las regiones polimórficas de tres genes: *coa*, *spa* y *clfB* (Viana *et al.*, 2007). De este modo, se puede discriminar de manera ágil y rápida las cepas presentes en las granjas. Tras este tipado inicial, se seleccionan las cepas de interés para un análisis más exhaustivo. A nivel genético se realiza el tipado por MLST y la detección de ciertos factores de virulencia de interés, sobre todo los presentes en bacteriófagos, islas de patogenicidad y el casete cromosómico estafilocócico *mec* (*SCCmec*).

Resultados y discusión

Durante los primeros 6 meses del proyecto han sido muestreadas 155 granjas de las 433 granjas totales a muestrear (35,8%) (Tabla 1). Hasta ahora, el norte peninsular ha tenido una mayor intensidad de muestreo, habiendo alcanzado el número de explotaciones objetivo en Galicia y el 50% en Cataluña y Castilla y León. Se prevé haber reunido el 80% de las muestras antes de que finalice el año.

Tabla 1. Ritmo de muestreo de las granjas comerciales.

Comunidades Autónomas	Granjas totales	Granjas a muestrear	Granjas muestreadas
Andalucía	23	23	1
Aragón	143	50	10
Asturias/Cantabria	17	17	2
Castilla-La Mancha/Madrid	81	50	8
Castilla y León	174	50	29
Cataluña	475	50	25
Extremadura	7	7	0
Galicia	194	50	50
La Rioja/ Navarra/País Vasco	52	50	16
Murcia	36	36	2
Valencia	156	50	12
Total	1358	433	155

Desde el punto de vista de la caracterización de las cepas obtenidas, la primera aproximación ha mostrado una gran diversidad. El análisis basado en el polimorfismo de los genes *coa*, *spa* y *clfB* ha evidenciado 31 genotipos diferentes. Once de ellos habían sido previamente detectados por nuestro grupo. Los 20 restantes presentan ligeras modificaciones respecto a los genotipos tradicionales o eran completamente nuevos. Esta tendencia de evolución y diversificación de las cepas circulantes sigue en la línea de lo señalado por Pérez-Fuentes *et al.* (2017). Los datos recopilados por Viana *et al.* (2007) señalaban como más frecuente el genotipo A1 II1 δ , con un 70% de los aislados de lesiones en conejos. Diez años más tarde, su prevalencia se había reducido hasta representar un 18,5% de los aislados (Pérez-Fuentes *et al.*, 2017). En el estudio actual, este genotipo solo ha representado un 3% de los aislados, destacando en su lugar el genotipo A1 II1 η alcanzando casi un 25%.

En base a resultados anteriores, cada genotipo se asocia a un complejo clonal concreto (Pérez-Fuentes *et al.*, 2017). De los 164 aislamientos, el 75% pertenecen al CC121 y un 15,7% al CC96 (Tabla 2). Por tanto, estos dos linajes siguen siendo los predominantes en cunicultura (Vancaeynest *et al.*, 2006; Viana *et al.*, 2015). Por otra parte, se han detectado los complejos clonales CC8 y CC1, con porcentajes minoritarios del 1,8% y el 0,6%. Probablemente, la menor presencia de estos complejos clonales en granjas de conejos sea debido a que ambos linajes están estrechamente vinculados a la especie humana y con menor grado de adaptación al conejo, a pesar de haberse aislado en diferentes especies animales (Haag *et al.*, 2019). El 6,7% restante corresponde a la aparición de nuevas combinaciones en el genotipo y que, por tanto, por el momento no se han podido relacionar con un complejo clonal concreto.

Tabla 2. Recuento de los complejos clonales asociados al genotipo.

Complejo Clonal asociado	Nº de aislamientos	%
CC121	123	75
CC96	26	15,7
CC8	3	1,8
CC1	1	0,6
Desconocido	11	6,7
Total	164	100

La presencia del complejo clonal predominante, CC121, es bastante homogénea, encontrándose en todas las comunidades autónomas muestreadas (Tabla 3). En cambio, el CC96 se encuentra en 5 de las 8 comunidades analizadas. Por el contrario, el CC1 y CC8 únicamente se han identificado en País Vasco y Cataluña. La variabilidad de las cepas dentro de un mismo complejo clonal viene reflejada por los diferentes genotipos obtenidos. En este caso, se puede observar que en las 8 comunidades autónomas muestreadas existen no solo varios complejos clonales circulando, sino también diferentes cepas dentro de un mismo complejo clonal. De hecho, en algunas granjas se ha detectado más de un genotipo generando patología en los animales.

Tabla 3. Distribución de cepas de *S. aureus* por Comunidades Autónomas.

Comunidad Autónoma	Nº de genotipos obtenidos	CC asociado
Aragón	2	96
	2	121
Castilla-La Mancha	1	121
	1	96
Castilla y León	4	121
	2	Desconocido
Cataluña	2	8
	7	121
Comunidad Valenciana	4	Desconocido
	2	96
Galicia	3	121
	1	Desconocido
Murcia	2	96
	4	121
País Vasco	2	Desconocido
	1	121
	1	1
	4	96
	3	121

A la vista de los resultados preliminares del proyecto, cabe afirmar que los complejos clonales tradicionalmente descritos en la cunicultura siguen siendo los principales en las granjas actualmente. No obstante, las cepas vinculadas a estos linajes parecen ser objeto de múltiples cambios. Todo ello estaría provocando una alteración del equilibrio entre los diferentes genotipos, modificando su prevalencia e impulsando la aparición de otros nuevos. Por tanto, es necesario continuar con una caracterización más exhaustiva mediante el tipado MLST y la detección de factores de virulencia para lograr comprender la evolución de los casos de estafilococias en las explotaciones cunícolas.

Por último, animamos a todos los veterinarios, técnicos y ganaderos a participar en este interesante proyecto mediante el envío de muestras a nuestro laboratorio. Nuestro correo de contacto es carmen.martinezseijas@uchceu.es

Agradecimientos

Este proyecto está financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-117897RB-I00). Los contratos predoctorales de Carmen Martínez Seijas y Patricia Mascarós Núñez están financiados por la Universidad CEU Cardenal Herrera. Asimismo, quisiéramos poner de manifiesto nuestro agradecimiento a todos los ganaderos y veterinarios que participan activamente tomando muestras y facilitándonos información sobre los casos. En especial, quisiéramos agradecer su colaboración al laboratorio Exopol S.L. por compartir parte de sus cepas.

Bibliografía

- Haag AF, Fitzgerald JR, Penades JR. 2019. *Staphylococcus aureus* in animals. *Microbiol Spectrum* 7(3):GPP3-0060-2019.
- Moreno-Grúa E, Pérez-Fuentes S, Muñoz-Silvestre A, Viana D, Fernández-Ros AB, Sanz-Tejero C, Corpa JM, Selva L. 2018. Characterization of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from commercial rabbitries located in the Iberian peninsula. *Front Microbiol* 9:1812.
- Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Nicholas PJ. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70 (9):4987-4996.

Penadés M, Viana D, García-Quirós A, Muñoz-Silvestre A, Moreno-Grua E, Pérez-Fuentes S, Pascual JJ, Corpa JM, Selva L. 2020. Differences in virulence between the two more prevalent *Staphylococcus aureus* clonal complexes in rabbitries (CC121 and CC96) using an experimental model of mammary gland infection. *Vet Res* 51(1):1-15.

Pérez-Fuentes S, Muñoz-Silvestre A, Moreno-Grúa E, Viana D, Selva L, Corpa JM. 2017. Estado actual de las cepas de *Staphylococcus aureus* en granjas cunícolas. En: *XLII Symposium de Cunicultura ASESCU*. Murcia, España. pp. 87-90.

Segura P, Martínez J, Peris B, Selva L, Viana D, Penades JR, Corpa JM. 2007. Staphylococcal infections in rabbit does on two industrial farms. *Vet Rec* 160(25):869-873.

Vancraeynest D, Haesebrouck F, Deplano A, Denis O, Godard C, Wildemaue C, Hermans K. 2006. International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J Vet Med, Series B* 53(9):418/22.

Viana D, Selva L, Segura P, Penadés JR, Corpa JM. 2007. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit lesions. *Vet Microbiol* 121(3-4):288-298.

Viana D, Comos M, McAdam PR, Ward MJ, Selva L, Guinane CM, González-Muñoz BM, Tristan A, Foster SJ, Fitzgerald JR, Penades JR. 2015. A single natural nucleotide mutation alters bacterial pathogen host-tropism. *Nat Genet* 47(4):361.

Estudio de la evolución de la sensibilidad antibiótica de los principales patógenos bacterianos en cunicultura de 2019 a 2021

Study of the evolution of the antibiotic sensitivity of the main bacterial pathogens in rabbit farming from 2019 to 2021

Del Caso S*, Sanz C, Domínguez L, Chacón G

Exopol, 50840 San Mateo de Gállego, España.

*sdelcaso@exopol.com

Resumen

Staphylococcus aureus, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli* o *Salmonella* sp. ocasionan enfermedades en conejos que disminuyen la productividad y la calidad de vida, pero el desarrollo de resistencias y los planes adoptados para su control dificulta su tratamiento. Se han analizado 4386 resultados de antibiogramas obtenidos mediante la técnica Kirby-Bauer en muestras clínicas de granjas cunícolas procedentes de la Península Ibérica recibidas en Exopol durante los años 2019-2021. Se evaluó la evolución de la sensibilidad antibiótica a lo largo del tiempo mediante la prueba estadística Chi-cuadrado. Se realizaron 905 antibiogramas de *P. multocida*, más del 80% de las cepas fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos testados. De los 1066 antibiogramas de *S. aureus*, más del 90% de las cepas testadas fueron sensibles a la combinación de sulfametoxazol-trimetoprima. Pero, menos del 30% de las cepas fueron sensibles a tetraciclina, y menos del 15% a enrofloxacin. De *Salmonella* spp., se han evaluado 118 antibiogramas obteniendo un alto porcentaje de cepas sensibles a colistina, gentamicina, y trimetoprima-sulfametoxazol. Presenta muchas resistencias a bacitracina, apramicina, eritromicina, espiramicina y valnemulina. Se analizaron 2297 de antibiogramas de *E. coli*. 13 de 18 antibióticos testados frente a *E. coli*, no superaron el 50% de cepas sensibles a ellos en el 2021. En *E. coli* para apramicina y neomicina hay una disminución significativa de la sensibilidad respecto al tiempo. Por el contrario, hay un aumento significativo del porcentaje de cepas sensibles respecto al tiempo de enrofloxacin en *Salmonella* spp. y *E. coli*, que puede deberse a la reducción de su uso por la clasificación de antibióticos de la EMA. Es preocupante la situación de *E. coli* y comienza a serlo la de *Salmonella* spp. El uso racional de los antibióticos ayuda a reducir las resistencias y es necesario realizar estudios para valorar su evolución e indicación de los medicamentos autorizados en España.

Palabras clave: sensibilidad antibiótica, pasteurelisis, salmonelosis, colibacilosis, estafilococia.

Abstract

Staphylococcus aureus, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli* or *Salmonella* spp. cause diseases in rabbits that decrease productivity and quality of life. But the development of resistance makes it difficult to treat. The results of 4,386 antibiograms obtained with the Kirby-Bauer technique was evaluated, from clinical samples of Iberian Peninsula's rabbit farms received at Exopol during the years 2019-2021. The evolution of antibiotic sensitivity over time was evaluated using the Chi-square statistical test. 905 *P. multocida* antibiograms were performed. More than 80% of the strains were sensitive to most of the antibiotics tested. From the 1066 antibiograms of *S. aureus*, more than 90% of the strains tested were sensitive to the combination of sulfamethoxazole-trimethoprim. However, less than 30% of the strains were sensitive to tetracycline, and less than 15% were sensitive to enrofloxacin. From *Salmonella* spp., 118 antibiograms have been evaluated, obtaining a high percentage of strains sensitive to colistin, gentamicin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. It presents many resistances to bacitracin, apramycin, erythromycin, spiramycin and valnemulin. 2,297 antibiograms were analyzed for *E. coli* strains. 13 of 18 antibiotics tested against *E. coli* did not exceed 50% of strains sensitive to them in 2021. For apramycin and neomycin

there is a significant decrease in sensitivity over time. There is a significant increase in the percentage of sensitive strains with respect to enrofloxacin time in *Salmonella spp.* and *E. coli*, which may be due to reduced use by the EMA antibiotic classification. The situation of *E. coli* is worrying and it is beginning to be for *Salmonella spp.* The rational use of antibiotics helps to reduce antibiotic resistance, and it is necessary to carry out studies to assess its evolution and indication of authorized drugs in Spain.

Keywords: antibiotic sensitivity, pasteurellosis, salmonellosis, colibacillosis, staphylococcal.

Introducción

Los patógenos bacterianos más frecuentes en las granjas de conejos, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli* o *Salmonella spp.* ocasionan enfermedades que disminuyen la productividad y la calidad de vida, además de aumentar la tasa de mortalidad y abortos, siendo necesario el tratamiento de los animales afectados.

Pasteurella multocida es el principal agente causal de la pasteurellosis, colonizando las vías respiratorias superiores, produciendo rinitis o coriza asociada con frecuencia a conjuntivitis. Otro de los procesos más frecuentes es la estafilococia, siendo *Staphylococcus aureus* el agente causal. *S. aureus* suele estar presente en las vías respiratorias altas y en la piel, incluso en animales sanos. La salmonelosis, causada por *Salmonella spp.*, produce diarreas en animales jóvenes, septicemias en gazapos de pocos días, y abortos y metritis en conejas reproductoras. La diarrea ocasionada por *Salmonella spp.* suele estar asociada con frecuencia a una co-infección con *Escherichia coli*, que es también el causante de la colibacillosis, y en concreto las cepas enteropatógenas (EPEC), gen eae positivas, son el agente causal de esta infección en conejos.

Estas infecciones bacterianas producen distintos procesos clínicos y tienen perfiles de sensibilidad antibiótica diferentes. En la **Tabla 1** se describen los tratamientos indicados para cada agente en cunicultura y si están descritos genes de resistencia. Actualmente, el desarrollo de resistencias a este tipo de fármacos es uno de los mayores problemas de salud pública, lo que ha impulsado medidas para promover un uso racional de los antibióticos desde las instituciones sanitarias nacionales e internacionales. Muchas de ellas afectan a la práctica de la medicina veterinaria, como el programa REDUCE en cunicultura.

Tabla 1. Antibióticos indicados para cada proceso en cunicultura y existencia de genes de resistencia descritos en la literatura científica.

	<i>Pasteurella multocida</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella spp.</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	Indicado	Genes de resistencia	Indicado	Genes de resistencia	Indicado	Genes de resistencia	Indicado	Genes de resistencia
β-lactámicos	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí
Macrólidos	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Int*
Tetraciclinas	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Aminoglucósidos	No	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí
Sulfonamidas	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Polipéptidos cíclicos	No	Int*	Sí	Sí	No	Int*	No	Int*
Quinolonas	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí
Polimixinas	No	No	No	Int*	No	Sí	Sí	Sí
Pleuromutilinas	No	No	No	Sí	No	-*	No	Sí

*Int.: resistencia intrínseca. -: poca actividad, pero sin genes de resistencia descritos.

Material y métodos

Se han analizado 4386 resultados de antibiogramas realizados en muestras clínicas procedentes de granjas cunícolas de la Península Ibérica recibidas en Exopol durante los años 2019-2021. Las muestras fueron tomadas de animales enfermos que cursaban con procesos: respiratorios, digestivos, septicemias, reproductivos, cutáneos o mamicas. Mediante el aislamiento microbiológico e identificación con la tecnología Maldi-Tof se seleccionaron las bacterias patógenas, y se procedió a la realización de la prueba de sensibilidad antibiótica mediante la técnica de Kirby-Bauer. Con los resultados acumulados de sensibilidad antibiótica para cada bacteria, se calculó el porcentaje de cepas sensibles para cada antibiótico en cada año estudiado, y se evaluó la evolución de la sensibilidad antibiótica de cada antibiótico a lo largo del tiempo mediante la prueba estadística Chi-cuadrado, con el programa estadístico SPSS.

Resultados y discusión

Se realizaron 905 antibiogramas frente a *P. multocida*. En la **Figura 1** se pueden ver los porcentajes de sensibilidad: 12 de los 18 antibióticos testados superan más del 80% de cepas sensibles, por lo que las cepas de *P. multocida* son muy sensibles a la mayoría de antibióticos. Aunque, en eritromicina hay una disminución significativa del porcentaje de cepas sensibles con el tiempo, este antibiótico está indicado para infecciones causadas por este agente, pero en bovino, ovino y porcino. La evolución del resto de antibióticos de los que se han obtenido diferencias significativas, no sigue una tendencia en aumento o disminución con el paso del tiempo, así que estas diferencias pueden deberse a diversas causas.

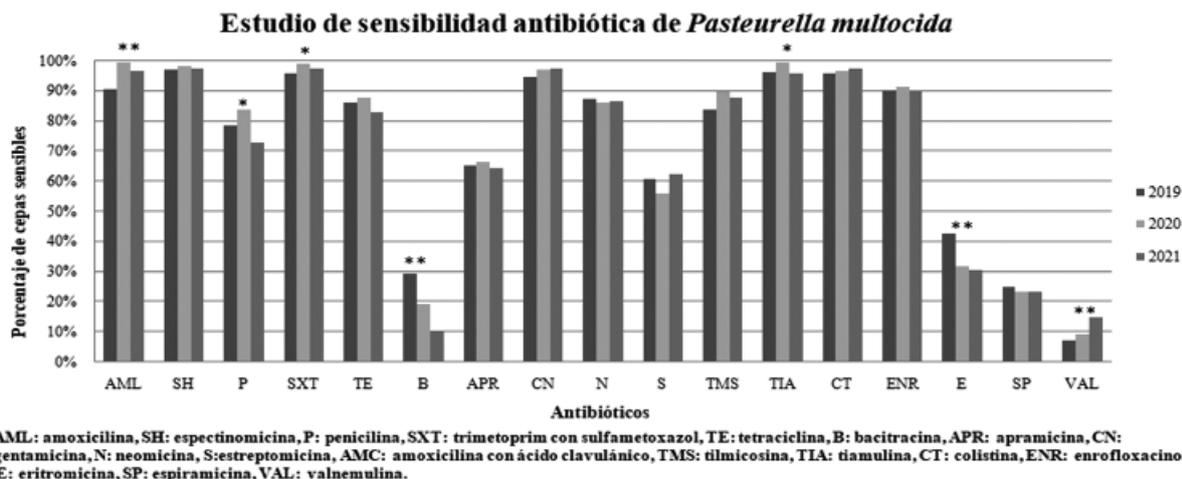


Figura 1. Comparativa del porcentaje de sensibilidad entre 2019 y 2021 de 905 antibiogramas de *Pasteurella multocida*. Significación estadística por Chi-Cuadro con p-valor <0,05 (*) y <0,01 (**).

De los 1066 antibiogramas frente a *S. aureus* evaluados (**Figura 2**), más del 90% de las cepas testadas fueron sensibles a la combinación de sulfametoxazol con trimetoprima. Sin embargo, menos del 30% de las cepas fueron sensibles a tetraciclina, y menos del 15% lo fueron a enrofloxacino. Además, en la tetraciclina se observa una tendencia de la disminución del porcentaje de cepas sensibles respecto al tiempo, lo que indica que están aumentando las resistencias. Oxitetraciclina y enrofloxacino están indicados en procesos infecciosos causados por *S. aureus* en conejos, así que su continuo uso puede estar provocando un aumento de las resistencias para ambos. Espiramicina presenta una disminución significativa de la sensibilidad respecto al tiempo, y el resto de los antibióticos macrólidos testados, bajos porcentajes de cepas sensibles. Esta disminución puede deberse al alto uso de macrólidos en medicina veterinaria.

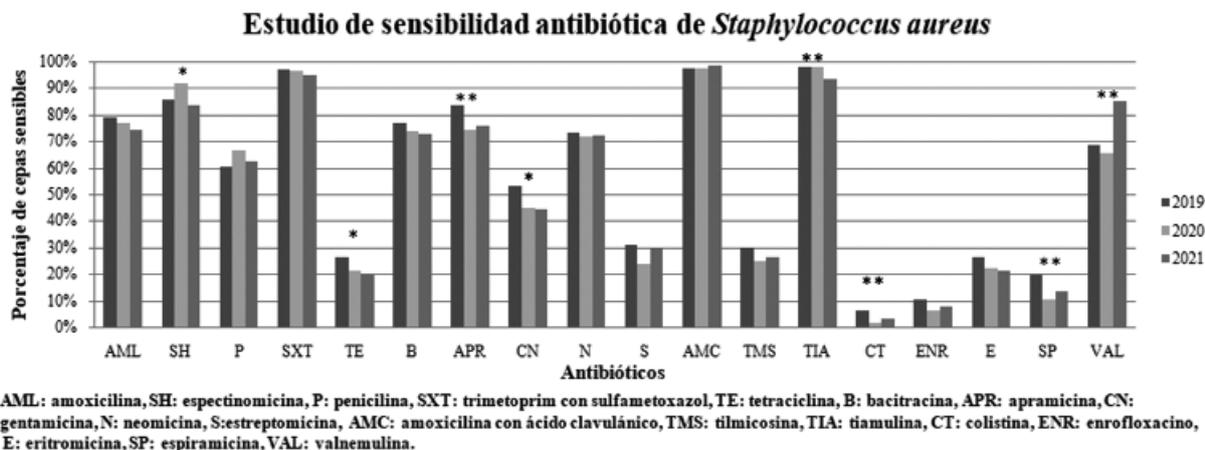


Figura 2. Comparativa del porcentaje de sensibilidad entre 2019 y 2021 de 1066 antibiogramas de *Staphylococcus aureus*. Significación estadística por Chi-Cuadro con p-valor <0,05 (*) y <0,01 (**).

En el caso de la *Salmonella spp.*, se han evaluado 118 antibiogramas en la **Figura 3**, obteniendo un alto porcentaje de cepas sensibles a colistina, gentamicina, y trimetoprima con sulfametoxazol. Neomicina tiene la indicación para salmonelosis en porcino y en bovino, y en conejos podemos observar que solamente la mitad de las cepas testadas de *Salmonella spp.* fueron sensibles a estos antibióticos. También se observa un aumento significativo de cepas sensibles a penicilina y amoxicilina con ácido clavulánico.

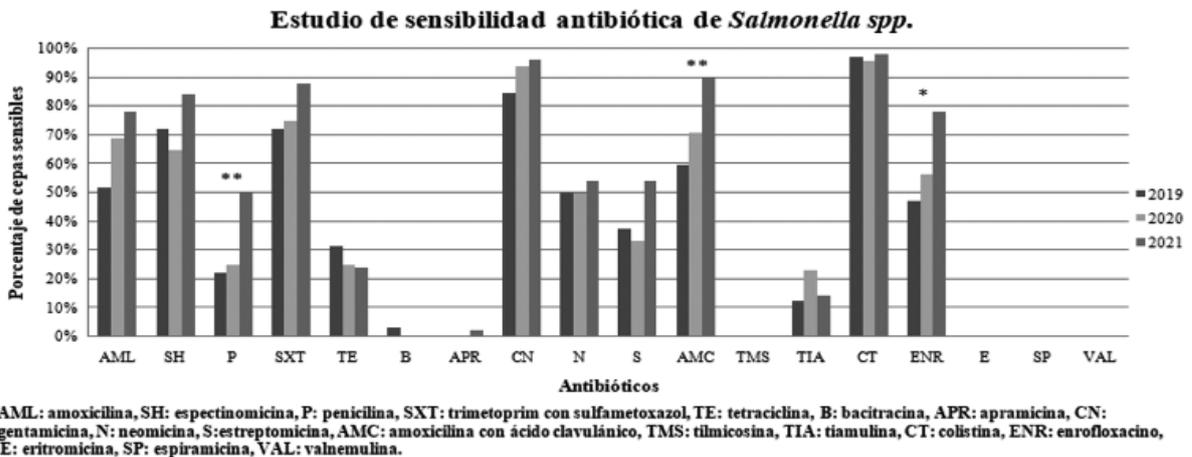


Figura 3. Comparativa del porcentaje de sensibilidad entre 2019 y 2021 de 118 antibiogramas de *Salmonella spp.* Significación estadística por Chi-Cuadro con p-valor <0,05 (*) y <0,01 ().**

Se han analizado los resultados de 2297 antibiogramas realizados frente a cepas de *E. coli*. En la **figura 4** se puede ver que *E. coli* es una de las bacterias con más resistencias a los antibióticos. 13 de 18 antibióticos testados, no superaron el 50% de cepas sensibles a ellos en el 2021. Apramicina (34,84% de cepas sensibles en 2021) y neomicina (8,64% de cepas sensibles en 2021), están registradas para el tratamiento de *E. coli* en conejos, y hay una disminución significativa de la sensibilidad en los últimos 3 años, posiblemente debido a su uso continuado. Como se ilustra en la **Figura 4**, algunos antibióticos, como enrofloxacino y trimetoprim-sulfametoxazol, presentan una tendencia a aumentar el porcentaje de cepas sensibles a ellos, pero al ser un porcentaje tan bajo, todavía no se puede considerar una mejora relevante.

Se observa un aumento significativo del número de cepas sensibles respecto al tiempo de enrofloxacino tanto en *Salmonella spp.* como en *E. coli*, esto puede deberse a que se redujo su uso tras la publicación de la clasificación de los antibióticos de la Agencia Europea del Medicamento, que considera a las fluorquinolonas como categoría B y hay que limitar su uso.

Cabe destacar el ligero aumento de cepas de *E. coli* sensibles a la valnemulina, tendencia que se observa también en *P. multocida* y *S. aureus*. Para la tiamulina en *E. coli*, sí que hay un aumento significativo, pero en *S. aureus* y *P. multocida* aunque la sensibilidad es muy alta, no sigue una tendencia al alza. Habría que estudiar más en profundidad estas variaciones de la sensibilidad del grupo de las pleuromutilinas. Podrían estar relacionadas con la normativa que comenzó en 2021 de solo incluir dos antibióticos en pienso, desde entonces se suele incluir solamente la valnemulina. Es posible que al reducir el uso a un solo antibiótico de la familia se estén reduciendo las resistencias, pero podría deberse a otras causas.

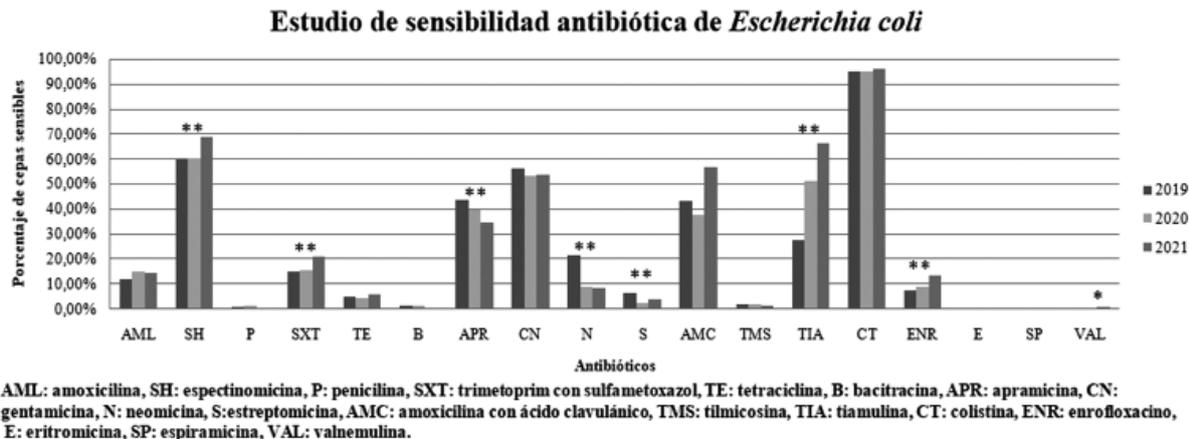


Figura 4. Comparativa del porcentaje de sensibilidad entre 2019 y 2021 de 2297 antibiogramas de *E. coli*. Significación estadística por Chi-Cuadro con p-valor <0,05 (*) y <0,01 ().**

En conclusión, los perfiles de sensibilidad son muy distintos entre las distintas cepas bacterianas estudiadas, y la situación es bastante preocupante para *E. coli* y comienza a serlo para *Salmonella spp.* El uso racional de los antibióticos ayuda a reducir las resistencias antibióticas, y es necesario realizar estudios que recopilen los resultados de muestras clínicas de las granjas cunícolas para poder valorar su evolución. Hay que incidir en el registro de nuevos antibióticos para el tratamiento de conejos, ya que hay fármacos que no están siendo efectivos y las alternativas terapéuticas son de categorías con más restricciones de uso o para otras especies.

Bibliografía

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), CIMAvet Medicamentos veterinarios, AEMPS, Madrid. Enlace: <https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/home.html>
- IBM Corp. Released 2019. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. IBM, Armonk, NY: IBM Corp.
- Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro MA, Pórtoles A. 2013. Velázquez. Manual de farmacología básica y clínica. Panamericana, Madrid. ISBN: 978-84-9835-437-9.
- Mensa J et al. 2013. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioter 26(Suppl. 1): 1-84.
- Michael GB, Bossé JT, Schwarz S. 2018. Antimicrobial resistance in Pasteurellaceae of veterinary origin. En: Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals (Ed. Møller F, Schwarz S, Shen J, Cavaco L. ASM Press. Washington DC, pp. 331-363.
- Rosell JM. 2000. Enfermedades del conejo, Tomo II: Enfermedades, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. ISBN: 8471149087.
- Schwarz S, Cavaco LM, Shen J. 2018. Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals, ASM Press. Washington DC. ISBN: 9784555819798.
- Yoshida Y, Matsuo M, Oogai Y, Kato F, Nakamura N, Sugai M, Komatsuzawa H. 2011. Bacitracin sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 320(1):33-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02291.

Efecto de diferentes técnicas de manejo como alternativa al uso de antibióticos sobre parámetros de estrés en conejos de cebo

Effect of different management techniques as an alternative to the use of antibiotics on stress parameters in fattening rabbits

Ramón-Moragues A^{1*}, Carulla P², Gonçalves C¹, Escribano D³, Torres R², Romero T², Martínez-Paredes E², Villagrà A¹

¹Centro de Investigación CITA-IVIA, 12400 Segorbe, Castellón, España.

²Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia, España.

³Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España.

*ramon_adr@externos.gva.es

Resumen

La búsqueda de alternativas en el uso de antibióticos en el engorde de conejos de carne es una necesidad, ya que el abuso de los antibióticos ha provocado la aparición de resistencias a los antimicrobianos. Estas alternativas pueden estar relacionadas con diferentes áreas de la producción, una de ellas son las técnicas de manejo. En este trabajo se han evaluado 2 técnicas de manejo diferentes. Por un lado, la alimentación con alimentación medicada (M) y sin medicar (SM). Por otra parte, según el tamaño del grupo (8 animales (I) y 32 animales (C)), que a su vez las jaulas de 8 animales se dividieron por parentesco (hermanos (H) y no hermanos (NoH) en la misma jaula). Se han utilizado 1620 conejos de la línea genética de alta longevidad y reproducción (línea LP) de la Universidad Politécnica de Valencia distribuidos en 6 tratamientos: HM, HSM, NoHM, NoHSM, CM y CSM. Para la evaluación de estas técnicas se han medido parámetros sanguíneos relacionados con el bienestar animal. Estos parámetros son: Inmunoglobulinas G (IgG) y M (IgM), Albúmina, Proteína C reactiva (CRP), Glucosa y Lactato deshidrogenasa (LDH). Tan solo se encontraron diferencias significativas para el tamaño de grupo en referencia a la albúmina y la CRP. Pero todos los parámetros estarían dentro de los estándares de la especie. Por lo que se podría concluir con los resultados obtenidos que el tamaño de grupo y el parentesco, así como la ausencia de antibiótico en el pienso no tienen efecto sobre los parámetros de bienestar medidos para una línea genética resiliente como la LP.

Palabras clave: conejo de engorde/cebo, alternativas a antibióticos, bienestar animal.

Abstract

The search for alternatives in the use of antibiotics in the fattening of meat rabbits is a necessity, as the abuse of antibiotics has led to the emergence of antimicrobial resistance. These alternatives can be related to different alternatives, one of them being management techniques. In this work, 2 different management techniques have been evaluated with medicated (M) and unmedicated (SM) feeding, these techniques are: group size (8 animals (I) and 32 animals (C)), and in turn the cages of 8 animals were divided by parentage (siblings (H) and non-siblings (NoH) in the same cage). A total of 1620 rabbits of the high longevity and reproduction genetic line (LP line) of the Polytechnic University of Valencia were used, distributed in 6 treatments: HM, HSM, NoHM, NoHSM, CM and CSM. For the evaluation of these techniques, blood parameters related to animal welfare have been measured. These parameters are Immunoglobulins G (IgG) and M (IgM), Albumin, C-reactive protein (CRP), Glucose and Lactate dehydrogenase (LDH). Significant differences were only found for group size in reference to albumin and CRP. But all parameters were within the species standards. Therefore, it could be concluded with the results ob-

tained that group size and parentage, as well as the absence of antibiotic in the feed has no effect on the welfare parameters measured for a resilient genetic line such as LP.

Keywords: growing rabbit, antibiotics alternative, welfare.

Introducción

El uso de antibióticos en la producción cunícola está bastante extendido debido a la existencia de la enteropatía epizootica mucoide que provoca fuertes diarreas durante la fase de engorde y una elevada mortalidad (Licois *et al.*, 2005). Sin embargo, en los últimos años estos fármacos deben ser reducidos debido a su importancia en la aparición de resistencias por parte de los microorganismos. Por ello, es necesario encontrar alternativas a los antibióticos que ayuden a mantener una alta producción, sin disminuir el bienestar animal y la salud que estos aportan durante la fase de engorde.

Estas alternativas pasan por la nutrición, la mejora genética, la ganadería de precisión o la modificación de las técnicas de manejo de los animales. Esta última alternativa resulta interesante, debido a que la mejora de las técnicas de manejo sobre los animales puede mejorar la resistencia de estos frente a los problemas que puedan surgir durante el ciclo productivo, manteniendo el bienestar animal (Dawkins, 2017). Estas técnicas están centradas en disminuir el estrés que puedan estar sufriendo debido a su entorno, como elevadas densidades de producción o elevados tamaños de grupo (Volek *et al.*, 2014). Algunas de estas técnicas de manejo pueden ser: la provisión de espacio y un entorno adecuado (Szendrő *et al.*, 2009), la reducción del tamaño de grupo (Dalle Zotte *et al.*, 2009; Paci *et al.*, 2013; Volek *et al.*, 2014), u otras menos estudiadas en cunicultura, como el mantenimiento o no de las camadas de hermanos durante la fase de cebo.

Para la evaluación del efecto del manejo sobre el bienestar animal, se han utilizado mediciones sobre la producción, el comportamiento y parámetros fisiológicos (de la Fuente *et al.*, 2004), entre los que se encuentran el cortisol, la lactato deshidrogenasa (LDH), la concentración de glucosa o incluso, la concentración de inmunoglobulinas y de varias proteínas de fase aguda (APP) (Dinarello, 1983; 1989; Gruys *et al.*, 1998).

Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de dos técnicas de manejo como el tamaño de grupo y mantener el parentesco durante el cebo como alternativas al uso de antibióticos, sobre el bienestar animal de los conejos de engorde mediante indicadores sanguíneos como las Inmunoglobulinas, las APP, la glucosa y el lactato deshidrogenasa.

Material y métodos

Un total de 1620 conejos de engorde de la línea LP de la Universitat Politècnica de València caracterizada por su alta resiliencia y gran capacidad para permanecer en el rebaño (Ferran *et al.*, 2013; Savietto *et al.*, 2015), fueron distribuidos en 6 tratamientos distintos, cuatro de ellos en jaulas para 9 animales (I) cuyas medidas eran de 50 x 75 x 30 cm y dos tratamientos para jaulas de 36 animales (C) cuyas medidas eran 200 x 75 x 50 cm. Las jaulas I, se subdividieron en jaulas de hermanos (H) y no hermanos (NoH), y éstas a su vez en pienso medicado (M) y sin medicar (SM). En el caso de las jaulas C, sólo se dividieron por el pienso utilizado (M y SM). Así, se obtuvieron al final 25 jaulas I de cada tratamiento y 9 jaulas C de cada tratamiento. El pienso utilizado para todos los tipos de jaula tenía la misma composición nutricional (14,5 % PB y 19,8 % FB). El cebo duró 33 días desde el destete, llegando hasta los 64 días de vida. Al inicio y al final del cebo, se obtuvo por exanguinación una muestra de sangre de un animal al azar de cada jaula para las jaulas de 9 animales, y 4 individuos de las jaulas de 36 animales y se analizaron las IgG, IgM, glucosa, lactato deshidrogenasa, albúmina y proteína C reactiva (CRP), mediante kits ELISA comerciales.

Una vez obtenidos los datos se analizó su distribución mediante histograma de todas las variables dependientes, observando que la variable dependiente CRP no mostraba una distribución normal, por lo que se normalizó mediante transformación a logaritmo neperiano. La variable dependiente de CRP se transformó a una distribución normal mediante logaritmo neperiano. Después se realizó un análisis de la varianza mediante ANOVA multifactorial con el programa estadístico Statgraphics Centurion®. Se analizaron por un lado los efectos fijos del parentesco y el pienso, y por otro lado el tamaño de grupo y el pienso.

Resultados y discusión

Los pesos de sacrificio de los animales fueron acordes a los de la especie y línea genética. En el análisis de los datos no se obtuvo ninguna diferencia significativa para las inmunoglobulinas, las APP, la glucosa y LDH al inicio

del ciclo de engorde. Después de la fase de cebo, donde los animales han crecido bajo las condiciones de los distintos tratamientos, tan solo se ha observado diferencias significativas en las APP entre animales de las jaulas I y C debidas al tamaño de grupo (Tabla 1). El resto de los parámetros no se vieron alterados de manera significativa por ninguno de los factores y sus interacciones (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de Inmunoglobulinas, APP, Glucosa y LDH a los 64 días de vida (mean ± e.s.).

Factor	Nivel	n	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	Alb. (g/dl)	CRP (µg/ml)	Glu. (mg/dl)	LDH (UI/l)
P	M	61	521,2±15,4	123,2±3,2	3,07±0,04	4,7±1,1	146,2±2,2	284,8±17,3
	SM	61	542,3±15,4	121,8±3,2	3,08±0,04	4,2±1,1	148,8±2,2	303,2±17,3
	P-valor		0,3259	0,7488	0,9281	0,4064	0,4210	0,4468
G	I	50	527,8±16,2	122,8±3,5	3,14±0,04	5,2±1,1	150,2±2,4	304,7±18,3
	C	72	535,8±13,9	122,1±3,0	3,02±0,04	3,9±1,1	144,8±2,0	283,3±15,7
	P-Valor		0,7083	0,8891	***	***	0,0844	0,3766
P*G	IM	25	521,2±22,8	125,3±4,8	3,13±0,06	5,5±1,2	147,4±3,3	272,4±26,2
	ISM	25	534,4±22,8	120,3±4,8	3,15±0,06	4,8±1,2	153,1±3,3	336,9±26,2
	CM	36	521,3±19,5	121,1±4,3	3,02±0,05	4,0±1,1	145,1±2,8	297,1±22,7
	CSM	36	550,3±19,5	123,2±4,3	3,01±0,05	3,7±1,1	144,5±2,8	269,4±22,7
	P-valor		0,7128	0,4374	0,6859	0,8655	0,3124	0,0583
P	M	50	508,1±17,2	124,2±3,2	3,05±0,05	5,0±1,1	147,2±2,4	268,7±17,9
	SM	50	500,1±17,2	117,4±3,2	3,14±0,05	4,4±1,1	152,8±2,4	314,9±17,9
	P-Valor		0,7436	0,1321	0,2127	0,4010	0,1009	0,0716
Pa	H	50	480,4±17,2	118,9±3,2	3,05±0,05	4,3±1,1	149,7±2,4	279,0±17,9
	NoH	50	527,8±17,2	122,8±3,2	3,14±0,05	5,2±1,1	150,2±2,4	304,7±17,9
	P-Valor		0,0539	0,3870	0,1950	0,2140	0,8825	0,3136
P*Pa	HM	25	495,0±24,2	123,2±4,5	2,98±0,07	4,5±1,2	147,0±3,4	265,0±25,3
	HSM	25	465,9±24,2	114,5±4,5	3,12±0,07	4,0±1,2	152,5±3,4	292,9±25,3
	NoHM	25	521,2±24,2	125,3±4,5	3,13±0,07	5,5±1,2	147,4±3,4	292,4±25,3
	NoHSM	25	534,4±24,2	120,3±4,5	3,15±0,07	4,8±1,2	153,1±3,4	336,9±25,3
	P-Valor		0,3853	0,6772	0,4020	0,9232	0,7459	0,4724

IgG: Inmunoglobulina G; IgM: Inmunoglobulina M; Alb: Albumina; PCR: Proteína C reactiva; Glu: Glucosa; LDH: Lactato deshidrogenasa. P: factor Pienso; G: Tamaño de grupo; Pa: Parentesco; *: Interacción entre factores; M: pienso medicado; MS: pienso sin medicar; I: jaulas de 8 animales; C: jaulas de 32 animales; H: jaulas de hermanos; NoH: jaulas de no hermanos.

***: $p < 0,05$.

En el presente estudio no se han observado diferencias significativas en la mayoría de los parámetros de estrés estudiados en función de los factores fijos, exceptuando las APP debido al factor del tamaño de grupo. Se sabe que el tamaño de grupo tiene un efecto sobre la producción y el bienestar de los conejos (Volek *et al.*, 2014). Elevados tamaños de grupo provocan disminuciones de producción, y una elevada presencia de comportamientos agonísticos que se acaban traduciendo en un estrés ambiental para el individuo (Princz *et al.*, 2007; 2008). En este estudio no se han dado diferencias de peso entre tratamientos, pero sí se ha observado una variación significativa en las APP analizadas.

Las APP son un grupo de proteínas sanguíneas que cambian de concentración en animales sometidos a desafíos externos o internos, como infección, inflamación, trauma quirúrgico, lesión o estrés (Murata *et al.*, 2004). Estas variaciones ocurren elevando o disminuyendo hasta 100 veces su concentración en sangre (Khalil y Al-Humadi, 2020). Autores como Volek *et al.* (2014), Szendrő *et al.* (2009) y Princz *et al.* (2007) obtuvieron resultados que demuestran que el tamaño de grupo afecta al bienestar animal, por lo que el tamaño de grupo se podría catalogar como un factor de estrés ambiental. Pero en este caso las diferencias significativas en la concentración de Albúmina y CRP obtenidas están dentro de los parámetros estándar de la especie según autores como El-Ta-rabay *et al.* (2021) y Cray *et al.* (2013).

En referencia a la glucosa y LDH no se han obtenido diferencias significativas ni valores asociados a un metabolismo anaeróbico elevado y alterado de manera importante (Ibáñez *et al.*, 2002), siendo los valores obtenidos normales dentro de la especie.

Por último, las inmunoglobulinas son anticuerpos pertenecientes a la respuesta inmune (Gruys *et al.*, 2005). Pese al uso de antibiótico en el pienso, no se ha obtenido diferencias significativas tal y como cabría esperar. Ya que autores como Gaskins *et al.* (2002) y Dawkins (2017) mencionan que el uso de estas sustancias inhibe el crecimiento de patógenos, así como la disminución de la concentración de metabolitos microbianos tóxicos, por lo que se podría esperar que los animales alimentados con pienso medicado tuvieran una menor concentración de inmunoglobulinas

La ausencia de diferencias significativas en el presente estudio puede deberse al uso de la línea genética LP de la Universidad politécnica de Valencia, ya que se caracteriza por una elevada resiliencia, una alta productividad en estas condiciones de producción y capacidad para permanecer en el rebaño (Ferrian *et al.*, 2013; Saviotto *et al.*, 2015).

En conclusión, según los resultados obtenidos, los parámetros sanguíneos de bienestar de los animales no se verían alterados durante la fase de engorde en ausencia de antibióticos, y con tamaños de grupo elevados con el uso de la línea genética LP de la Universidad Politécnica de Valencia. Aun así, sería necesario aumentar el número de animales a muestrear para obtener una conclusión más clara, y disminuir los elevados errores encontrados debidos a la alta variabilidad entre individuos.

Agradecimientos

Agradecer al Fondo Social Europeo por la beca de formación al Sr. Ramón-Moragues A.

Bibliografía

- Cray C, Rodriguez M, Fernandez Y. 2013. Acute phase protein levels in rabbits with suspected *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Exot Pet Med* 22(3):280-286.
- Dalle Zotte Z, Princz SZ, Metzger A, Szabó I, Radnai E, Biró-Németh Z, Orova ZS, Szendrő ZS. 2009. Response of fattening rabbits reared under different housing conditions. 2. Carcass and meat quality. *Livest Sci* 122(1):39-47.
- Dawkins M.S. 2017. Animal welfare and efficient farming: is conflict inevitable. *Anim Prod Sci* 57:201-208.
- Dinarelo CA. 1983. Pathogenesis of fever during hemodialysis. *Contr Nephrol* 36:90-99.
- Dinarelo CA. 1989. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* 44:153-205.
- El-Tarabany MS, El-Tarabany AA, Ahmed-Farid OA. 2021. Effect of cage density on growth rate, carcass traits, muscle amino acid profile, and antioxidant biomarkers of commercial rabbits. *Trop Anim Health Prod* 53, 393.
- Ferrian S, Blas E, Larsen T, Sánchez JP, Friggens NC, Corpa JM, Baselga M, Pascual JJ. 2013. Comparison of immune response to lipopolysaccharide of rabbit does selected for litter size at weaning or founded for reproductive longevity. *Res Vet Sci* 94(3):518-525.
- de la Fuente J, Salazar MI, Ibáñez M, González de Chavarri E. 2004. Effects of season and stocking density during transport on live weight and biochemical measurements of stress, dehydration and injury of rabbits at time of slaughter. *Anim Sci* 78:285-292.
- Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB. 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim Biotechnol* 13:29-42.
- Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 6(11):1045-1056.
- Gruys E, Toussaint MJM, Landman WJM, *et al.* 1998. Infection, inflammation and stress inhibit growth. Mechanisms and non-specific assessment of the processes by acute phase proteins. In: Wensing T, editor. *Production Diseases in Farm Animals. 10th International Conference, 1998. Wageningen: Wageningen Press, pp. 72-87.*
- Ibáñez M, de la Fuente J, Thos J, González de Chavarri E. 2002. Behavioural and physiological responses of suckling lambs to transport and lairage. *Anim Welfare* 11:223-230.

- Khalil RH, Al-Humadi N. 2020. Types of acute phase reactants and their importance in vaccination (Review). *Biomed Rep* 12:143-152.
- Licois D, Wyers M, Coudert P. 2005. Epizootic rabbit enteropathy: Experimental transmission and clinical characteristics. *Vet Res* 36:601-613.
- Murata H, Shimada N, Yoshioka M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* 168:28-40.
- Paci G, Preziuso G, D'agata M, Russo C, Dalle Zotte A. 2013. Effect of stocking density and group size on growth performance, carcass traits and meat quality of outdoor-reared rabbits. *Meat Sci* 93:162-166.
- Princz Z, Dalle Zotte A, Radnai I, birò-németh E, Matics ZS, Gerencsér ZS, Nagy I, Szendrő ZS. 2008. Behaviour of growing rabbits under various housing conditions. *Appl Anim Behav Sci* 111:342-356.
- Princz Z, Orova Z, Nagy I, Jordan D, Stuhec I, Luzi F, Verga M, Szendrő ZS. 2007. Application of gnawing stick in rabbit housing. *World Rabbit Sci* 15:29-36.
- Savietto D, Friggens NC, Pascual JJ. 2015. Reproductive robustness differs between generalist and specialist maternal rabbit lines: the role of acquisition and allocation of resources. *Genet Sel Evol* 47:1-11.
- Szendrő ZS, Princz Z, Romvári R, Locsmáncsi L, Szabó A, Bázár GY, Radnai I, Biró-németh E, Matics ZS, Nagy I. 2009. Effect of group size and stocking density on productive, carcass, meat quality and aggression traits of growing rabbits. *World Rabbit Sci* 17(3):153-162.
- Volek Z, Chodova D, Tumova E, Volkova L, Kudrnová E, Marounek M. 2014. The effect of housing conditions on biceps femoris muscle fibre properties, fatty acid composition, performance and carcass traits of slow-growing rabbits. *World Rabbit Sci* 22:41-49.

Efecto del enriquecimiento con bloques de heno y de la diferenciación de grupo por sexo sobre parámetros productivos, uso del espacio y resultados al sacrificio en conejos de engorde alojados en parques

Effect of the use of gnawing hay blocks and sex-group composition on growth performance, use of space and slaughter results of growing rabbits housed in parks

Biolo M^{1*}, Xiccato G¹, Zuffellato A², Pirrone F³, Bordignon F¹, Trocino A³

¹Dept. Agronomy, Food, Natural Resources, Animals and Environment (DAFNAE), Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Padova, Italy.

²A.I.A. Agricola Italiana Alimentare S.p.A., Piazzale Veronesi, 37036 San Martino Buon Albergo, Verona, Italy.

³Dept. Comparative Biomedicine and Food Science (BCA), Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Padova, Italy.

*marco.biolo@unipd.it

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inclusión de bloques de heno para roer (A: ausencia, P: presencia) y de la diferenciación de grupo según el sexo en parques (XX: sólo hembras, YY: sólo machos, XY: sexo mixto) sobre parámetros productivos, resultados al sacrificio y uso del espacio de 288 conejos de engorde criados en 18 parques (16 conejos por parque) desde el destete hasta al sacrificio (31-73 días de edad). Los parques estaban formados por dos módulos conectados: el área de alimentación (suelo de malla alambre; 4 bebederos; un comedero; un bloque de heno para grupos P) y el área de descanso (suelo de varilla plástica, dos bebederos). La presencia de bloques de heno incrementó la ganancia de peso diaria (51.8 vs. 50.6 g/d; $p < 0.05$) y el peso al sacrificio (2818 vs. 2763 g; $p < 0.05$). El grupo P presentó un porcentaje menor de conejos en el área de descanso frente al grupo A (49.5% vs. 53.0%; $p < 0.001$). Respecto al efecto de la diferenciación de grupo según el sexo, el índice de conversión de los grupos XX y XY fue mejor respecto al grupo YY ($p < 0.05$), mientras que el grupo YY presentó un mayor rendimiento al sacrificio comparado con el grupo XX ($p < 0.01$) con valores intermedios para el grupo XY. No se observaron lesiones en ningún animal al final del ensayo. En conclusión, la inclusión de bloques de heno podría mejorar los parámetros de rendimiento en conejos de engorde, mientras que separar los animales en grupos diferenciados según el sexo no define una ventaja clara.

Palabras clave: materiales para roer, alojamiento en grupo, bienestar, rendimiento de la canal.

Abstract

This study assessed the effect of the provision of gnawing hay blocks (A: absence, P: presence) and sex-group composition in the parks (XX: only females, YY: only males, XY: mixed-sex) on growth performance, slaughter results, and use of space in 288 growing rabbits reared in 18 parks (16 rabbits per park) from weaning to slaughter (31-73 days of age). The parks were composed by two communicating modules: a module intended for feeding (wire net floor; four nipple drinkers; one feeder; one gnawing hay blocks in P groups) and a module for resting (plastic slatted floor, two nipple drinkers). The presence of gnawing blocks increased daily weight gain (51.8 vs. 50.6 g/d; $p < 0.05$) and slaughter weight (2818 vs. 2763 g; $p < 0.05$). In the P group, a lower percentage of rabbits

was observed in the resting area compared to the A group (49.5% vs. 53.0%; $p < 0.001$). Regarding the sex-group composition, a better feed conversion ratio was recorded in XX and XY compared to YY parks ($p < 0.05$), whereas YY group showed a higher slaughter yield compared to XX ($p < 0.01$) with intermediate values in group XY. No signs of lesions were detected at the end of the trial. In conclusion, the use of a hay gnawing block could improve performance of growing rabbits, whereas the separate housing of females and males in group-housed rabbits does not offer significant advantages.

Keywords: gnawing materials, group housing, welfare, slaughter yield.

Introducción

En la Unión Europea (UE), los sistemas de producción cunícola se concentran principalmente en tres países: España, Francia e Italia, los cuales representan un 85% del total de la producción de la UE (Trocinio *et al.*, 2019). En estos países los conejos de engorde se crían en jaula bicelular, jaula polivalente (4-6 conejos por jaula) y jaula enriquecida (de mayor anchura y con plataforma) (EFSA, 2020). Sin embargo, la iniciativa de los ciudadanos europeos "End the Cage Age" propone la prohibición de las jaulas para los diferentes sistemas de producción en granjas de la UE, incluidas explotaciones cunícolas, para las cuales el Parlamento Europeo busca eliminar su uso de forma gradual a través de una regulación para 2027.

En sistemas de alojamientos alternativos como parques, la cría de conejos se puede hacer en grupos de diferentes tamaños (más de 8, frecuentemente entre 30-32). En los parques, su bienestar resulta como "likely/highly likely higher" a diferencia de aquellos animales criados en jaulas bicelulares o polivalentes (EFSA, 2020). Por otro lado, según el informe de EFSA (2020), el cebo de conejos en parques puede generar problemas relacionados con la salud, como trastornos cutáneos y gastrointestinales, además de otros relacionados con el comportamiento, como problemas de descanso, incapacidad para expresar comportamientos de roer y miedo, que deben ser afrontados para la correcta implantación de estos sistemas. Los problemas de descanso pueden estar asociados a inadecuadas condiciones en la densidad de alojamiento, características del pavimento, e higiene, mientras la incapacidad de roer puede dar lugar a comportamientos agresivos y anormales (Verga *et al.*, 2004; Princz *et al.*, 2007; Buijs *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no existen estudios consistentes sobre los efectos en rendimientos productivos y comportamiento al introducir elementos en el medio que proporcionen la posibilidad de roer a los conejos. Además, limitar la agresividad en sistemas de alojamiento colectivos es un punto clave para reducir el miedo y el dolor en los animales (EFSA, 2020). En este sentido, surge la idea de hacer grupos de animales diferenciados por sexos, pero actualmente los estudios realizados son escasos y contradictorios (Bozicovich *et al.*, 2016; Birolo *et al.*, 2020).

En este contexto, este artículo evalúa el efecto de la presencia de materiales para roer (mediante la inclusión de bloques de heno) y la diferenciación de los grupos según los diferentes sexos (sólo hembras, sólo machos, sexo mixto) en el rendimiento productivo, resultados al sacrificio y uso del espacio de conejos de engorde en parques.

Material y métodos

Este estudio se realizó en la granja experimental de la Universidad de Padova, en un edificio cerrado, sometidos a un fotoperiodo natural (11-12 horas de luz) y temperatura estable (20-24°C). A 31 días de edad, 288 gazapos de líneas cruzadas (144 hembras y 144 machos; Hypharm, Groupe Grimaud, Roussay, France) fueron seleccionados sobre camadas sanas de conejas multíparas (partos ≥ 3) de una granja comercial, transportados a la granja experimental e individualmente identificados y distribuidos en 18 parques (1.28 m \times 0.78 m; 1 m²) con 16 animales por parque. Los parques estaban compuestos por dos módulos de igual dimensión (0.64 m \times 0.78 m; 0.5 m²) parcialmente separados por una malla de alambre (0.36 m \times 1.10 m). En el primer módulo se definió el área de alimentación y en el segundo módulo se definió el área de descanso. El suelo de la zona de alimentación era de malla de alambre (75 mm \times 15 mm, ϕ : 2.5 mm), y estaba equipada con cuatro bebederos de chupete y un comedero. La zona de descanso presentaba suelo de plástico con agujeros regulares (70 mm \times 10 mm; distancia entre agujeros: 7 mm) y estaba equipada con dos bebederos de chupete. Se utilizaron 6 tratamientos estructurados de forma bi-factorial: 3 niveles de grupos por sexo (XX: 16 hembras/parque; YY: 16 machos/parque; XY: 8 hembras y 8 machos/parque) \times 2 condiciones de enriquecimiento del medio (A: ausencia de bloques de heno, P: presencia de bloques de heno). Los bloques de heno tenían forma cilíndrica (altura: 0.40 m; ϕ : 0.08 m) y la siguiente composición: materia seca (MS) 89.0%, proteína bruta (PB) 11.2%, extracto etéreo (EE) 1.4%, fibra neutra detergente (FND) 53.1%, fibra ácido detergente (FAD) 34.7%, lignina ácido detergente (LAD) 9.1%. Los bloques eran puestos en un tubo metálico en la pared trasera en la zona de

alimentación y se suministraron sin restricciones y de forma constante durante toda la prueba. Todos los conejos fueron alojados teniendo acceso *ad libitum* al pienso y al agua. Se suministró una dieta post-destete (MS: 88.8%, PB: 15.4%, EE: 4.1%, FND: 37.1%, FAD: 19.6%, LAD: 5.1%) de 31 a 55 días de edad seguida de una dieta de cebo (MS: 88.5%, PB: 15.5%, EE: 4.4%, FND: 35.0%, FAD: 18.0%, LAD: 4.1%) de 56 días de edad al sacrificio (73 días). Ninguna de las dietas contenía antibióticos o coccidiostáticos. Durante la prueba se registró una vez a la semana el peso vivo de los animales y el consumo de los bloques de heno. El consumo de pienso en los parques, mortalidad y morbilidad fueron diariamente registrados. A 33, 40, 47, 54, 61, y 68 días de edad, todos los parques fueron grabados en video contando el número de animales en el área de alimentación y en el área de descanso (una vez cada hora durante 24 h). El día antes del sacrificio, se examinó la presencia de lesiones como arañazos, heridas abiertas o costras en cualquier parte del cuerpo debido a agresiones. A 73 días de edad, todos los animales fueron pesados, transportados a un matadero comercial y sacrificados. Después de 2,5 h de enfriamiento, las canales fueron pesadas individualmente a fin de calcular el rendimiento al sacrificio (Blasco and Ouhayoun, 1996).

Los datos individuales de peso vivo, ganancia media diaria y características de la canal fueron analizados por ANOVA utilizando PROC MIXED de SAS (SAS Institute, 2013) considerando como efectos principales la presencia/ausencia de bloques de heno, la diferenciación de grupo por sexo y su interacción, y el parque como efecto aleatorio. El consumo en el parque y el índice de conversión fueron analizados utilizando PROC GLM con los mismos efectos principales. El porcentaje de conejos detectados en la zona de alimentación o de descanso fueron analizados por PROC GLIMMIX considerando como efectos principales la presencia/ausencia de bloques de heno, la diferenciación de grupo por sexo, la edad de los conejos y su interacción; la hora de observación se incluyó como efecto aleatorio y los datos tomados en el mismo parque fueron considerados como medida repetida.

Resultados y discusión

Durante el ensayo, 5 conejos murieron con diarrea y otros 7 fueron descartados al final de la prueba por escaso peso corporal (< 2.3 kg). La tasa de mortalidad fue 1.7% y el total de pérdidas (muertos + descartados) fue 4.2% sin encontrar diferencias significativas entre grupos experimentales (datos no recogidos en tablas). La presencia de bloques de heno incrementó la ganancia media diaria (+1.2 g/día; $p < 0.05$) lo cual se asoció a un mayor peso vivo final (+55 g; $p < 0.05$; **Tabla 1**). En general, la presencia de materiales para roer no afecta a los rendimientos productivos de los conejos (Princz *et al.*, 2007; Bozicovich *et al.*, 2016). Acorde con las condiciones de este estudio, la mejora en el crecimiento de los conejos de los grupos P podría estar relacionada con un incremento en el tiempo de permanencia en la zona de alimentación junto con un aumento (aunque no significativo) del consumo respecto al grupo A. Igualmente, el porcentaje de animales detectados en el área de descanso fue menor en el grupo P respecto al grupo A (49.5% vs. 53.0%; $p < 0.05$; **Fig. 1-A**). Sin embargo, la distribución de los animales según la presencia o ausencia de bloques de heno se fue homogeneizando con la edad de los animales (**Fig. 1-B**), probablemente debido al aumento del tamaño de los animales que redujo el espacio disponible en ambos módulos. Por otro lado, el consumo de los bloques de heno fue limitado (1.3 g/día/conejo) durante toda la prueba (datos no recogidos en tablas), lo cual no es suficiente para justificar el aumento de peso individual en el grupo P. Bozicovich *et al.* (2016) evidenciaron un incremento de la agresividad, aunque con un menor número de heridas en conejos criados en jaulas enriquecidas con palos de madera respecto a las que no lo tenían. En contraste con el estudio mencionado, en nuestro ensayo no se observó este efecto y tampoco se observaron heridas en los animales ni comportamientos agresivos (datos no recogidos en tablas) al final del ensayo.

Tabla 1. Efecto de la presencia de bloques de heno y de la diferenciación de grupo por sexo en parques colectivos sobre los parámetros productivos (31-72 días de edad) y de sacrificio (73 días) en conejos de engorde.

	Bloques de heno (H)		Sexo (S)			MSE	P>f		
	Ausencia (A)	Presencia (P)	XX	YY	XY		H	S	H×S
Conejos (n)	140	136	91	93	92				
Peso inicial a los 31 días (g)	765	767	768	766	764	82	n.s.	n.s.	n.s.
Peso final a los 72 días (g)	2845	2896	2880	2850	2881	220	n.s.	n.s.	n.s.
Ganancia media diaria (g/d)	50.6	51.8	51.4	50.7	51.5	4.6	*	n.s.	n.s.
Consumo de pienso ¹ (g/d)	141	145	143	143	144	5	n.s.	n.s.	n.s.
Índice de conversión ¹	2.87	2.87	2.86 ^a	2.89 ^b	2.86 ^a	0.02	n.s.	*	n.s.
Peso al sacrificio (g)	2763	2818	2808	2769	2792	212	*	n.s.	n.s.
Canal fría (g)	1696	1730	1712	1713	1714	147	n.s.	n.s.	n.s.
Rendimiento canal (%)	61.2	61.3	60.8 ^a	61.7 ^b	61.3 ^{ab}	1.73	n.s.	**	n.s.

¹Datos de parques. MSE: cuadrado medio del error. *: p<0,05; **: p<0,01. a,b: diferentes superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05). XX: sólo hembras; YY: sólo machos; XY: sexo mixto.

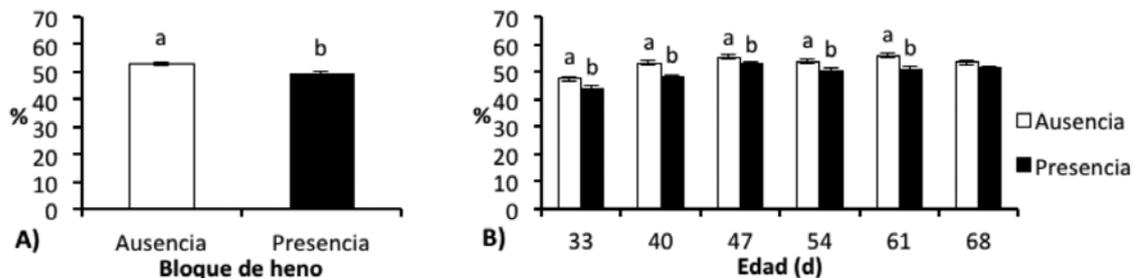


Figura 1. Porcentaje de conejos encontrados en el área de descanso según la presencia/ausencia de bloques de heno (A) y la interacción entre presencia/ausencia de bloques y edad (B).

Respecto a la diferenciación de grupos según el sexo, aquellos grupos donde sólo había hembras y los grupos mixtos presentaron un menor índice de conversión respecto a los grupos compuestos por machos (p<0.05). Por otro lado, los grupos de machos presentaron un mayor rendimiento de la canal al sacrificio a diferencia de los grupos de hembras (+0.9 %; p<0.01), con valores intermedios para los grupos mixtos. Estos resultados eran predichos al inicio del ensayo ya que tienen mayor relación con el sexo de los conejos por sí mismo. Las hembras se caracterizan por un menor rendimiento de la canal respecto a los machos debido a un mayor contenido intestinal (Parigi-Bini *et al.*, 1992; Trocino *et al.*, 2015). Otros estudios han documentado lesiones más severas en machos respecto a hembras, sobre todo cuando éstos se crían en grupos grandes (Verga *et al.*, 2007; Trocino *et al.*, 2015; Bozicovich *et al.*, 2016), mientras que no se han observado signos de lesiones en este ensayo.

Respecto al uso del espacio, los grupos YY presentaron un mayor porcentaje de animales que preferían estar en el área de descanso respecto a los grupos XX y XY, respectivamente (54.0 % vs. 51.0 % vs. 49.0 %; p<0.05) (Fig. 2-A). Estas diferencias entre grupos se redujeron con la edad de los animales (Fig. 2-B).

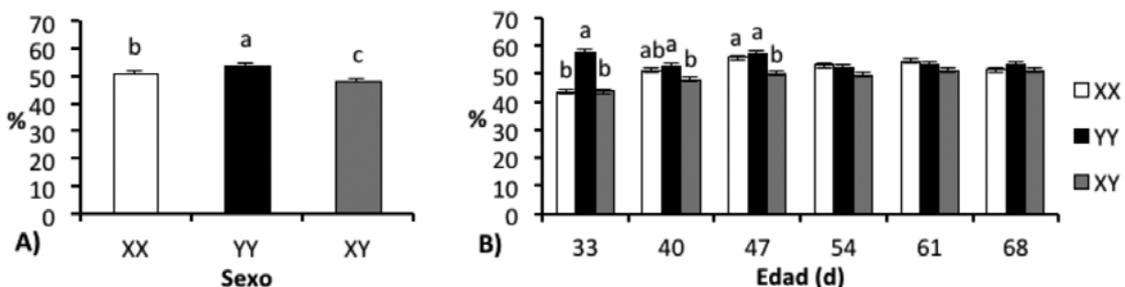


Figura 2. Porcentaje de conejos encontrados en el área de descanso según la diferenciación de grupo por sexo en el parque (XX: solo hembras; YY: solo machos; XY hembras y machos) (A) y la interacción entre diferenciación de grupo por sexo y la edad (B).

Es difícil comprender las razones de la utilización y distribución de los animales según una diferenciación de los grupos según el sexo, especialmente cuando sólo fue significativa en las tres primeras semanas del ensayo, donde los animales estaban lejos de alcanzar su madurez sexual.

En conclusión, las variaciones en la distribución de los conejos en el medio demuestran el interés de los animales hacia los bloques de heno. Como estrategia, la inclusión de bloques de heno debe tener también un bajo impacto en los costes de producción y asegurar una mejora en el rendimiento productivo. La diferenciación de los animales según el sexo no parece de utilidad sacrificando los animales a 73 días de edad. Esta alternativa requiere un incremento del trabajo de los ganaderos cuando no están del todo definidos los beneficios en el bienestar de los animales.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Almudena Huerta Palacios por la traducción del trabajo en castellano. El ensayo fue financiado por la Universidad de Padova, Italia (Proyecto DOR1780191/17).

Bibliografía

- Biolo M, Trocino A, Zuffellato A, Xiccato G. 2020. Time-based feed restriction and group composition in growing rabbits: Effects on feed intake pattern, growth performance, carcass traits and meat quality. *Livest Sci* 239: 104086.
- Blasco A, Ouhayoun J. 1996. Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised Proposal. *World Rabbit Sci* 4:93-99.
- Bozicovich TFM, Moura ASAMT, Fernandes S, Oliveira AA, Siqueira ERS. 2016. Effect of environmental enrichment and composition of the social group on the behavior, welfare, and relative brain weight of growing rabbits. *Appl Anim Behav Sci* 182:72-79.
- Buijs S, Keeling LJ, Tuytens FAM. 2011. Behaviour and use of space in fattening rabbits as influenced by cage size and enrichment. *Appl Anim Behav Sci* 134: 229-238.
- EFSA. 2020. Health and welfare of rabbits farmed in different production systems. *EFSA J* 18:1-96.
- Princz Z, Orova Z, Nagy I, Jordan D, Štuhec I, Luzi F, Verga M, Szendrő Zs. 2007. Application of gnawing sticks in rabbit housing. *World Rabbit Sci* 15:29-36.
- SAS Institute. 2013. SAS/STAT® User's Guide (Release 9.4). SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.
- Trocino A, Filiou E, Tazzoli M, Biolo M, Zuffellato A, Xiccato G. 2015. Effects of floor type, stocking density, slaughter age and gender on productive and qualitative traits of rabbits reared in collective pens. *Animal* 9:855-861.
- Trocino A, Cotozzolo E, Petracci M, Xiccato G, Zomeño C, Castellini C 2019. Rabbit production and science: the Italian scenario from 1998 to 2018. *It J Anim Sci* 18:1371-1381.
- Verga M, Zingarelli I, Heinzl E, Ferrante V, Martino PA, Luzi F. 2004. Effect of housing and environmental enrichment on performance and behaviour in fattening rabbits. En: 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, pp. 1283-1288.
- Verga M, Luzi F, Carezzi C. 2007. Effects of husbandry and management systems on physiology and behaviour of farmed and laboratory rabbits. *Horm Behav* 52:122-129.

Los diferentes tipos de vacunas frente a RHDV-2 producen un diferente inicio en la respuesta de anticuerpos

Different types of vaccines against RHDV-2 produce a different onset of antibody response

Ramirez-Oliveras S, Baratelli M, Pedrola-Garrido P, Fontseca-Presta M, Gascon S*

HIPRA, Amer (Girona), Spain.

*sandra.gascon@hipra.com

Resumen

Las vacunas frente a RDHV2 comercialmente disponibles se basan en dos tipos de tecnologías, antígenos inactivados o vivos atenuados recombinantes. El presente estudio compara la respuesta de anticuerpos producida por los dos tipos de vacunas mencionados. Para este propósito, se distribuyeron aleatoriamente conejas New Zealand White (n=55) en 4 grupos. Dos grupos se vacunaron respectivamente con una vacuna inactivada frente a RHDV-2 administrada simultáneamente o no con una vacuna viva atenuada frente a mixomatosis, otro grupo con una vacuna viva atenuada recombinante trivalente (RHD, RHDV-2 y mixomatosis) y finalmente un grupo con una solución salina estéril. La respuesta de anticuerpos producida en suero se monitorizó periódicamente mediante un ELISA de competición frente a RHDV-2 hasta los 18 días post-vacunación. Los resultados mostraron que la vacuna inactivada administrada simultáneamente o no con la vacuna de mixomatosis producía anticuerpos en casi todos los animales estudiados (93,33 %-100%) desde los 7 días post vacunación. La vacuna viva atenuada recombinante produjo una respuesta de anticuerpos que se detectó en un máximo del 33,33% de los animales a lo largo de todo el estudio. El presente estudio contribuyó a mostrar que las vacunas actualmente disponibles presentan diferentes dinámicas de producción de anticuerpos; dicha información es importante para el diseño y la monitorización de planes de vacunación en conejo.

Palabras clave: RHDV-2, vacunas, anticuerpos.

Abstract

Commercially available vaccines against RHDV2 are based on two types of technologies, recombinant inactivated or live attenuated antigens. The present study compared the antibody response produced by the two types of vaccines mentioned. For this purpose, New Zealand White rabbits (n=55) were randomized into 4 groups. Two groups were vaccinated subcutaneously, both of them with an inactivated vaccine against RHDV2, and one of them with live attenuated vaccine against myxomatosis in addition. Another group received a live attenuated recombinant trivalent vaccine (RHD, RHDV-2 and myxomatosis) and finally another group was given a sterile saline solution. The antibody response produced in serum was periodically monitored by means of a competition ELISA against RHDV-2 until 18 days post-vaccination. The results showed that the inactivated vaccine administered simultaneously or not with the myxomatosis vaccine produced antibodies in almost all the animals studied (93.33%-100%) from 7 days post-vaccination. The recombinant live attenuated vaccine produced an antibody response that was detected in a maximum of 33.33% of the animals throughout the study. The present study helped to show that the currently available vaccines present different dynamics of antibody production. This information is important for the design and monitoring of vaccination plans in rabbits.

Keywords: RHDV-2, vaccines, antibodies.

Introducción

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo tipo 2 (RHDV-2) afecta principalmente a los conejos jóvenes; por ello, es importante inmunizarlos lo antes posible para que estén protegidos cuando la inmunidad materna decae (Baratelli *et al.*, 2020). Las vacunas comerciales actuales contra el RHDV-2 se basan en dos tipos de tecnologías, antígenos inactivados o vivos atenuados recombinantes. Este estudio pretende comparar la dinámica de producción de anticuerpos contra RHDV-2 producida por los dos tipos de vacunas mencionadas.

Materiales y métodos

Para ello, se distribuyeron aleatoriamente conejas New Zealand White (Granja San Bernardo, España) libres de patógenos específicos de 8 semanas de edad en 4 grupos de 15 animales cada uno (Tabla 1). En el caso del grupo A las dos vacunas se administraron por separado en dos sitios diferentes.

Tabla 1. Distribución de los animales entre grupos experimentales

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Vacuna administrada	ERAVAC® y MIXOHIPRA® (Laboratorios HIPRA S.A., España)	ERAVAC® (Laboratorios HIPRA S.A., España)	Vacuna comercial frente a RHD y mixomatosis	Control PBS
Tipo de vacuna frente a RHD2	Vacuna inactivada	Vacuna inactivada	Vacuna viva recombinante trivalente	-

La respuesta de anticuerpos producida por las vacunas fue monitoreada hasta 18 días post vacunación (dpv), dado que a los 21 dpv se llevó a cabo una infección experimental de mixomatosis para dar respuesta a otro estudio, relacionado con éste con título: *Eficacia de diferentes planes de vacunación frente a mixomatosis*. El nivel de anticuerpos en sangre se analizó mediante un ensayo ELISA competitivo contra RHDV-2. Los niveles de anticuerpos entre grupos se compararon con el test de Kruskal-Wallis.

Resultados

ERAVAC® produjo una respuesta de anticuerpos que fue detectable en el 93,33 % (A) y el 100 % (B) de los animales a partir del 7 dpv. En el caso del grupo C el 33,33% de los conejos vacunados fueron positivos a los 18 dpv. El título de anticuerpos RHDV-2 a los 18 dpv fue mayor en los conejos vacunados con la vacuna inactivada (6,39-6,70 Log₂ cELISA) en comparación con los vacunados con la vacuna viva recombinante (3,06 Log₂ cELISA), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Finalmente, los coeficientes de variación de los títulos de anticuerpos fueron 17,21% (A), 30,85% (B) y 80,58% (C) en los grupos de vacunas inactivadas y vivas recombinantes (Figura 1).

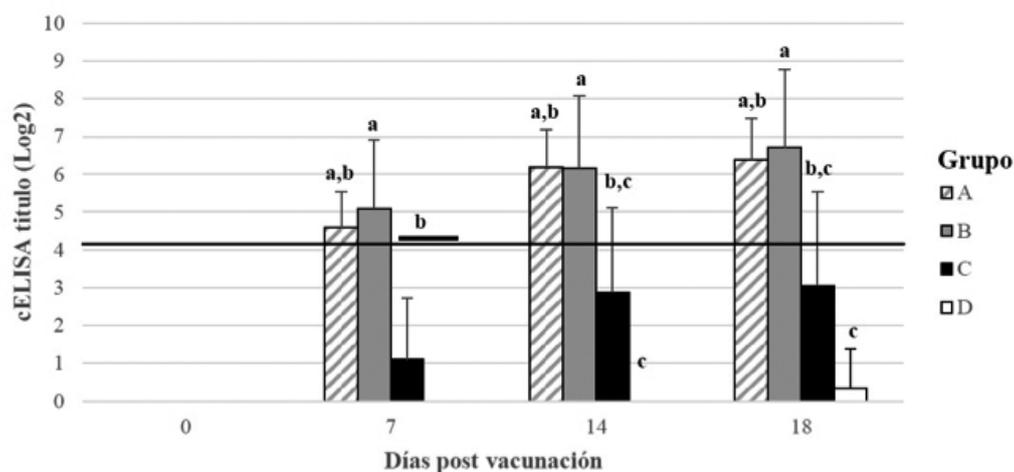


Figura 1. Respuesta de anticuerpos en sueros de animales vacunados con RHDV-2. La línea negra continua representa el punto de corte positivo del ensayo (>3,32 Log₂ cELISA). Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa (prueba de Kruskal-Wallis; n=15).

Discusión y conclusiones

Los resultados sugirieron que las dos vacunas frente a RHD estudiadas produjeron una respuesta de anticuerpos contra el RHDV-2 con diferente inicio y homogeneidad. ERAVAC® demostró ser capaz de proporcionar rápidamente una respuesta de anticuerpos homogénea contra el RHDV-2. Además, la administración simultánea con MIXOHIPRA® H no interfirió con el desarrollo de esta inmunidad.

Bibliografía

Baratelli M, Molist-Badiola J, Puigredon-Fontanet A, Pascual M, Boix O, Mora-Igual FX, Woodward M, Lavazza A, Capucci L. 2020 Characterization of the maternally derived antibody immunity against Rhdv-2 after administration in breeding does of an inactivated vaccine. *Vaccines (Basel)* 8(3):484.

Evaluación de la eficacia de ERAVAC[®] contra una cepa de la enfermedad hemorrágica del conejo tipo 2 (RHDV2) aislada en Francia en 2020

Evaluation of the efficacy of ERAVAC[®] against a strain of rabbit haemorrhagic disease type 2 (RHDV2) isolated in France in 2020

Perozo E⁺, Montbrau C⁺, Fontseca M⁺, Gascon S⁺

HIPRA, Av. de la Selva 135, 17170 Amer, Spain.

⁺Contribución equivalente en este trabajo

^{*}sandra.gascon@hipra.com

Resumen

En 2010, una nueva variante de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV2) emergió en Francia y rápidamente se extendió por todo el mundo. El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia de una vacuna inactivada frente a RHDV2 frente a una cepa aislada recientemente. Para ello, se seleccionaron 40 conejos New Zealand White y se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos, uno vacunado y otro no vacunado. A los 7 días post-vacunación, todos los animales fueron infectados por vía intramuscular con una cepa de RHDV2 descrita como altamente patogénica y aislada en Francia en el 2020. Todos los animales vacunados sobrevivieron al desafío y no presentaron ningún signo clínico, mientras que el grupo control mostró un 75% de ratio de mortalidad. Por lo tanto, se demuestra que ERAVAC[®] es eficaz para la prevención de brotes de cepas de RHDV2 que circulan actualmente.

Palabras clave: RHDV2, vacuna, eficacia.

Abstract

In 2010, a new variant of rabbit haemorrhagic disease (RHDV2) emerged in France and spread rapidly throughout the world. The aim of this study was to evaluate the efficacy of an inactivated RHDV2 vaccine against a recently isolated strain. For this purpose, 40 New Zealand White rabbits were selected and randomly distributed into two groups, one vaccinated and the other non-vaccinated. At 7 days post-vaccination, all the animals were infected intramuscularly with a strain of RHDV2 described as highly pathogenic and isolated in France in 2020. All the vaccinated animals survived the challenge and did not show any clinical signs, while the control group showed a 75% mortality rate. Therefore, ERAVAC[®] was shown to be effective in preventing outbreaks of currently circulating RHDV2 strains.

Keywords: RHDV2, vaccine, efficacy.

Introducción

En 2010, una nueva variante de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV2) emergió en Francia y rápidamente se extendió por todo el mundo, causando brotes en conejos domésticos y en granjas comerciales. El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia de una vacuna inactivada frente a RHDV2 frente a una cepa aislada recientemente.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 40 conejos New Zealand White de 30 días de vida y se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos: el grupo A fue vacunado con 0,5mL de ERAVAC® por vía subcutánea, una vacuna inactivada frente a RHDV2, y el grupo B que no fue vacunado. Para la infección experimental se decidió utilizar una cepa de RHDV2 descrita como altamente patogénica y aislada en Francia en el 2020. A los 7 días post-vacunación, todos los animales fueron infectados por vía intramuscular con 1mL de 215 UHA/ml de dicha cepa. Durante todo el estudio se evaluaron los signos clínicos y la mortalidad de todos los animales. La proporción de animales que murieron por grupo se analizó con un χ^2 test.

Resultados

Todos los animales vacunados sobrevivieron al desafío y no presentaron ningún signo clínico, tal y como se muestra en la **Tabla 1**. La ratio de mortalidad en el grupo control (75%) fue estadísticamente superior (Chi-square Test; $p < 0.05$) al del grupo vacunado (0%). Dichos resultados confirman que la cepa utilizada se puede considerar como altamente patogénica.

Tabla 1. Signos clínicos, mortalidad y ratio de supervivencia observado durante el estudio.

	Signos clínicos	Mortalidad	Ratio de supervivencia (%)
Grupo A (vacunado)	0/20	0/20	100
Grupo B (control)	15/20	15/20	25

Discusión y conclusión

Estudios anteriores demostraron la eficacia de ERAVAC® frente a diferentes tipos de desafíos de RHDV2 (Montbrau *et al.*, 2016; Montbrau *et al.*, 2021; Sánchez-Matamoros, 2021). Sin embargo, este es el primer estudio realizado con una cepa aislada en el 2020. Los resultados de este estudio demuestran la eficacia de la vacuna ERAVAC® después de un desafío a los 7 días post-vacunación. En vista a estos resultados, se demuestra que ERAVAC® es eficaz para la prevención de brotes de cepas de RHDV2 que circulan actualmente.

Bibliografía

- Montbrau C, Padrell M, Ruiz MC. 2016. Efficacy and safety of a new inactivated vaccine against the rabbit haemorrhagic disease virus 2-like variant (RHDV-2). 11th World Rabbit Congress (WRC), Qingdao, 2016; 575-578.
- Montbrau C, Gascon S, Ruiz MC. 2021. Efficacy of ERAVAC® against a heterologous challenge with a virulent RHDV-2 strain in the presence and/or absence of maternal derived antibodies. 12th World Rabbit Congress (WRC), Nantes, 2021; P-27.
- Sánchez-Matamoros A, Woodward M, Navas E, Boix O, Valls L. 2021. Effect of vaccination on protection against RHDV-2 and viral load. 12th World Rabbit Congress (WRC), Nantes, 2021, P-34.

Biossegurança nas cuniculturas do norte de Portugal: Presente e futuro

Bioseguridad en la cunicultura en el norte de Portugal: Presente y futuro

Biosafety in rabbit farming in northern Portugal: Present and future

Morais D¹, Coelho A^{1,2,3}, Pinheiro V^{1,2,3*}, Monteiro J⁴

¹Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD); ²Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV); ³AI4animals, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal; ⁴José Azevedo Monteiro, Lda. Marco Canaveses.

*vpinheir@utad.pt

Resumo

A biossegurança é um conceito com importância amplamente reconhecido no setor da produção animal sendo parte integrante da estratégia de controlo e prevenção de doenças infecciosas. Através da elaboração de programas de biossegurança com base na epidemiologia de diferentes patologias infecciosas, tem-se verificado uma redução da taxa de mortalidade de efetivos de coelhos, um aumento do estatuto sanitário e das condições de bem-estar dos animais e um aumento de rentabilidade do sector. Durante o período de setembro de 2020 a maio de 2021, 28 explorações de coelhos do Norte e Centro de Portugal (20% total de explorações do país) foram alvo de um inquérito sobre biossegurança e foram analisados relatórios dos diagnósticos anatomopatológicos (2030). Apenas um produtor (n=1) tinha conhecimento do estatuto sanitário do núcleo das futuras reprodutoras (3,6%). Em 87,5% das explorações não se procede à quarentena das reprodutoras recém-chegadas (n=24). A realização de controlo químico e microbiológico da água é realizada só em 28,6% das explorações (n=8). Apenas 7,1% dos produtores (n=2) possui registo da entrada de pessoas nas explorações. Desta forma, mais esforços e investimentos devem ser dirigidos aos programas de biossegurança de forma a promover a saúde dos animais e a saúde pública.

Palavras-chave: biossegurança, cunicultura, produtividade, medicina preventiva, saúde pública.

Resumen

La bioseguridad es un concepto con una importancia ampliamente reconocida en el sector de la producción animal, siendo parte integral de la estrategia para el control y prevención de enfermedades infecciosas. Mediante el desarrollo de programas de bioseguridad basados en la epidemiología de distintas patologías infecciosas, se ha producido una reducción de la tasa de mortalidad de los conejos, una mejora del estado sanitario y de las condiciones de bienestar de los animales, aumentando también la rentabilidad del sector. Durante el período de septiembre de 2020 a mayo de 2021, 28 granjas de conejos en el norte y centro de Portugal (20% del total de granjas en el país) fueron sujetas a una encuesta de bioseguridad y se analizaron informes de diagnósticos patológicos (2030). Solo un productor (n=1) conocía el estado de salud del núcleo de futuras madres (3,6%). En el 87,5% de las granjas, las conejas recién llegadas no pasaban por la cuarentena (n=24). El control químico y microbiológico del agua se realizó solo en el 28,6% de las explotaciones (n=8). Solo el 7,1% de los productores (n=2) tienen registro de ingreso de personas en la explotación. De esta forma, se deben dirigir más esfuerzos e inversiones a los programas de bioseguridad para promover la salud animal y la salud pública.

Palabras clave: bioseguridad, cunicultura, productividad, medicina preventiva, salud pública.

Abstract

The biosecurity is a widely recognized concept in the animal production sector and, given its importance, it is an integral part of the strategy for the control and prevention of infectious diseases. Through the development

of biosecurity programs based on the epidemiology of different infectious pathologies, there has been a reduction in the mortality rate of rabbits, an increase in the health status and welfare conditions of the animals and an increase of profitability in the sector. During the period from September 2020 to May 2021, 28 rabbit farms in the North and Center of Portugal (20% of total farms in the country) were subject to a biosafety survey and reports of pathological diagnoses were realised (2030). Only one producer (n=1) was aware of the health status of the nucleus of future rabbit does (3.6%). In 87.5% of farms, newly arrived rabbit does are not quarantined (n=24). Chemical and microbiological water control is made in 28.6% of farms (n=8). Only 7.1% of rabbit farmers (n=2) have a record of people that access the farms. Thus, more efforts and investments must be directed to biosafety programs in order to promote animal health and public health

Keywords: biosafety, rabbit farming, productivity, preventive medicine, public health.

Introdução

A biossegurança compreende um programa regido por um conjunto de medidas, requisitos e práticas operacionais com a finalidade, por um lado, de impedir a entrada de agentes patogénicos na exploração (medidas externas) e, por outro, de reduzir a disseminação destes organismos entre os animais e para fora da exploração (medidas internas), uma vez que é praticamente impossível obter um ambiente estéril (Alarcón *et al.*, 2021). Os planos de biossegurança devem ser ajustados a cada exploração, pois as diferenças no manejo nutricional, controlo ambiental, instalações e genética dos coelhos irão influenciar a eficácia das medidas postas em prática (Dewulf & Van Immerseel, 2019; Saxmose Nielsen *et al.*, 2020).

De facto, em explorações onde se verificam bons níveis de biossegurança interna e externa, há um menor recurso a tratamento médico de diferentes patologias (Postma *et al.*, 2016a), o que possibilita a redução do uso de antimicrobianos (Laanen *et al.*, 2013; Postma *et al.*, 2016b), ação essencial no combate ao desenvolvimento de resistências antimicrobianas. No setor da cunicultura, já foram detetadas resistências em estirpes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (Kylie *et al.*, 2017).

Tendo em conta que a implementação de programas de biossegurança é economicamente rentável (Dewulf & Van Immerseel, 2019), a sua implementação deve ser vista como um investimento e não uma despesa. Este estudo visou avaliar os planos de biossegurança em explorações cunícolas, de forma a identificar as possíveis falhas, para que se possam aplicar medidas corretivas.

Material e métodos

Foi efetuado um estudo transversal em 28 explorações de coelhos (correspondente a cerca de 20% do número total de explorações no país), distribuídas por 22 concelhos do Norte e Centro de Portugal: Alijó, Boticas, Braga, Cabeceiras de Basto, Chaves, Estarreja, Fafe, Guimarães, Lousã, Macedo de Cavaleiros, Miranda do Douro, Mirandela, Mogadouro, Montalegre, Nelas, Sabrosa, Santa Maria da Feira, Sever do Vouga, Torre de Moncorvo, Vila Nova de Famalicão, Vila Pouca de Aguiar e Vila Real. As 28 explorações, que contabilizavam aproximadamente 272000 coelhos, foram alvo de um inquérito epidemiológico, através da realização de um questionário, sobre as suas condições de biosseguranças.

Inquérito sobre biossegurança

O inquérito sobre biossegurança tem como base de apoio um questionário desenvolvido pela Universidade de Gent (Biocheck.UGent™), com vista a avaliar e comparar as medidas de biossegurança aplicadas em avicultura e suinicultura; o livro "Biosecurity in Animal Production", editado por Dewulf & Van Immerseel (2019), e o modelo de inspeção de explorações de coelhos, da autoria de Machado & Amorim (2019), cujo objetivo é aferir as medidas praticadas nas explorações e a necessidade de se aplicarem medidas de melhoria.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos a partir dos inquéritos revelam que, de uma forma geral, a maior parte das explorações em causa apresentam bons níveis de biossegurança. Na Tabela 1 são apresentados alguns dos indicadores de biossegurança considerados e que apresentaram elevada presença nas cuniculturas visitadas.

Tabela 1. Boas práticas amplamente implementadas nas explorações.

	Maternidade e engorda em pavilhões diferentes	Compartimento de armazenamento de cadáveres na área suja	Silos são desinfetados pelo menos 1x ano	Controlo de pragas	Uso de EPIs
Total de explorações (N)	28	28	28	28	28
Explorações (N)	25	27	24	27	28
%	89,3%	96,4%	85,7%	96,4%	100,0%

Não obstante a maioria das explorações apresentar um conjunto de indicadores satisfatórios, certas medidas podem ser implementadas ou, simplesmente, melhoradas (Tabela 2), no sentido de tonar as cuniculturas mais seguras.

Tabela 2. Pontos críticos de planos de biossegurança nas explorações estudadas.

	Conhecimento do estatuto sanitário do núcleo das futuras reprodutoras	Realização de quarentena de reprodutoras recém-chegadas	Controlo químico e microbiológico da água raro	Registo de entradas de pessoas na exploração	Isolamento de animais com sinais clínicos
Total de explorações (N)	28	28	28	28	28
Explorações (N)	1	4	8	2	1
%	3,6%	14,2%	28,6%	7,2%	3,6%

Em primeiro lugar destacam-se os casos de apenas 1 produtor ter conhecimento do estatuto sanitário do núcleo das futuras reprodutoras (3,6%) e a não realização de quarentena de reprodutoras recém-chegadas, observando-se esta situação em 24 cuniculturas. Estas situações deveriam ser mudadas, já que a introdução de novos animais revela-se o principal fator de introdução de agentes infecciosos (Corzo et al., 2010; Bottoms et al., 2013; Maes et al., 2016). Outra conduta digna de atenção é que, apesar de uma boa parte dos produtores realizar anualmente controlo químico e microbiológico da água, a segunda percentagem mais significativa diz respeito a produtores que realizam raramente este controlo e, portanto, é um resultado a ter em conta, já que a qualidade da água pode mudar abruptamente, pelo que deve ser regularmente avaliada (Olkowski, 2019). Por outro lado, apenas 7,1% dos produtores (n=2) possui registo de entradas de pessoas na exploração, medida esta bastante simples de ser implementada e eficaz, pois possibilita o rastreio de todas as pessoas ou veículos que poderiam ser a fonte de infeção, caso ocorra um surto de uma doença (Barceló & Marco, 1998; Millman et al., 2017).

Em conclusão, tendo em conta que o sucesso de um plano de biossegurança depende de um conjunto enorme de ações, pode-se inferir que, na verdade, certas falhas identificadas na biossegurança no panorama da cunicultura podem ser facilmente corrigidas e melhorar os níveis de biossegurança das cuniculturas,.

Agradecimentos

Para os investigadores pertencentes ao CECAV, a participação foi suportada pelos projetos UIDB/CVT/00772/2020 e LA/P/0059/2020 financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT). Agradecemos também a todos os cunicultores pela colaboração.

Bibliografia

- Alarcón LV, Allepuz AA, Mateu E. 2021. Biosecurity in pig farms: a review. *Porcine Health Manag* 7(1), 5.
- Barceló J, Marco E. 1998. On farm biosecurity. In *Proceedings: 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9*, (8), 129-133.
- Bottoms K, Poljak Z, Friendship R, Deardon R, Alsop J, Dewey C. 2013. An assessment of external biosecurity on southern Ontario swine farms and its application to surveillance on a geographical level. *Can J Vet Res* 77:241-253.
- Corzo CA, Mondaca E, Wayne S, Torremorell M, Davies P, Morrison B. 2010. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 154:185-92.
- Dewulf J, Van Immerseel F. 2019. General principles of biosecurity in animal production and veterinary medicine. In: Dewulf,

- J., & Van Immerseel, F. editors. *Biosecurity in animal production and veterinary medicine*. CABI Publishing. pp. 63-76.
- Kylie J, Brash M, Whiteman A, Tapscott B, Slavic D, Weese JS, Turner PV. 2017. *Biosecurity practises and causes of enteritis on Ontario meat rabbit farms*. *Can Vet J* 58:571-578.
- Laanen M, Persoons D, Ribbens S, de Jong E, Callens B, Strubbe M, Maes D, Dewulf J. 2013. *Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds*. *Vet J* 198:508-512.
- Machado L, Amorim B. 2019. *Inspeção em granjas cunícolas para corte - Melhorando a qualidade e os índices produtivos*. *Rev Bras Cunicultura*, 15:100-154.
- Maes D, Van Soom A, Appeltant R, Arsenakis I, Nauwcnck H. 2016. *Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens*. *Theriogenology* 85:27-38.
- Millman C, Christley R, Rigby D, Dennis D, O'Brien SJ, Williams N. 2017. "catch 22": *Biosecurity awareness, interpretation and practise amongst poultry catchers*. *Prev Vet Med* 141:22-32.
- Olkowski A. 2019. *Drinking water hygiene and biosecurity*. In: Dewulf, J., & Van Immerseel, F. editors. *Biosecurity in animal production and veterinary medicine*. CABI Publishing. pp. 211-241
- Postma M, Backhans A., Collinea, L, Lösken S, Sjölund M, Belloc C, Emanuelson U, Grosse Beilage E, Nielsen EO, Stärk C, Dewulf J. 2016a. *Evaluation of the relationship between the biosecurity status, production parameters, herd characteristics and antimicrobial usage in farrow-to-finish pig production in four EU countries*. *Porcine Health Manag* 2:1-11.
- Postma M, Backhans A, Collineau L, Lösken S, Sjölund M, Belloc C, Emanuelson U, Grosse Beilage E, Stärk C. 2016b. *The biosecurity status and its associations with production and management characteristics in farrow to-finish pig herds*. *Animal* 10:478-489.
- Saxmose Nielsen S, Alvarez J, Bicout DJ, Calistri P, Depner K, Drewe JA, Garin-Bastuji B, Gonzales Rojas JL, Gortázar Schmidt, C, Michel V, Miranda Chueca MÁ, Roberts HC, Sihvonen LH, Spoolder H, Stahl K, Velarde Calvo A, Viltrop A, Buijs S, Edwards S, Winckler C. 2020. *Health and welfare of rabbits farmed in different production systems*. *EFSA Journal* 18:1-96.

Biossegurança como ferramenta preventiva da colibacilose em coelhos

La bioseguridad como herramienta preventiva de la colibacilosis en conejos

Biosafety as a preventive tool for colibacillosis in rabbits

Morais D¹, Coelho A^{1,2,3}, Pinheiro V^{1,2,3*}, Monteiro J⁴

¹Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD); ²Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV); ³AI4animals, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Quinta de Prados, Vila Real, Portugal; ⁴José Azevedo Monteiro, Lda. Marco Canaveses

*vpinheir@utad.pt

Resumo

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete da família Enterobacteriaceae. Embora este microrganismo possa ser um residente inócuo do trato gastrointestinal de todos os mamíferos, ele também tem a capacidade de se tornar um patógeno altamente adaptado capaz de causar uma série de doenças. A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) é um dos principais patótipos patogênicos de *E. coli* que causa elevada morbidade e mortalidade associada à diarreia em coelhos (colibacilose) e tem potencial zoonótico, podendo tornar-se num problema de saúde pública. Para avaliar a relação entre a ocorrência de patologias digestivas com a etiologia infecciosa e as condições de biossegurança das explorações de coelhos, foi realizado um inquérito epidemiológico sobre biossegurança e analisados os relatórios de diagnósticos patológicos (2030 necropsias) realizados em 28 cuniculturas do Norte e Centro de Portugal (representando 20% do total de cuniculturas do país). Nas cuniculturas estudadas, a ocorrência média de colibacilose foi a segunda maior (23,9%), atrás da enterotoxemia. Neste estudo, destaca-se a associação positiva entre as instalações que têm controlo da ventilação ($p=0,034$), a distância a mais de 100 metros das vias públicas ($p=0,001$), bem como a presença de pedilúvios entre a área suja e a limpa ($p=0,020$), e a ocorrência de valores de colibacilose abaixo da média. Os resultados obtidos sugerem que os cunicultores devem apostar e investir em normas biossegurança, para que possam obter melhores parâmetros produtivos e económicos sem comprometer a saúde pública e a saúde animal.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, colibacilose, criação de coelhos, biossegurança, medicina veterinária preventiva.

Resumen

La *Escherichia coli* es una bacteria gran negativa con forma de bastoncillo de la familia Enterobacteriácea. Aunque este microorganismo puede ser un residente inocuo del tracto gastrointestinal de todos los mamíferos, también tiene la capacidad de convertirse en un patógeno altamente adaptado capaz de causar una serie de enfermedades. La *E. coli* enteropatógeno (EPEC) es uno de los principales patótipos patogênicos de *E. coli* que causa una alta mortalidad e morbilidad asociada a diarreia en conejos (colibacilosis) y tiene potencial zoonótico, lo que puede convertirse en un problema de salud pública. Para evaluar la relación entre la ocurrencia de patologías digestivas con la etiología infecciosa y las condiciones de bioseguridad de las granjas cunícolas, se realizó una encuesta epidemiológica sobre bioseguridad y se analizarán los informes de diagnósticos patológicos (2030 necropsias), realizados en 28 granjas del Norte y Centro de Portugal (lo que representa el 20% del total de la cunicultura del país). En los conejos estudiados, la ocurrencia promedio de colibacilosis fue la segunda más alta (23,9%), después de la enterotoxemia. En este estudio destacamos la asociación positiva entre los establecimientos que tienen control de ventilación ($p=0,034$), la distancia a más de 100 metros de la vía pública ($p=0,001$), así como la presencia de pediluvios entre el área sucia y la limpia ($p=0,020$), y la ocurrencia de valores de colibacilosis por debajo del promedio. Los resultados obtenidos sugieren que los cunicultores deben apostar e invertir en normas de bioseguridad, de modo que puedan obtener mejores parámetros productivos y económicos sin comprometer la salud pública y la sanidad animal.

Palabras clave: *Escherichia coli*, colibacilosis, cunicultura, bioseguridad, medicina preventiva.

Abstract

The *Escherichia coli* is a Gram-negative rod-shaped bacteria from the family of Enterobacteriaceae. Although this organism can be an innocuous resident of the gastrointestinal tract of all mammals, it also has the capacity to become a highly adapted pathogen, capable of causing a range of diseases. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) is one of the main pathogenic *E. coli* pathotypes that causes substantial diarrhea-associated morbidity and mortality in rabbits (colibacilosis) and has zoonotic potential. In order to evaluate the relationship between the occurrence of digestive pathologies with infectious etiology and the biosecurity conditions of rabbits' farms, an epidemiological survey about biosecurity was applied and reports of pathological diagnoses were analysed in 28 rabbits' farms in the North and Center of Portugal (representing 20% of total rabbit breeds in the country). In the studied farms, the average occurrence of colibacilosis was the second highest (23.9%) after enterotoxemia, with a standard deviation of 26.2%. In this study, the association between the facilities that control ventilation ($p=0.034$), the farm holdings that are more than 100 metres away from public pathways ($p=0.001$), as well as the presence of footbaths between a dirty and clean area ($p=0.020$), and the presence of colibacilosis values below the mean is highlighted. The results obtained suggest that farmers should bet and invest in biosecurity, so they can get better productive and economic parameters without compromising public health and animal health.

Keywords: *Escherichia coli*, colibacilosis, rabbit breeding, biosecurity, preventive veterinary medicine.

Introdução

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é um bacilo Gram-negativo anaeróbio, pertencente à família Enterobacteriaceae (Quinn, 2011). Existem várias estirpes de *E. coli*, sendo que algumas são passíveis de colonizar o trato intestinal do coelho logo após o nascimento, enquanto que outras, em casos de excreção deste microrganismo por parte do hospedeiro, podem sobreviver semanas a meses em partículas de fezes, no pó, ou na água (Markey *et al.*, 2013; Moxley, 2013).

Em explorações de coelhos, a *E. coli* tem sido primariamente associada ao surgimento de colibacilose em fêmeas reprodutoras e lóparas lactantes (por excreção desta bactéria por parte da progenitora) e em coelhos na engorda (Saxmose Nielsen *et al.*, 2021). Esta doença é provocada por uma estirpe patogénica, mais especificamente *E. coli* enteropatogénica (EPEC), cuja patogenicidade depende do desenvolvimento de uma lesão intitulada "attaching and effacing", resultado da aderência da bactéria aos enterócitos e posterior destruição das microvilosidades (Croxen *et al.*, 2013).

A chave para o controlo e prevenção do surgimento de EPEC nas explorações são as boas práticas de manejo (Moxley, 2013), higiene e profilaxia, que podem reduzir a incidência de patologias (Fárias-Kovac *et al.*, 2020). Posto isto, este estudo visa avaliar a relação entre as condições de biossegurança nas diferentes explorações e a ocorrência de colibacilose.

Material e métodos

Foi realizado um estudo transversal em 28 explorações de coelhos (correspondente a 20% do número total de explorações no país), com distribuição em 22 concelhos do Norte e Centro de Portugal: Alijó, Boticas, Braga, Cabeceiras de Basto, Chaves, Estarreja, Fafe, Guimarães, Lousã, Macedo de Cavaleiros, Miranda do Douro, Mirandela, Mogadouro, Montalegre, Nelas, Sabrosa, Santa Maria da Feira, Sever do Vouga, Torre de Moncorvo, Vila Nova de Famalicão, Vila Pouca de Aguiar e Vila Real. As 28 explorações, que contabilizavam aproximadamente 272000 coelhos, foram alvo de um inquérito epidemiológico, através da realização de um questionário, sobre as condições de biosseguranças das mesmas. Foram também realizados exames de diagnóstico anatomopatológicos em animais mortos.

Inquérito sobre biossegurança

O inquérito sobre biossegurança tem como base um questionário desenvolvido pela Universidade de Gent (Biocheck.UGent™), cujo objetivo é a avaliação e comparação das medidas de biossegurança aplicadas em avicultura e suinicultura; o livro "Biosecurity in Animal Production", editado por Dewulf & Van Immerseel (2019), e o

modelo de inspeção de explorações de coelhos, da autoria de Machado & Amorim (2019), com vista a aferir as medidas praticadas nas explorações e a necessidade de se implementarem medidas de melhoria.

Diagnóstico Anatomopatológico e Laboratorial

O diagnóstico anatomopatológico foi obtido através do exame post mortem durante a necropsia do animal. Previamente à sua realização, procedeu-se à identificação do animal, nomeadamente, a sua idade, estado fisiológico e aptidão. A técnica foi iniciada após estabilização do cadáver, fazendo-se de seguida uma incisão na linha média, posterior abertura da cavidade abdominal, observação das cavidades e dos órgãos *in loco*. Numa fase seguinte, observaram-se as lesões e aferiu-se a compatibilidade com as possíveis patologias de etiologia infecciosa causadoras de problemas digestivos. Os dados recolhidos compreendem 2030 necropsias realizadas nestas 28 explorações desde o período de setembro de 2019 a abril de 2021. Por norma correspondiam a animais encontrados mortos no dia da visita à exploração.

A última fase do diagnóstico envolveu o envio de amostras fecais dos animais necropsiados para serem testadas por PCR (Polymerase Chain Reaction), de modo a confirmar o agente infeccioso relacionado com a morte do animal.

Análise de Dados

Foi efetuada a análise estatística descritiva com recurso à frequência e à média. Para análise da associação entre as variáveis em estudo e a média da ocorrência das patologias nas explorações aplicou-se o teste t de Student. A análise foi feita com recurso ao programa SPSS 25® para Windows XP. Um nível de significância de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados e discussão

A média da ocorrência de lesões compatíveis com as patologias com maior incidência, presentes nas explorações em estudo encontra-se na **Tabela 1**. De facto, a média de ocorrência de colibacilose foi a segunda com maior expressão (23,9%), com um valor máximo de 82,4%, superada apenas pela enterotoxemia.

Tabela 1. Média e desvio-padrão da ocorrência das diferentes patologias (%).

	Colibacilose	Enterocolite epizootica	Enterotiflite	Disbiose	Enterotoxemia
Média	23,9	22,9	13,2	12,8	28,8
Desvio-padrão	26,2	19,6	13,9	20,9	22,2
Valor mínimo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Valor máximo	82,4	70,0	50,0	75	100

Numa segunda fase, a prática de certas medidas de biossegurança, a seguir mencionadas, relacionou-se, com uma diferença estatisticamente significativa, com valores de ocorrência inferiores à média de animais com colibacilose (**Tabela 2**). É exemplo disso a medida de controlo da ventilação, onde a execução da mesma resultou, nessas explorações, em valores de ocorrência de colibacilose inferiores à média. Tendo em conta que uma inadequada ventilação resulta num aumento da carga microbiana no meio ambiente (Alarcón *et al.*, 2021), esta medida figura-se efetivamente como preventiva no que toca ao controlo desta doença.

A medida referente ao facto de a cunicultura se encontrar a mais de 100 metros de caminhos públicos resultou também numa menor ocorrência em coelhos com colibacilose. Dewulf & Van Immerseel (2019) salientam a importância da localização da exploração e o risco associado à proximidade com outras explorações, matadouros ou outras fontes de contágio.

A existência de pedilúvios está intimamente relacionada com uma menor incidência de colibacilose. Este resultado é compatível com a bibliografia existente, pois, tendo em conta que *Escherichia coli* pode ser transmitida via fómites (Amass, 2005), é natural que ao recorrer a pedilúvios e desinfetar o calçado haja uma interferência positiva no ciclo de transmissão.

Tabela 2. Associação entre as variáveis em estudo e a média da ocorrência de lesões compatíveis com colibacilose nas explorações.

Variáveis	Colibacilose (igual ou inferior à média)	Colibacilose (superior à média)	P
Ventilação controlada			
Sim	14 (56,4%)	11 (44,0%)	0,034
A exploração está a mais de 100 metros de caminhos públicos			
Sim	9 (90,0%)	1 (10,0%)	0,001
Existem pedilúvios entre zona suja e limpa			
Sim	11 (68,8%)	5 (31,3%)	0,020

Em conclusão, estes são alguns dos resultados que corroboram que um bom protocolo de biossegurança é, efetivamente, uma ferramenta importante na prevenção do aparecimento de patologias digestivas.

Agradecimentos

Para os investigadores pertencentes ao CECAV, a investigação foi suportada pelos projetos UIDB/CVT/00772/2020 e LA/P/0059/2020 financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT). Agradecemos também a todos os cunicultores pela colaboração.

Bibliografia

- Alarcón LV, Allepuz A, Mateu E. 2021. Biosecurity in pig farms: a review. *Porcine Health Manag* 7(1), 5.
- Amass SF. 2005. Biosecurity: Stopping the bugs from getting in. *Pig J* 55:104-114.
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26:822-880.
- Dewulf J, Van Immerseel F. 2019. General principles of biosecurity in animal production and veterinary medicine. In: Dewulf, J., & Van Immerseel, F. editors. *Biosecurity in animal production and veterinary medicine*. CABI Publishing. pp. 63-76.
- Farías-Kovac C, Nicodemus, N, Delgado R, Ocasio-Veja C, Noboa T, Abdelrasoul RAS, Carabaño R, García J. 2020. Effect of dietary insoluble and soluble fibre on growth performance, digestibility, and nitrogen, energy, and mineral retention efficiency in growing rabbits. *Animals* 10: 1346:1-19.
- Machado L, Amorim B. 2019. Inspeção em granjas cunícolas para corte - Melhorando a qualidade e os índices produtivos. *Rev Bras Cunicultura*, 15:100-154.
- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby Elsevier Publishing. pp. 145-189.
- Moxley R. 2013. Enterobacteriaceae: *Escherichia*. In: Scott McVey, D., Kennedy, M., Chengappa, M. M. editors. *Veterinary Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. Publishing, pp 62-75.
- Quinn PJ. 2011. Introduction to Microbiology, Infection, Immunity and Molecular Diagnostic Methods. In Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J. (eds.). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* pp. 1-123.
- Saxmose Nielsen S, Alvarez J, Bicoût DJ, Calistri P, Depner K, Drewe JA, Garin-Bastuji B, Gonzales Rojas JL, Gortázar Schmidt A, Michel V, Miranda Chueca MÁ, Roberts HC, Sihvonen LH, Spooler H, Stahl K, Velarde Calvo A, Viltrop A, Buijs S, Edwards S, Winckler C. 2021. Health and welfare of rabbits farmed in different production systems. *EFSA Journal* 18:1-96.

NOTAS

Compromiso y apoyo al sector cunícola



Manteniendo programas de control efectivo para el futuro


Bioprotection


Agita


Neporex®

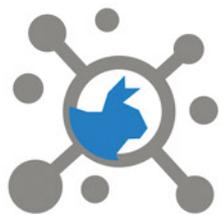

Elector®

ElancoTM

Para más información sobre nuestros productos de Bioprotección, visita nuestra página www.conagitadejatedeinventos.es
Utilice los biocidas de forma segura. Lea siempre la etiqueta y la información sobre el biocida antes de usarlo.

Agita, Elector, Neporex, Elanco y la barra diagonal son marcas registradas de Elanco o sus filiales.

© 2019 Elanco Animal Health, Inc. o sus afiliadas. PM-ES-19-0063



HARVEY • Un modelo integral •

El programa integral de Nanta para una exitosa producción cunícola

Una amplia gama de piensos de alta calidad
diseñados para cada etapa productiva
y adaptados a las necesidades de cada granja



Innovadoras herramientas de gestión y
un servicio de asesoramiento continuo
de mano de los mejores expertos

¿Quieres un plan
nutricional que se
ajuste a las
necesidades de
cada momento?

¿Quieres mejorar
la rentabilidad de
tu granja de
conejos pero no
sabes cómo?

Descubre
HARVEY



Nanta, S.A.

Ronda de Poniente, 9 · 28760 Tres Cantos (Madrid)
nanta@nutreco.es · Tel. 918 075 410 · www.nanta.es

