

LEÓN

XLVII 31/5 y 1/6 2023 **SYMPOSIUM DE CUNICULTURA**

Organizan

Patrocinan





GÓMEZ Y CRESCO

FÁBRICA DE MATERIAL GANADERO

SISTEMA AUTOMÁTICO DE ALIMENTACIÓN SIN FIN

Con control diferenciado de alimentación para cría o engorde

Sistema patentado por Gómez y Crespo



PARQUE DE ENGORDE PARA CONEJOS

Modelos para una o dos líneas de alimentación sin fin



www.gomezycrespo.com · info@gomezycrespo.com · +34 988 217 754

LIBRO DE ACTAS

47 SYMPOSIUM DE CUNICULTURA DE ASESCU

León, 31 de mayo y 1 de junio de 2023

COORDINADORES:

Juan José Pascual
Ceferino Torres
Mariam Pascual
Pedro González
Anna Oliveres

ORGANIZAN:



Asociación
Española de
Cunicultura



universidad
de león



facultad
de veterinaria

PATROCINAN:



El 47 Symposium de Cunicultura de ASESCU se celebró en el Paraninfo de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León los días 31 de mayo y 1 de junio de 2023

El simposio fue organizado por:

Asociación Española de Cunicultura (ASESCU)
Facultad de Veterinaria de la Universidad de León

Contó con el patrocinio de las siguientes empresas y organizaciones:

Intercun
Gómez y Crespo
Coren
Laboratorios Hipra
Laboratorios Maymo
Nanta
Hermi

Contó con la colaboración de las siguientes empresas:

Andrés Pinaluba
PH Albio
Piensos Asa
Cogal
De Heus
Elanco
Inserbo
Ebronatura
Henar Comunicación

Comité organizador:

Juan José Pascual
Ceferino Torres
Mariam Pascual
Pedro González
Anna Oliveres
M^a Teresa Carbajo

Comité Científico

Juan José Pascual
Ceferino Torres
Mariam Pascual
Pedro González
Miriam Piles
Enrique Blas
Mariluz García
Mario Malo
Juan Manuel Corpa
Arantxa Villagrà
Ernesto Gómez

Los coordinadores de este libro de actas fueron:

Juan José Pascual
Ceferino Torres
Mariam Pascual
Pedro González
Anna Oliveres
Estefanía Reina
Sandra Fernández

Edita: Editorial Agrícola Española, S.A.
C/ Caballero de Gracia, 24 3º Izda.
28013 Madrid

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

ISBN: 978-84-17884-32-1

Depósito Legal: M-17022-2023

Presentación del Presidente de ASESCU

Este año tenemos la suerte de celebrar la 47 edición del Symposium de Cunicultura de ASESCU en Facultad de Veterinaria de la Universidad de León. Hemos querido en esta ocasión acercarnos a Castilla y León, una de las regiones más importantes y modernas de nuestra producción cunícola, y en concreto a la ciudad de León. Además de disfrutar de Symposium, León es una ciudad preciosa e histórica, con sus admirables monumentos como la Catedral, San Marcos o San Isidoro, entre otros. Además, se trata de una ciudad caracterizada por su buena acogida a los viajeros al ser paso del Camino de Santiago, por lo que se trata de una urbe acogedora, rica en callejuelas, plazas e innumerables tabernas y mesones, que nos permitirá disfrutar también en los momentos de relación del Symposium.

Esta edición está coorganizada con la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, una facultad histórica, creada en 1852 como Escuela Subalterna de Veterinaria, siendo una de las facultades de veterinaria con mayor prestigio de nuestro país, y cuna de muchos de los técnicos que nos facilitan el día a día en el sector cunícola.

Seguimos viviendo quizás una de las épocas más críticas que he conocido para la ganadería y en especial para la cunicultura. Continúan 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, la tendencia inflacionista del último año que ha encarecido todavía más los precios, 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 se centra de nuevo en todos estos desafíos que nos preocupan y debemos afrontar. Para ello, hemos invitado a expertos ponentes que nos informarán sobre el pasado, presente y futuro de la cunicultura en León y las herramientas de ganadería de precisión, que tanto se ha desarrollado en los últimos años, y que nos pueden ser utilidad para afrontar los mencionados retos. Además, destinaremos una sesión monográfica a las estafilococias en conejo, una de las enfermedades más frecuentes que limitan la rentabilidad de nuestras explotaciones. Por otro lado, celebraremos de un par de mesas redondas sobre aspectos que nos preocupan en el día a día. La primera de ellas versará sobre las consecuencias de la nueva legislación veterinaria, donde nuestros técnicos de AVECU, el sector representado por INTERCUN y el Ministerio hablarán sobre las particularidades de la aplicación de esta legislación en cunicultura. La segunda de ellas la centraremos en otro problema que nos preocupa mucho a todo el sector, como es la rentabilidad en las explotaciones cunícolas, donde distintos expertos y grupos productores y comercializadores de conejo debatirá sobre sobrevivir bajo las condiciones actuales. Así, este evento es crucial para congrega 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 la genética, el bienestar, la nutrición, la reproducción y la patología. Los mejores trabajos, llevados a cabo por los más jóvenes, podrán acceder a la quinta edición del "Premio para jóvenes investigadores ASESCU-Pintaluba", financiado por los Laboratorios Andrés Pintaluba, S.A., que se celebrará durante la ceta de gala.

No quisiera despedirme sin antes mostrar todo mi agradecimiento a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León por acogernos en su casa y 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

PROGRAMA

PROGRAMA DEL 47 SYMPOSIUM DE CUNICULTURA

León, miércoles 31 de mayo y jueves 1 de junio de 2023

Miércoles, 31 de mayo

MAÑANA

- 8:00-9:30 Registro y recogida de la documentación
- 9:30-10:00 Inauguración oficial del Symposium
- 10:00-10:45 **Ponencia: "Pasado, presente y futuro de la cunicultura en León".**
D. Joan Rosell, CunivetService; y D. Francisco Javier González, STC Cunicultura Nanta SAU.
Presenta: D. Juan José Pascual
- 10:45-11:45 **Comunicaciones libres: GENÉTICA Y SOSTENIBILIDAD**
Modera: Dña. Miriam Piles
- Tendencias genéticas en tres líneas de conejo seleccionadas por Eficiencia Alimentaria.**
Sánchez JP, Pascual M, Piles M
- Creación de una línea seleccionada por eficiencia alimentaria. 1. Criterios de selección.**
Blasco A, Martínez-Álvaro M
- Evaluación de la calidad espermática en líneas de conejo seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada.**
Baeza M, Serrano D, Argente MJ, García ML
- Caracterización de la cunicultura como un sistema agroalimentario sostenible: revisión sistemática.**
Manjarrez-Martínez NR, Aguilar-Ávila J, Aguilar-Gallegos N, Sagarnaga-Villegas LM
- 11:45-12:15 Pausa café
- 12:15-13:00 **Ponencia: "Ganadería de precisión en una cunicultura sin jaulas".**
Dña. María Cambra. Universitat Politècnica de València (UPV).
Presenta: D. Ceferino Torres
- 13:00-14:00 **Comunicaciones libres: NUTRICIÓN**
Modera: D. Enrique Blas
- Uso de ácidos orgánicos en dietas de gazapos post-destete: Elección de acidificante y dosis.**
Ramón-Moragues A, Vaggi C, Franch J, Martínez-Paredes E, Peixoto-Gonçalves C, Ródenas L, Lopez MC, Marín-García PJ, Blas E, Pascual JJ, Cambra-López M
- Entrenamiento de las conejas durante la recría: efecto sobre la flexibilidad de las reservas corporales y la reproducción a largo plazo.**
Pascual JJ, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Blas E, Cambra-López M

Efecto del nivel de calcio del pienso sobre los rendimientos productivos de los gazapos en crecimiento.

de la Cruz P, del Pozo R, Martín L, Rybicka A, Velasco B, Nicodemus N, García J

Efecto de la inclusión de productos de algas sobre la digestibilidad fecal y otros parámetros digestivos en gazapos en crecimiento.

Alfonzo R, Pérez E, Al-Soufi S, de la Cruz P, Silva V, Martín L, del Pozo R, Rybicka A, Buján M, Domínguez H, Torres MD, López-Alonso M, Nicodemus N, García J

14:00-15:45 Comida de trabajo

TARDE

16:00-17:00 Comunicaciones libres: REPRODUCCIÓN

Modera: Dña. Mariluz García

Efecto del factor de crecimiento nervioso recombinante de conejo microencapsulado con quitosano en los parámetros seminales de conejo.

Gimeno-Martos S, Quiroga AC, Bosa L, Arias Álvarez M, Lorenzo PL, García-García RM, Rebolgar PG

Métodos de bioestimulación basados en comunicación química: implicación en la reproducción de conejos macho. Estudio preliminar.

Villamayor PR, Yáñez U, Gullón J, Pampín M, Casanova A, Cavalcanti I, Zarhouti A, Quintela LA, Sánchez-Quinteiro P

Efectos de la frecuencia de recogida y de la adición de alarelina a la dosis seminal en la calidad espermática. Estudio preliminar.

Yáñez U, Villamayor PR, Gullón J, Pampín M, Casanova A, Zarhouti A, Cavalcanti I, Peña AI, Quintela LA, Sánchez-Quinteiro P

Crecimiento de hembras cruzadas y su efecto sobre la reproducción.

Domingues V, Sánchez C, Arias JM, Pascual JJ

17:00-17:30 Pausa café

17:30-19:00 Mesa redonda: "Consecuencias de la nueva legislación veterinaria".

D. Manuel Marco. Asociación de Veterinarios Especializados en Cunicultura (AVECU).

Dña. Beatriz Messía. Organización Interprofesional para Impulsar el Sector Cunicola (INTERCUN).

Dña. Gema López Orozco. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

Modera: D. Mario Malo

21:00-24:00 Cena de gala. Hotel Infantas de León

Jueves 1 de Junio

9:00-10:00 Asamblea General de ASESCU

10:00-11:15 Sesión monográfica: "Mapa de las estafilococias en España".

Modera: D. Juan Manuel Corpa.

10:00-10:30 Ponencia: **Staphylococcus aureus en cunicultura. Nuevos retos, nuevas herramientas.**

David Viana. Universidad Cardenal Herrera-CEU.

- 10:30-11:00 Comunicaciones sobre *Staphylococcus aureus*
- Distribución actual de los principales clones de *Staphylococcus aureus* en cunicultura en España.**
Martínez-Seijas C, Mascarós-Núñez P, Díaz-Mendez JF, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM
- Estudio genotípico y fenotípico de la sensibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* en conejos.** *Mascarós P, Martínez-Seijas C, Díaz-Mendez JF, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM*
- Análisis de comparativa genómica de clones de *Staphylococcus aureus* en cunicultura: CC121 versus CC96.**
Díaz-Méndez JF, Martínez-Seijas C, Mascarós P, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM
- 10:50- 11:15 Debate
- 11:15-11:45 Pausa café
- 11:45-12:45 Comunicaciones libres: PATOLOGÍA Y BIENESTAR
- Modera: Dña. Arantxa Villagrà
- Desarrollo de un ELISA indirecto basado en proteínas virales recombinantes para la detección de anticuerpos frente al virus mixoma.**
Calonge Sanz I, Menéndez A, Álvarez AL, Martín Alonso JM, P. Dalton KP, Parra F
- Estudio de factores de virulencia de *Escherichia coli* asociados a procesos digestivos en cunicultura.**
Sanz C, Arnal JL, Chacón G, Fernández AB
- Evaluación del estrés con termografía de infrarrojos tras la extracción espermática en conejos.**
Serrano-Jara D, Baeza M, Agea I, Argente MJ, García ML
- Enriquecimiento de jaulas de gazapos en cebo con ramas de árbol: resultados productivos y de interacción humano-animal.**
Resconi VC, López M, Olleta JL, Romero J, Campo MM
- 12:45-13:30 **Mesa redonda: "Rentabilidad en las explotaciones cunícolas".**
- D. Julián Gullón.** Cogal
- D. Rodrigo Cuadriello.** Hermi
- D. Ze Manuel.** Veterinario
- Modera: D. Ernesto Gómez
- 13:30-14:00 Clausura del Symposium

POSTERS:

- Comparación de la aceptación y preferencia de salchichas frescas de carne de conejo, pollo y cerdo en un panel de consumidores jóvenes.**
Fierro-Raya M, González-Redondo P
- Diagnóstico ante-mortem y no invasivo de RHDV en conejos asintomáticos mediante el uso de qPCR y FTA cards.**
Sánchez A, Aluart A, Gascón S, Mora FX; Valls, L
- Forraje verde hidropónico de maíz (*Zea mays*) como suplemento alimenticio sobre los parámetros productivos del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en la etapa de engorde.**
Durán-García M, Caridad-del Rosario J

ÍNDICE

Presentación del Presidente de ASESCU	5
Programa del Symposium	7

PONENCIAS

Pasado y futuro de la cunicultura en León Rosell J.....	16
---	----

Presente y futuro de la Cunicultura en Castilla y León (Breve Manual de Supervivencia) González FJ.....	21
---	----

Ganadería de precisión en una cunicultura sin jaulas Cambra-López M.....	26
--	----

<i>Staphylococcus aureus</i> en cunicultura. Nuevos retos, nuevas herramientas Viana D, Arnau-Bonachera A, Mascarós P, Martínez-Seijas C, Díaz-Mendez JF, Selva L, Corpa JM.....	34
--	----

Sesión de GENÉTICA

Tendencias Genéticas en Tres Líneas de Conejo Seleccionadas por Eficiencia Alimentaria Sánchez J P, Pascual M, Piles M.....	42
---	----

Creación de una línea seleccionada por eficiencia alimentaria. 1. Criterios de selección Blasco A, Martínez-Álvaro M.....	46
---	----

Evaluación de la calidad espermática en líneas de conejo seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada
 Baeza M, Serrano D, Argente MJ, García ML 51

Sesión de SOSTENIBILIDAD

Caracterización de la Cunicultura como un Sistema Agroalimentario Sostenible: revisión sistemática
 Manjarrez-Martínez NR, Aguilar-Ávila J, Aguilar-Gallegos N, Sagarnaga-Villegas LM 56

Sesión de NUTRICIÓN

Uso de ácidos orgánicos en gazapos post-destete: Elección de acidificante y dosis
 Ramón-Moragues A, Vaggi C, Franch J, Martínez-Paredes E, Peixoto-Gonçalves C, Ródenas L, López MC, Marín-García PJ, Blas E, Pascual JJ, Cambra-López M..... 62

Entrenamiento de las conejas durante la recría: efecto sobre la flexibilidad de las reservas corporales y la reproducción a largo plazo
 Pascual JJ, Martínez-Paredes E, Ródenas L, Blas E, Cambra-López M 67

Efecto del nivel de calcio sobre los rendimientos productivos de gazapos en crecimiento
 de la Cruz P, del Pozo R, Martín L, Rybicka A, Velasco B, Nicodemus N, García J..... 72

Efecto de la inclusión de productos de algas sobre la digestibilidad fecal y otros parámetros digestivos en gazapos en crecimiento.
 Alfonso R, Pérez E, Al-Soufi S, de la Cruz P, Silva V, Martín L, del Pozo R, Rybicka A, Buján M, Domínguez H, Torres MD, López-Alonso M, Nicodemus N, García J 77

Relaciones entre el crecimiento y la eficiencia alimentaria con los caracteres de comportamiento alimentario e indicadores de posición social de gazapos.
 Piles M, Mora M, Tusell L, Pascual M, Sánchez JP 82

Forraje verde hidropónico de maíz (*Zea mays*) como suplemento alimenticio sobre los parámetros productivos del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en la etapa de engorde.
 Durán-García M, Caridad-del Rosario J 86

Sesión de REPRODUCCIÓN

Efecto del factor de crecimiento nervioso recombinante de conejo microencapsulado con quitosano en los parámetros seminales de conejo
 Gimeno-Martos S., Quiroga AC, Bosa L, Arias Álvarez M, Lorenzo PL, García-García RM, Rebollar PG. 92

Métodos de bioestimulación basados en comunicación química: implicación en la reproducción de conejos macho. Estudio preliminar.

Villamayor PR, Yáñez U, Gullón J, Pampín M, Casanova A, Cavalcanti I, Zarhouti A, Quintela LA, Sánchez-Quinteiro P 97

Efectos de la frecuencia de recogida y de la adición de alarelina a la dosis seminal en la calidad espermática. Estudio preliminar.

Yáñez U, Villamayor PR, Gullón J, Pampín M, Casanova A, Zarhouti A, Cavalcanti I, Peña AI, Quintela LA, Sánchez-Quinteiro P 102

Crecimiento de hembras cruzadas y su efecto sobre la reproducción

Domingues V, Sánchez C, Arias JM, Pascual JJ 107

Sesión de PATOLOGÍA

Distribución actual de los principales clones de *Staphylococcus aureus* en cunicultura en España

Martínez-Seijas C, Mascarós P, Díaz-Méndez JF, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM 114

Estudio genotípico y fenotípico de la sensibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* en conejos

Mascarós P, Martínez-Seijas C, Díaz-Méndez JF, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM 118

Análisis de comparativa genómica de clones de *Staphylococcus aureus* en cunicultura: CC121 versus CC96

Díaz-Méndez JF, Martínez-Seijas C, Mascarós P, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM 123

Desarrollo de un ELISA indirecto basado en proteínas virales recombinantes para la detección de anticuerpos frente al virus mixoma.

Calonge-Sanz I, Menéndez A, Álvarez AL, Alonso JM, Dalton KP, Parra F 128

Estudio de factores de virulencia de *Escherichia coli* asociados a procesos digestivos en cunicultura

Sanz C, Arnal JL, Chacón G, Fernández AB 132

Diagnóstico ante-mortem y no invasivo de RHDV en conejos asintomáticos mediante el uso de qPCR y FTA cards

Sánchez A, Aluart A, Gascón S, Mora FX, Valls L 136

Sesión de BIENESTAR

Evaluación del estrés con termografía de infrarrojos tras la extracción espermática en conejos

Serrano-Jara D, Baeza M, Agea I, Argente MJ, García ML 140

Enriquecimiento de jaulas de gazapos en cebo con rama de árbol: resultados productivos y de interacción humano-animal

Resconi VC, López M, Olleta JL, Romero JV, Campo MM 145

Sesión de PRODUCTOS

Comparación de la aceptación y preferencia de salchichas frescas de carne de conejo, pollo y cerdo en un panel de consumidores jóvenes

Fierro-Raya M, González-Redondo P 152

PONENCIAS

Pasado y futuro de la cunicultura en León

Rosell J

Presente y futuro de la cunicultura en Castilla y León (Breve Manual de Supervivencia)

González FJ

Ganadería de precisión en una cunicultura sin jaulas

Cambra-López M

***Staphylococcus aureus* en cunicultura. Nuevos retos, nuevas herramientas**

Viana D, Arnau-Bonachera A, Mascarós P, Martínez-Seijas C, Díaz-Mendez JF, Selva L, Corpa JM

“Pasado y futuro de la Cunicultura en León. Mis estudios de Veterinaria en León, entre los cursos 1973-74 y 2022-2023 y algunos vínculos con la Cunicultura”

“Past and future of rabbit farming in León. My studies of Veterinary Medicine in León, between the courses 1973-74 and 2022-2023 and some links with rabbit production”

Juan Rosell, Doctor en Veterinaria

CunivetService Aptdo. 518. 43080 Tarragona. www.biorabbit.es. jmrosell@cunivetservice.com

Resumen

Estas notas retrospectivas tienen como objetivo compartir con lectores y asistentes al 47 simposio de ASESCU, vivencias relacionadas con granjas de conejos, desde que vine a León en octubre de 1973, para iniciar mis estudios de Veterinaria; hasta ahora, que los estoy terminando. Muestro los datos de algunas observaciones hechas en 1714 granjas visitadas, de las cuales 198 estaban en Castilla y León, desde 1988 hasta 2018. Son los resultados de muestreos de conejos reproductores, de algunas enfermedades y factores de riesgo, que estudiamos en colaboración con profesores de la Facultad de Veterinaria de León y otros centros. En 2009 mostré mi gratitud a los productores de conejos de modo parecido, en el simposio de Sevilla. Espero que estas reflexiones sirvan de introducción a sugerencias de futuro para las personas relacionadas con la Cunicultura.

Palabras clave: Cunicultura, Veterinaria, Castilla y León, Compartir experiencias, 1973-2023

Abstract

These retrospective notes are intended to share with readers and attendees of the 47th ASESCU symposium, experiences related to rabbit farms, since I came to León in October 1973, to begin my studies of Veterinary Medicine; until now, that I am finishing them. I show data from some observations in 1714 visited farms, of which 198 were in Castile and León, from 1988 to 2018. They are the results of sampling rabbits, of diseases and risk factors, which we studied in collaboration with professors from the Veterinary School of León and other centres. In 2009 I showed my gratitude to rabbit producers in a similar way, at the symposium in Sevilla. I hope these reflections serve as an introduction to suggestions for the future for people related to rabbit farming.

Keywords: Rabbit production, Veterinary Medicine, Castile and Leon, Share experiences, 1973-2023

Introducción

Acerca de esta ponencia, acordé con los miembros de la Asociación Española de Cunicultura/ ASESCU que organizan este 47 simposio, que me referiría a algunos años precedentes. Mostraré mi perspectiva con algunos flashes, desde que vine a León en octubre de 1973, para iniciar mis estudios de Veterinaria; hasta ahora, que los estoy terminando. Estuve 10 años en Castilla, -primero León y después Madrid-, hasta 1983. Mi expediente académico fue después hasta Zaragoza, donde obtuve el doctorado en Veterinaria, en julio de 1990. A partir de entonces, mi relación con Castilla y León ha sido frecuente, porque he subido desde Tarragona cada 3-4 semanas.

En León compaginé mis estudios -apenas falté a clases-, con el trabajo con conejos. Visité granjas siendo estudiante, así como algún matadero (Miralrío, en Ponferrada). Santos Martas, distribuidor de piensos Gallina Blanca Purina (e.p.d.) en la antigua Avenida de Madrid de León, me recomendó algunas granjas, donde pasé horas

de práctica (Currín en Villaobispo, Pedro en Villimer, Amadeo en Trobajo del Cerecedo, Rodrigo en Arintedo, Valeriano en Cacabelos o José Antonio y Modesto en Petín de Valdeorras, entre otros). En las primeras granjas trabajé en tareas comunes: cuidar, limpieza, vacunaciones, entre otras. También hice algunas actividades extra: en 1975, Currín me pidió que observara la relación de las montas y la fertilidad con las fases lunares, ¡jale! El verano de 1977 trabajé en la granja de Feliciano e Inés, colaboradores de Gómez y Crespo en Castro de Beiro (OU) y también en la granja de los Freixer, en St. Quirze de Besora (Bcn). Durante 4 años recorrí tortuosas carreteras con la motocicleta Sanglas-400. Influido por las nevadas, mi padre me cambió con buen criterio al primer *Renault 4 L*, en el que además podía cargar algún saco de pienso o de viruta. En invierno del 78 fui al Principado de Asturias, donde colaboré en un proyecto que no progresó, aunque eso me permitió conocer unos productores de San Juan de la Arena que tenían Gigante de España. Un año más tarde me ayudaron con conejos, para la exposición en el simposio de ASESCU, en la *Escuela de Agricultores de León*.

En este punto me referiré a José Luis Argüello (e.p.d.). Cuando yo empecé a estudiar, él acababa la carrera y entró a trabajar como microbiólogo en la industria. Argüello era también apasionado por los conejos y congeniamos enseguida. En 1975 empecé a colaborar con él y su jefe, Félix Rejas, en mixomatosis; ellos con vacunas y yo en granjas. En 1978 me incluyeron en una comunicación para el tercer simposio ASESCU, en Valencia. Al año siguiente, me apunté con ellos a organizar el 4º simposio en León, siendo estudiante. Invitamos a un profesor de Enfermedades Infecciosas (Máximo Fernández) y otro de Reproducción y Obstetricia (Miguel Abad), que defendieron el pabellón frente leves envites de algún productor. Recuerdo que al final del simposio estaba agotado; a pesar de que los asistentes al simposio comimos bien, incluido un *almuerzo minero*, en un antiguo restaurante, en la ctra. de circunvalación.

José Luis Argüello me enseñó a palpar para el diagnóstico de gestación, en la granja de la que era copropietario en Villimer. Me dijo que aprendería con la práctica, claro. Así ha sido; por ejemplo, palpé 17.000 conejas en 142 granjas durante 2014-2019, para un estudio sobre *Enfermedades de la reproducción en conejas de granja*. Lo publicamos en *Animals* (2020), junto con 2 profesores de la facultad de Veterinaria de León (Luis Fernando de la Fuente y Maite Carbajo), además de Chema Fernández, clínico gallego. En las conejas que palpé a 14-15 días post-inseminación fallé poco, pero a 9-10 días los errores subieron al 7,3%. Este artículo está escrito en inglés, por una estimada traductora afincada en León: Cathy R. Martin. Les sintetizo algunos aspectos de ese trabajo. El porcentaje de gestaciones en 190.000 conejas palpadas por cunicultores fue 85,5% en los 6 años. Menos del 70-75% de positivas (conejas cruzadas) es un problema (infertilidad). En 1994 el porcentaje de granjas que usaban inseminación artificial /IA fue el 2% y al final del estudio (2019) la tasa era 90% de granjas con IA. En el 70% de las granjas visitadas, inseminaban a 11 d. postparto. ¿Qué conejas quedaban más preñadas? Las que tenían leve sobrepeso; en nuestro caso, con estado corporal /EC de 6 sobre 9, siendo 5 el EC óptimo. En las de 4/9 la fertilidad bajó. Siguiendo con las evidencias observadas, cuando el ritmo empleado es de 11, 18 ó 25 días, la fertilidad no varía. Pero a 32, 39, 46 ó 60 días postparto, la fertilidad mejora.

La relación entre el estado sanitario, el peso y el estado corporal de conejos machos y hembras, la estudiamos con dos profesores de León: Juan Pablo Sánchez, actualmente en el IRTA y con Luis Fernando de la Fuente. Fernando es el amigo que desde 1988 pone orden a mis datos, mediante los métodos de análisis y el rigor adecuados. Evaluamos 34 tipos genéticos de conejos que había en España, desde 2009 hasta 2011. Publicamos el estudio en dos números del *Journal of Animal Science* de 2012. Hay diferencias de peso notables entre estirpes, con diversas capacidades de ingestión de pienso y también con distinta predisposición a enfermedades, entre otras características. También medimos el efecto de las rinitis, mastitis, pododermatitis y sarna, sobre el peso y estado corporal. Son aspectos clave, que incluyo en las prácticas de *clínica ambulante* con alumnos; en las granjas les muestro la diferencia entre observar la región dorso-lumbar de las conejas y evaluarla tocando, que es la forma correcta, claro es.

Volviendo a José Luis Argüello, él era sobre todo bacteriólogo y virólogo. Supongo que hizo algo de daño a los conejos; probablemente menos que yo. También sé que hizo bien; por ejemplo, con la mejor herramienta que hay contra las enfermedades infecciosas: las vacunas. Diseñó -él y su equipo, debemos entender-, diversas vacunas, contra procesos bacterianos del aparato respiratorio o digestivo de los conejos, así como autovacunas. Pero donde se dejó las pestañas fue con las víricas. En 1977 lanzaron una *vacuna heteróloga* contra mixomatosis, elaborada con virus de Shope, más adyuvantes de inmunidad y en 1985 otra elaborada con virus homólogo, con la cepa León-162. En octubre de 1988, cuando volví del congreso mundial de Budapest, le conté lo que el Dr. Xu Weiyan y col. explicaron de la enfermedad hemorrágica que azotaba China. Yo la había vivido en una granja de Asturias el 11 de septiembre de 1988 (murieron el 98,2% de las hembras). Argüello y su equipo habían recibido casos desde junio, procedentes de Asturias y de Murcia. El día de Navidad del 88 su mujer me dijo que estaba en

el laboratorio. En enero del 89 sacaron vacuna contra *la vírica*, bajo la tutela sanitaria del Ministerio de Agricultura y las CCAA. En 2011 apareció el nuevo calicivirus; José Luis intervino de nuevo, con vacuna contra este virus, en 2013. Cuando falleció en 2018, trabajaba en vacuna mixta. El virus nuevo se ha impuesto en los análisis de casos de vírica. No obstante, para excluir la presencia del virus clásico en España, es necesario hacer muestreos apropiados; lo demás es marketing y demagogia, ¿me explico?

Sigo con la actividad hecha en granjas de conejos. Entre 1988 y 2018 visité 1714 granjas españolas, incluidas 198 en Castilla y León; más de las que hay en la actualidad (tal vez, 150). Debo decir que en esta región "visitamos" desde 1988 hasta final de 2009, cuando *reorganizaron* mi antigua empresa, porque compartí jornadas estupendas con Andrés, Óscar, Francisco Javier y al final con Gustavo. A partir de 2010 me apoyé en otros compañeros. También conocí algunas granjas en CCAA vecinas, como Galicia (184), País Vasco (32) o Cantabria (31). En Asturias visité 49 granjas en aquellos 30 años. Según Javier Rodríguez (*Boletín de Cunicultura* n° 83, 1996), en 1995 había 80 granjas, aparte de las unidades familiares. ¿Cuántas quedan en el Principado? ¡Ninguna! Esto no es motivo de satisfacción, me parece a mí. En mi trabajo, confié más en mis cuadernos de notas que en la memoria. Hice bases de datos y los estudiamos con el apoyo de profesores de esta Universidad o de otros centros. Mi interés por ambos aspectos, la vida en las granjas y el estudio de algunos problemas, es evidente que incluye lo más interesante en la mayoría de casos: los cunicultores e investigadores, que he conocido en estos 50 años; sin olvidar aspectos socio-culturales y geográficos.

En el 76 me sorprendió encontrar gazapos lactantes cubiertos de granos. Llevé muestras a Argüello, incluso al Depto. de Microbiología, donde me permitían hacer ensayos con estafilococos. Fui también al Laboratorio de Sanidad Animal de León; allí me atendía un veterinario, Leoncio González, que además tenía granja de conejos. En el simposio de Toledo en 1983, presentamos una comunicación al respecto de las mastitis y los granos en gazapos. Tardé algunos años en retomar el problema de las pústulas y demás lesiones por estafilococos, pensando en mi posible trabajo de tesis doctoral, sobre *Enfermedades de los gazapos lactantes*. En la actualidad es un problema destacado en la sanidad de los conejos; es objeto de estudio en Universidades (por ejemplo, en España, el CEU de Valencia) y el trabajo en otros centros (Exopol, por ejemplo). En este simposio se presentan algunos resultados.

En 2013 publicamos un estudio retrospectivo sobre "mal de patas", hecho durante las visitas a 600 granjas españolas y portuguesas, desde 2001 hasta 2012. A partir del examen de 100.000 conejas, fuera de sus alojamientos individuales, concluimos que el 6-7% de hembras con heridas en las patas, era una tasa de enfermas tolerable. Gracias al uso de reposapatas, en el curso de esos años la ocurrencia del problema disminuyó. Es evidente que su uso requiere esfuerzo en limpieza y tener que cambiar los reposapatas gastados. Les recuerdo lo que dicen en León: "el que algo quiere, algo le cuesta".

En 2018 terminamos otro estudio, acerca de las mastitis, en plural. Varían en su evolución, aguda y mortal o crónica, o en la etiología. Desde 2001 hasta 2017 exploramos 140.000 hembras. La ocurrencia de enfermas fue variable, entre el 0 y 36%; pero sugerimos que el 4% es una tasa de afectadas con mastitis crónica, que nos parece tolerable. A este respecto, les recuerdo que el 85% de enfermas tiene una sección glandular afectada, de las 10-12 que tiene la coneja. Las enfermas deben ser desechadas de la producción, para evitar sufrimiento, contagios y merma en la producción. En este trabajo vimos que en el 70% de las granjas visitadas se aplicaba antibiótico inyectable con ocasión de los partos; es un motivo por el que pocas conejas van a consumo.

Las enfermedades del aparato digestivo pesan enormemente en la salud de los conejos, en la economía de las granjas y en el estado anímico de las personas, sobre todo de los cunicultores; los demás no hemos sido ajenos al desánimo. En el último trabajo aceptado para publicar (*World Rabbit Science /WRS*, tal vez en junio de 2023): *Enfermedades del aparato respiratorio en conejos de granja*, explico que desde 1996 hasta 2020 hice 1841 visitas a causa de problemas digestivos. Luego, hicimos (a menudo, en compañía de colegas) 654 visitas por mixomatosis, 307 por respiratorio, 291 por RHD, 125 por salmonelosis o 58 por toxicosis, entre otras. El último caso de intoxicación grave fue por lincomicina a dosis elevada en pienso de conejas, en 2021; lo publicamos en el *WRS*, en 2022, con compañeros clínicos y con profesores de la Autónoma de Barcelona. No obstante, más del 50% de las visitas a granjas fueron de chequeo o revisión, sin problemas relevantes.

Es evidente que las granjas de conejos son poblaciones grandes. Los conejos viven deprisa, y no son animales más delicados que los cerdos-, como explicó F. Lebas, investigador del INRA en 2000, en el libro *Enfermedades del Conejo*. Su sitio Web es recomendable: www.cuniculture.info. Por otro lado, la mayoría de granjas siguen ritmo de trabajo fuerte, con servicio a 11 días postparto. Conozco un contrapunto que es sorprendente: visito a

unos productores que hace más de 2 años inseminan 1600 conejas en banda única, a 100 días postparto. Es una pareja con hijos mayores, que además de ganarse la vida (me muestran sus resultados), han incluido un término no imprescindible en Cunicultura, pero muy valioso: *ahora son más felices*. Alguna vez me comentaron: "*Hace 40 años nos decías que llevar las conejas al macho en la semana posterior al parto, era una barbaridad*"; bueno, en estos años ellos trabajaron a postparto, a 11 días, 25, 60 y ahora 100 días postparto. He examinado las hembras que tuvieron en los 40 años, he compartido sus dificultades y he conocido su evolución; favorable, claro.

Vuelvo al hilo de la población. Si una granja tiene 1000 hembras inseminadas, puede haber 850 paridas, con 9 gazapos por nido, además de 7000 gazapos destetados, de la banda anterior. Es el tamaño medio y parecido al de las granjas que visito en España. En todo el territorio nacional hay menos granjas de las que había en el pasado; pero con más conejas por granja (a excepción de la mayor que existió a finales de los años 90, con más de 35.000 conejas, -ya desaparecida-, en Castilla la Mancha). Para trabajar con estas poblaciones, los veterinarios nos apoyamos en una disciplina -la Epidemiología-, que incluye los factores de riesgo de enfermedades en las granjas. En ocasiones, el riesgo está vinculado a los conejos (la raza o estirpe, el género, la edad, estado fisiológico, entre otros) y les predispone a la aparición de enfermedades. Además, hay factores de riesgo externos a los conejos, que las favorecen; como la época del año, el alojamiento o el manejo (alimentario, reproductivo, sanitario), entre otros. A esto hemos dedicado el estudio de nuestra práctica clínica en granjas de conejos y las publicaciones. Por cierto, la calle donde se celebra el simposio se llama *Profesor Pedro Cármenes*. Él me introdujo en esta disciplina; lo hizo bien, porque no ha dejado de entusiasmarme.

En cuanto al "mal de patas", es evidente que el principal factor de riesgo es el peso de los conejos de producción (4-6 kg), además del alojamiento. A veces hay cepas de estafilococos muy virulentas y lo empeoran. Si cada hembra tiene reposapatas, la ocurrencia del problema es baja. Actualmente, casi el 90% de los productores los usan. Aunque las hembras jóvenes en recría y las gestantes sin gazapos, con frecuencia están en alojamientos mejorables. Además, algunas conejas con cría están algo estrechas (40 cm). Los demás alojamientos no me desagradan. Recuerdo que en los años 70 y primeros de los 80 hubo productores, como Josep Terrades o Ernest Santamans, que tenían parques para gazapos (2 x 1 m); pero con malla de metal en el suelo. Tuvieron tantos problemas que los redujeron a alojamientos para 7-8 gazapos. Queda dicho.

En relación con las mastitis, a partir de datos de visitas a 500 granjas durante 18 años, lo más destacado fue la influencia de la estirpe de conejos sobre la tasa de enfermas. En cuanto a la reproducción de las conejas, el efecto de la salud (por ejemplo, del digestivo), el estado corporal o el ritmo reproductivo, sobre la fertilidad, fue evidente. En el siguiente estudio a punto de ser publicado, sobre el respiratorio, también encontramos hechos interesantes. Desde 1986 hasta 2020, la tasa de conejas con rinitis (290.000 examinadas individualmente) disminuyó desde el 44 % hasta el 15%. El progreso fue por la profesionalidad de los productores. Además, está aceptado que en nuestra latitud, en verano hay más problemas respiratorios. Asimismo, el efecto de la estirpe es claro; a este respecto, no es de extrañar que haya científicos que dediquen esfuerzo a conseguir estirpes resistentes a la pasteurellosis, entre otras enfermedades. También en el respiratorio encontramos otro resultado de gran interés; a medida que las conejas son servidas a ritmos más extensivos, la tasa de enfermas disminuye. Cuando se conocen factores de riesgo y se controlan, se previenen enfermedades. En suma, si los conejos enferman menos, la frecuencia de tratamientos disminuye, ¿no es así?

He pasado de puntillas por los problemas más comunes, los del aparato digestivo, -ya me disculparán-, pero me planto un poco en mixomatosis y enfermedad hemorrágica vírica. Son causas de visitas muy destacadas, por la cantidad de granjas y conejos afectados y por el daño que soportan los enfermos, con el peor balance cuando nos referimos a Bienestar Animal: la muerte. Son otros de los problemas duros de soportar para las personas. Me he referido antes a las mixomatosis, también en plural; así les recuerdo que hay varias formas de esta enfermedad. ¿Cuáles son las acciones básicas para su control? ¿Las relacionadas con vacunas? Según mi experiencia, ¡no! La eliminación de enfermos y sospechosos es nuclear, más la limpieza y desinfección de los alojamientos; después, la vacunación, es evidente. Es una tarea clave, difícil de hacer bien con el ritmo reproductivo intenso. Pensar en las vacunas solo dos veces al año es arriesgado. Si ustedes trabajan a 11 días posparto, mejor planificarlo para vacunar cada 42 días, a las que toque; y además, tener tiempo de aclarar dudas.

Sigo con *mixo* y *vírica*. En 2019 publicamos un resumen de 30 años de observaciones. Estas enfermedades pueden entrar a las granjas en cualquier época. La vacunación de conejos en riesgo debe ser constante, además de la Bioseguridad, como sugiero en https://racve.es/files/2020/11/BIOSEG.GRANJ_.CONE_.RACVE_.Rosell.19.Oct_.2020.pdf. Las mixomatosis son más frecuentes desde agosto hasta abril. La *vírica* por el nuevo calicivirus también es peligrosa todo el año, pero con mayor ocurrencia desde marzo hasta agosto. Ayudo en

la identificación de casos de *mixo* con textos y sobre todo con imágenes; a tal fin, ¡cuánto han servido los teléfonos para enviarlas y comunicarnos! Mientras pueda, no dejaré de hacer este esfuerzo, que iniciamos en 1983, poco después de los primeros focos de *mixo atípica*. De forma parecida, en el artículo de 2019 (*Myxomatosis and RHD*) indico que hicimos 1400 necropsias de casos compatibles con el nuevo calicivirus de la *vírca*; solo el 18,6% de los cadáveres tenían secreción serosanguinolenta en el hocico. En una granja puede haber conejas muertas con sangre en el morro, debido a mastitis aguda, neumonía bacteriana o *vírca* (también *mixo*), incluso por clostridiosis. Esto lo aprendí en esta facultad y hoy se lo recuerdo a ustedes.

José Luis decía que con 60 años entre personas no se consideraba médico; yo tampoco. Los productores de conejos tienen habilidad para detectar párpados inflamados por *mixomatosis* y más cosas, qué duda cabe. Pero los veterinarios tenemos más práctica con el diagnóstico, incluidos los errores; me parece que esto no necesita discusión. Mi presentación en este segundo simposio de ASESCU en León tenía como *objetivo*: servir a modo de introducción sobre el futuro. Es importante saber dónde está el Norte, claro; pero en mi opinión es clave recordar por dónde hemos pasado. He aprovechado esta excusa, para cubrir *otros objetivos*; por ejemplo, recordar personas que me ayudaron y, es evidente, reconocer de nuevo a los cunicultores que nos hayan abierto las puertas de sus granjas. Por ello, he querido compartir algunos resultados de estudios efectuados con investigadores de la Universidad de León y de otros centros. Además, porque son datos de sus granjas; por cierto, siempre procuramos mantener la confidencialidad. También es una ocasión excelente, para agradecer a los cunicultores que permiten que los alumnos de Veterinaria trabajen unos días con ellos o les visitemos con ocasión de las prácticas de *clínica ambulante*. El beneficio de esta generosidad es mutuo, creo yo.

Presente y futuro de la cunicultura en Castilla y León (Breve Manual de Supervivencia)

Francisco Javier González González

Veterinario STC Cunicultura Nanta SAU. j.gonzalez@nutreco.com - www.nanta.es

RESUMEN

En este pequeño trabajo tratamos de, partiendo de una "foto-fija", que es la situación actual de la cunicultura en Castilla y León dentro de España, y teniendo en consideración los procesos legislativos que ya están afectando al sector cunícola y que se prevé aparezcan en un futuro próximo, tratar de dar unas pinceladas sobre las posibles vías de supervivencia y desarrollo para las granjas cunícolas en el corto-medio plazo.

Abstract

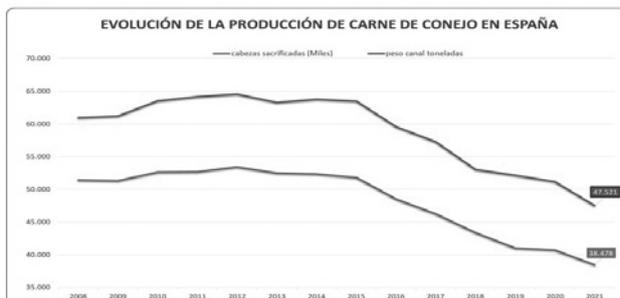
In this short work, we try to start from a "still photo", which is the current situation of rabbit farming in Castilla y León within Spain, and taking into account the legislative processes that are already affecting the rabbit sector and that are expected to appear in the near future, to try to give some brushstrokes on the possible ways of survival and development for rabbit farms in the short-medium term.

INTRODUCCIÓN

Empecemos con los números puros y duros.

En España ha habido una clara disminución del censo de conejos en los últimos años, tanto en el número de explotaciones como en el de cabezas de ganado. Esta disminución no ha afectado por igual a todas las regiones. Actualmente Castilla y León (CyL), ha pasado de ser la tercera región tras Cataluña y Galicia en el año 2015, a ser la primera en censo, que no en número de explotaciones, lo que indica que en CyL el tamaño de las granjas es mayor. Asimismo, en los últimos 10 años, en CyL, al igual que el resto de las CCAA, han desaparecido muchas granjas antiguas, pero en el caso de CyL se han sustituido por instalaciones de mayor tamaño y más modernas lo que ha incrementado significativamente el censo. Todo esto queda patente en las siguientes gráficas que aparecen en el Informe publicado por la Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, en agosto del 2022, "El sector cunícola en cifras. Principales Indicadores económicos".

Gráfica 1: Evolución producción carne de conejo. España 2008-2021



Gráfica 2: Censo por CCAA 2015



Gráfica 3: Censo por CCAA 2021



Gráfica 4: Número total de explotaciones cunícolas por CCAA – 2022

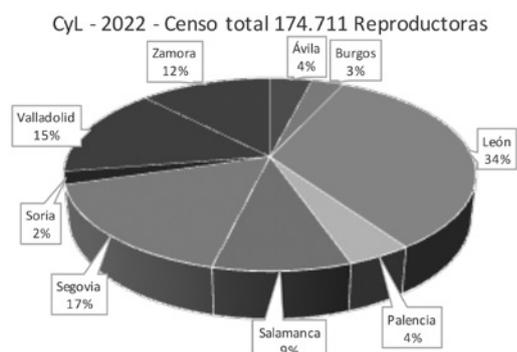


Tabla 1: Censos ganaderos Dirección General de Producción Agropecuaria. Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural

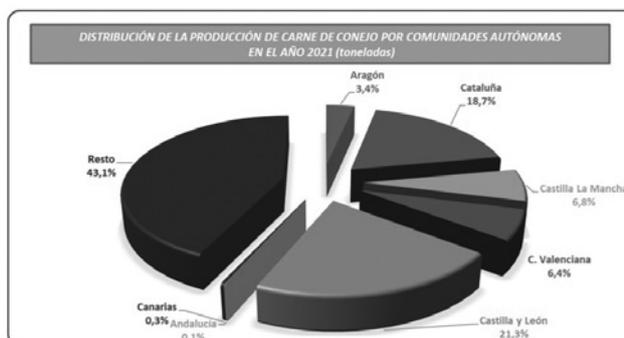
	AVILA	BURGOS	LEON	PALENCIA	SALAMANCA	SEGOVIA	SORIA	VALLADOLID	ZAMORA	TOTAL CYL
2020	6.995	5.613	60.808	7.905	16.004	25.287	2.899	26.009	23.235	174.756
2021	7.178	5.365	59.975	7.774	16.299	24.891	3.610	26.154	22.220	173.466
2022	7.259	5.261	60.182	7.561	16.149	27.040	3.774	26.362	21.122	174.711
2023	7.062	5.191	58.274	7.488	15.898	28.088	3.771	26.358	21.440	173.569

Junta de Castilla y León. Datos 2023: enero-febrero.

Gráfica 5. Censo CyL por provincias



Gráfica 6: Producción de carne de conejo por CCAA- 2021



En CyL hay aproximadamente 174.000 reproductoras según las estadísticas oficiales, cifra que se mantiene de forma muy estable al menos desde el año 2020. También los censos se mantienen muy constantes por provincias.

Por provincias, León es, con diferencia, la que más censo alberga (34-35%), seguida de Segovia (16%), Valladolid (15%) y Zamora (13%). Las demás provincias están por debajo del 10%.

Probablemente este censo tan constante que, al contrario de en otras CCAA, no ha disminuido en los últimos años, se debe a que en Valladolid está el mayor matadero de conejos de España, lo que hace pivotar a su alrededor un buen número de granjas.

En cuanto a los modelos productivos en CyL, van desde las granjas completamente libres a la integración total. Entre ambos modelos hay otros con diferentes grados de verticalización que implican en mayor o menor medida, además de al matadero, al centro de IA, a la granja de selección-multiplicación, fabricante de pienso, etc. Está claro que la tendencia ha sido y es, ir a modelos cada vez más verticales en los que, por economía de escala, homogenización de instalaciones y modelos productivos, de genética, semen, etc., se puedan reducir los costes de producción con el fin de poner en el mercado carne de conejo a un precio más competitivo.

Profundizando un poco más en las “luces y sombras” pasadas y futuras, destacamos los siguientes puntos:

- **PRAN (Plan Nacional Resistencia Antibióticos):** Los veterinarios especialistas en cunicultura pertenecientes a AVECU suscribimos en su día un acuerdo con la Agencia Española del medicamento (ARAC: Acuerdo voluntario para la Reducción de Antibióticos en Cunicultura), por el que los veterinarios miembros de AVECU

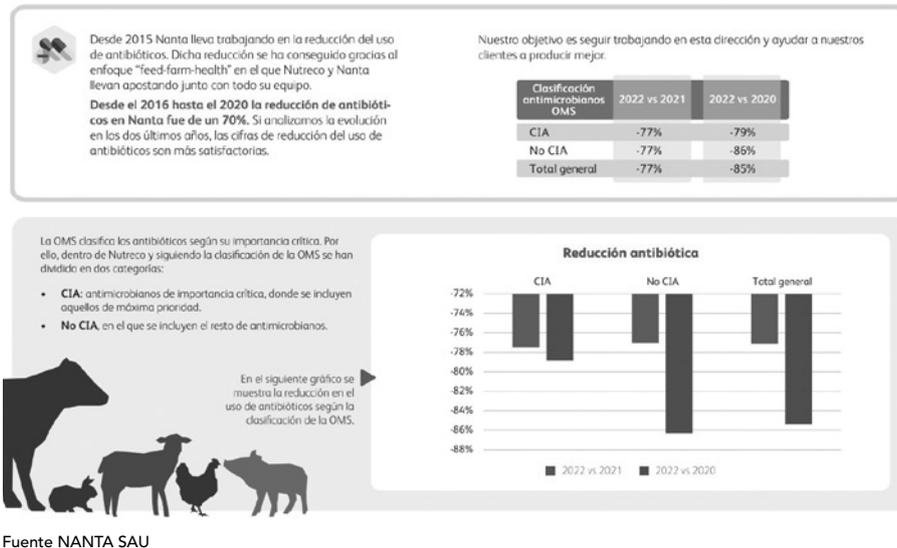
(por aquel entonces, un 80% de los participantes en cunicultura), nos comprometimos, entre otras cosas, a disminuir de forma drástica el consumo de antibióticos (mínimo un 30% de reducción en 2 años con referencia al 2015). Esta disminución ha superado todas las expectativas, pero ha tenido un fuerte coste para las granjas: aumento de mortalidades, disminución de rendimientos productivos, etc. En el 2021 se presentaron los objetivos "Green Deal" de la UE, en los cuales se adquiere el compromiso de reducir todavía más el uso de antimicrobianos. Concretamente se propone una reducción de otro 50% para 2030 sobre los datos actuales de 2021. De manera alineada con esta propuesta, en diversas reuniones mantenidas con la AEMPS y el MAPA, AVECU se ha comprometido a alcanzar una presión máxima medicamentosa de 350 mg/PCU vía pienso en 2025. Es decir, ¡una nueva reducción de un 60% sobre la presión que teníamos en 2021! A este respecto añado los únicos datos consolidados y objetivos que he encontrado y que se refieren a la evolución del consumo de piensos medicados en la empresa en la que trabajo actualmente.

Tabla 2: Evolución presión antibiótica 2015 a 2021 en piensos cunicultura NANTA

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
mg antibiótico/PCU	2190	2118	2088	1169	921	1128	968

Fuente NANTA SAU
 En cifras absolutas, en conejos, los datos de 2021 arrojan una disminución de un 75% de presión antibiótica sobre datos de 2016 y de un 22.8% sobre datos de 2020.

Gráfica 7: Reducción antibiótica 2020-2022 en NANTA (todas las especies)

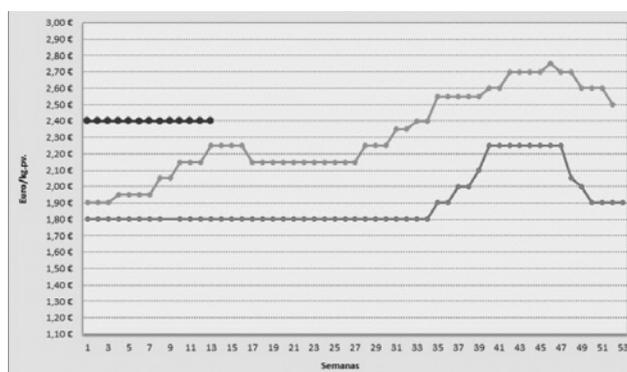


- **Legislación del uso de medicamentos:** ahondando en este tema, cada vez los veterinarios de campo lo tenemos más difícil para desarrollar nuestro trabajo clínico. Los condicionantes legales son tan fuertes que limitan en extremo nuestra toma rápida de decisiones. Esto, unido al punto anterior, contribuye en gran medida al agravamiento de los procesos patológicos en las granjas, con la consiguiente pérdida de rendimiento económico.
- **Descenso en el consumo de carne de conejo:** las cifras son claras. Cada año la carne de conejo va perdiendo cuota de mercado con el resto de las carnes tanto en cifras absolutas como relativas. Del 2020 al 2021 la disminución del consumo de carne de conejo en los hogares españoles ha sido del 13,63%, y del 2021 al 2022 del 18,35%. El consumo *per cápita* en España durante el 2021 ha sido de sólo 0,84 kg (datos de los Indicadores trimestrales de cunicultura, enero 2023, que publica el MAPA). La cunicultura como sector, vertebrada a través de su interprofesional (INTERCUN), y con la financiación de la Extensión de Norma que se va renovando cada año, trata de poner freno a esta incesante pérdida, pero parece que todavía no *ha dado con la tecla*. Consideramos muy importante seguir trabajando en este punto porque es lo que realmente va a hacer que el sector tenga futuro. En la *Gráfica 8* también vemos que en España se produce más carne de conejo que se consume y esta diferencia se ha acrecentado en los últimos años (un 120% de abastecimiento en el año 2021), por lo que las exportaciones cada vez cobran mayor importancia.

Gráfica 8. Evolución consumo versus abastecimiento 2004-2021



Gráfica 9. Precios conejo vivo 2021-2023



- **Bienestar animal:** cada vez son más las voces que se pronuncian en Europa en contra del uso de jaulas en producción animal. La tendencia parece imparable viendo lo que está pasando con las gallinas y los últimos informes publicados al respecto (Boletín Europeo de noticias nº 9-2023). Esta situación de incertidumbre sobre “qué va a pasar en los próximos años”, limita el crecimiento del sector. No está claro el modelo de granja que va a prevalecer. También en este apartado citaremos que el racionamiento, forma cada vez más importante de controlar la EEC, también está en el candelero por lo que significa en cuanto a limitación del consumo voluntario de los animales.
- **Precio conejo versus costes de energía y pienso:** el incremento de los costes de energía y pienso desde el inicio de la guerra de Ucrania ha sido enorme lo que, como en otros sectores, ha puesto en serio peligro la viabilidad económica de muchas granjas. Es la “tormenta perfecta”: menos producción (ver puntos anteriores) con mayores costes. Sin embargo, la evolución del precio del conejo en lonja también ha estado muy por encima de los pasados años. En lo que va del 2023 hasta el momento de escribir este artículo, el precio de la lonja de Madrid se ha mantenido en 2,40 €/kg sin ninguna fluctuación. A pesar de este incremento, las cuentas del cunicultor no acaban de salir. Para seguir viviendo de este negocio hay que *hilar cada vez más fino* y trabajar para obtener los mejores resultados productivos. Cualquier fallo se paga con la falta de rentabilidad y con problemas de pura subsistencia.
- **Sostenibilidad y Medio ambiente:** otro aspecto que cada vez está más presente en las producciones ganaderas. Europa está empeñada en disminuir la huella de carbono y de nitrógeno, en general, y de la actividad ganadera, en particular. Los RD publicados ya para regular los sectores porcino, avícola y bovino incluyen de forma destacada medidas para conseguir este fin. Las granjas deben conocer cómo impactan en el medio ambiente y proponer medidas correctoras para mejorar dicho impacto. Todo medible, objetivable y que debe formar parte del Sistema de Gestión Integral de cada granja. Es necesario ir preparándose para esto porque llegará en breve, también para la cunicultura.
- **Profesionalización:** toda verticalización conlleva la imposición de un estilo-modo de trabajo definido en mayor o menor medida por el *verticalizador* y que implica siempre una ardua recogida de datos y delega la toma de decisiones en terceras personas. Normalmente esto deviene en una mayor profesionalización del sector. Son decisiones tomadas con más criterio, aunque pueden chocar con el criterio del propio cunicultor. También el cunicultor, esté o no dentro de uno de estos sistemas, debe preocuparse por su formación y por la de sus trabajadores con el loable objetivo de hacer las cosas cada vez un poco mejor.
- **Asesoría técnica:** hablando de granjas libres, la cantidad de asesores que las visitan es cada vez mayor: veterinario del pienso, personal del centro de IA, del matadero, de los centros de genética, laboratorios, ... Esto podría ser positivo pero la realidad muestra que tantas opiniones, muchas veces dispares, sólo contribuyen a que el cunicultor tome decisiones no siempre afortunadas. En este sentido, la Administración es consciente de la importancia de que en todas las granjas haya una figura, la de **Veterinario de Explotación**, que de forma contractual actúe como tal y que vertebré todas estas “influencias”. Esperamos que en breve se publique un nuevo RD que regule el sector cunícola como ya se ha hecho con el porcino, la avicultura o el bovino. Veremos en qué queda todo esto.
- **Sanidad:** si decimos que cada vez el uso de antibióticos va a estar más limitado, mantener una correcta sanidad de las granjas obligará a profundizar y mejorar todas “las patas” que sostienen la producción: manejo, instalaciones, etc. Todo esto ha de desarrollarse bajo el paraguas de las buenas prácticas de **Bioseguridad**. Habrá que planificar e implementar un programa específico para cada granja teniendo en cuenta sus particularidades. También cambiar el ritmo reproductivo a intervalos parto-parto más largos, o disminuir densidades

puede ser una vía de mejora sanitaria, pero esto siempre hay que implementarlo de forma que no ponga en riesgo la sostenibilidad económica de las granjas.

- **Auditorías:** queremos finalizar con este punto porque consideramos que tiene que convertirse en una herramienta esencial para el desarrollo a futuro de las granjas. Hacer un estudio objetivo y exhaustivo de cada explotación para conocer sus puntos fuertes y los que no lo son tanto, desarrollar un plan de mejora consensuado con el granjero y sus trabajadores, implementarlo, reevaluarlo en el plazo que se decida, y seguir con este flujo de acciones "hasta el infinito", se nos antoja la forma más profesional de encarar el incierto futuro que nos tocará vivir en los próximos años.

Tratando de resumir, diremos que la máxima Darwinista de "adaptarse o morir", se hace cada vez más presente en la actividad ganadera, en general, y en el sector cunícola, en particular. Es necesario reflexionar sobre lo que nos deparará el futuro inmediato y tratar de tomar las medidas oportunas para sobrevivir al impacto. Información es poder. Pero no sirve de nada sin una adecuada actitud para adaptarse a estos cambios y tratar de verlos como oportunidades competitivas. Siguiendo el tópico, "el futuro ya está aquí". Toca afrontarlo con valentía y profesionalidad. Y sin olvidarnos de seguir y potenciar la promoción de la carne de conejo porque sin consumo "no hay paraíso".

Ganadería de precisión en una cunicultura sin jaulas

Precision livestock farming in cage-free rabbit rearing

Cambra-López M*

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

**macamlo@upvnet.upv.es*

Resumen

La ganadería de precisión se basa en el uso de la tecnología para monitorizar a los animales mediante sensores. Su implementación práctica puede suponer un avance significativo en el manejo animal y la gestión técnico-económica de la producción animal. El potencial de la tecnología es enorme y puede servir como ayuda para los profesionales en distintos campos dentro de la producción cunícola. El objetivo de este trabajo es analizar cómo las herramientas de precisión pueden ayudar en la transición hacia sistemas de producción de bajo impacto, innovadores y sin jaulas; y plantear algunas oportunidades en un escenario de sistemas de alojamiento sin jaulas en cunicultura intensiva.

Palabras clave: producción animal, cunicultura, monitorizar, sensores, tecnología, eficiencia.

Abstract

Precision livestock farming uses technology to monitor animals with sensors. Its practical implementation can contribute to improve animal care and the technical-economic management of animal production. Technology has a high potential and can be useful for the people working in the rabbit sector in different fields. The objective of this work is to analyze how precision tools can help in the transition towards low-impact, innovative and cage-free production systems; and address opportunities in a cage-free scenario in intensive rabbit rearing.

Keywords: livestock production, rabbit rearing, monitor, sensors, technology, efficiency.

Redefiniendo los sistemas de producción ganaderos

La ganadería moderna utiliza la tecnología para mejorar la producción, el bienestar y la salud animal, optimizar el consumo de recursos y facilitar las labores de trabajo. Se trata además de una actividad estratégica y vertebradora del territorio, que juega un papel fundamental en la economía local, en el desarrollo y el crecimiento de la sociedad, así como en la conservación de la biodiversidad y en la fijación de la población en el mundo rural.

Sin embargo, como cualquier otra actividad productiva, la ganadería consume recursos y genera impactos negativos sobre la calidad del aire, los cursos de agua superficial y subterránea, el suelo, y el clima global (Tullo *et al.*, 2019). Los animales utilizan un conjunto de materias primas y recursos que transforman en productos de origen animal como la carne, la leche y los huevos, entre otros. El objetivo es que esta transformación se realice con la mejor eficiencia biológica y económica posible; sin comprometer el medioambiente y el bienestar tanto de los animales como de las personas que los atienden (Gasa, 2018). Sin embargo, la eficiencia en la conversión del alimento es baja en general y variable entre especies, generando una serie de pérdidas (mayoritariamente en forma de nutrientes no aprovechados por el animal).

El marco legal actual que regula la producción ganadera es cada vez más exigente; así como la creciente concienciación social sobre cómo producimos. A pesar de los enormes avances que se han realizado en los sistemas de producción, manejo animal y eficiencia, la percepción de la sociedad sobre los modelos de producción ganaderos es tristemente bastante negativa, y generalmente se asocia la ganadería con una actividad muy industrializada (y por lo tanto con insuficiente bienestar animal) y extremadamente contaminante (Gasa, 2018). La divulgación de la información acerca de los sistemas de producción ganaderos, muchas veces sesgada, alimenta este debate e impacta sobre la opinión pública también negativamente. En este escenario, los sistemas de pro-

ducción especializados e intensivos están siendo cuestionados, y esta presión social condiciona cómo y dónde producimos, cómo tratamos a los animales y se demanda rendimiento de cuentas del impacto medioambiental que esta actividad genera.

La ciudadanía exige mejoras en los sistemas de producción animal y las cadenas de alimentación mundiales. Un 94 % de las personas en Europa cree que proteger el bienestar de los animales de granja es importante, y el 82 % cree que los animales de granja deberían estar mejor protegidos (Compassion in world farming, 2020). Estas preocupaciones se articulan en diferentes movimientos e iniciativas sociales, así como dentro de las prioridades de la Unión Europea (UE) establecidas en la Estrategia *Farm to Fork* y *Green Deal*. En estas últimas, se señala la mejora de la legislación sobre el bienestar animal y la sostenibilidad de la producción ganadera como líneas clave para la UE. Por ejemplo, la iniciativa "One Welfare" reconoce las interconexiones entre el bienestar humano, el bienestar animal y la integridad del medio ambiente (Pinillos et al., 2016). Otro ejemplo reciente y muy ilustrativo es la iniciativa ciudadana "Pongamos fin a la era de las jaulas" ("End the Cage Age") que recibió en 2020 un apoyo masivo a nivel europeo con 1,4 millones de firmas. A partir de esta iniciativa ciudadana, la Comisión Europea se comprometió a presentar una propuesta legislativa para eliminar los sistemas de alojamiento individual y en jaulas en 2027 (DG Health and Food Safety, 2021).

El sector cunícola en España debe abordar este desafío, ya que prácticamente toda la producción se basa en la cría en jaulas colectivas para los animales jóvenes y jaulas individuales para las conejas reproductoras (DG Health and Food Safety, 2017). El informe encargado por European Parliament Policy Department for Citizens' Rights (Heezen, 2020) subraya la necesidad de rediseñar los alojamientos en cunicultura. Los animales alojados en jaulas colectivas sin enriquecimiento ambiental no pueden expresar libremente su comportamiento natural, como correr, saltar o esconderse. Además, el alojamiento individual limita el contacto social (Kollenda et al., 2020). Por lo tanto, para cumplir con las exigencias anteriores, es muy probable que el manejo de las conejas reproductoras deba ser en grupo o semigrupo y los conejos de engorde deban alojarse en parques colectivos con un número de individuos superior al actual, aumentando así la superficie total disponible por animal (probablemente > 20 animales). Otros países, como Países Bajos, Alemania, Suiza, y Bélgica ya han implementado comercialmente sistemas de engorde en parques que incluyen plataformas y zonas de refugio. Sin embargo, los sistemas en grupo, especialmente para reproductoras, complican el manejo animal, reproductivo y la alimentación individualizada (Van Damme et al., 2023). En el engorde, con tamaños de grupo grandes, se puede elevar el riesgo de transmisión de enfermedades, especialmente de trastornos digestivos que aumenten la mortalidad post-destete (Gidenne et al., 2012).

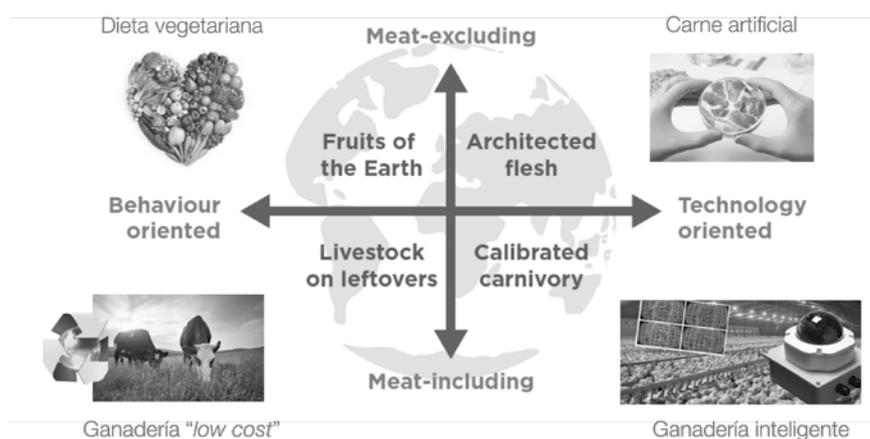
En este contexto, cobra relevancia el término de intensificación sostenible. Este concepto, en el contexto ganadero, trata de conjugar la definición tanto de sostenibilidad como de intensificación. Garnett y Godfray (2012) lo definieron como una forma de producción en la que "se mejoran los rendimientos productivos, sin impacto ambiental negativo y sin el uso de más superficie de cultivo"; es decir producir "más con menos". Atendiendo a las definiciones de sostenibilidad e intensificación, podemos pensar que la intensificación sostenible en ganadería es una contradicción y que se trata de un oxímoron, pues la ganadería sostenible no debería entonces incluir sistemas de producción donde los animales están estabulados todo el año en el interior. Aquí es donde la ganadería se enfrenta a las mayores incertidumbres y desafíos para alcanzar la sostenibilidad.

La adopción sistemas de producción con mayor grado de confinamiento, y la concentración de la producción en un número menor de explotaciones también ha estado acompañada de un gran incremento en la producción (Fraser, 2006). Las granjas son cada vez de mayor tamaño, buscando maximizar la rentabilidad y aprovechar las economías de escala. Estas granjas modernas alojan un gran número de animales que dependen en gran medida del cuidado de las personas. Sin embargo, con un número elevado de animales, el cuidado individual de éstos se complica. Más animales implica menos tiempo para atender las necesidades individuales (Berckmans, 2017). Las infecciones en grupos grandes pueden tener consecuencias desastrosas, mientras que la reducción del uso de antibióticos es un desafío prioritario (PRAN, 2022).

Ante esta situación, la intensificación a través de la aplicación del conocimiento, la innovación tecnológica y la implementación de herramientas de ganadería de precisión es esencial. Sin embargo, la realidad del sector productivo es muy diversa, incluyendo sistemas intensivos y extensivos. Además, los futuros escenarios posibles de producción a los cuales nos enfrentamos son también diversos. Hace unos años, Garnett (2015) describió cuatro escenarios para la producción animal y el consumo de alimentos (Figura 1). Los escenarios difieren en la inclusión o exclusión de carne contemplando tanto cambios en la demanda y el comportamiento humano como

mejoras en la productividad de los sistemas. Es muy probable que las crecientes presiones sobre el sistema de producción y su diversificación conduzca a escenarios sin carne, con modelos de producción de carne artificial que convivan con modelos vegetarianos. Para aquellos escenarios con animales, esta autora define un escenario basado en la ganadería extensiva, donde la cría de animales puede realizarse a partir de subproductos y recursos sobrantes, aprovechando la economía circular. Asimismo, aparece descrito el escenario de ganadería inteligente, donde se abastece de carne, lácteos y productos de acuicultura en sistemas de producción ultra-intensivos, altamente tecnificados, donde prima la precisión y la eficiencia.

Figura 1. Cuatro escenarios futuros para la producción animal. Fuente: Adaptada de Garnett (2015).



En el futuro de la producción animal, la solución probablemente pase por coger un poco de cada escenario. La convivencia entre los modelos extensivo e intensivo de producción cobrará sentido; la ganadería extensiva como complemento de la intensiva y viceversa. Pero no hay debate en que necesitamos una producción enormemente eficaz y aceptada socialmente. Además, los sistemas de alojamiento sin jaulas imponen demandas específicas para los productores, que precisan de herramientas para responder a las necesidades individuales de los animales.

El objetivo de este trabajo es analizar cómo las herramientas de precisión pueden ayudar en esta transición hacia sistemas de producción de bajo impacto, innovadores y sin jaulas y plantear algunas oportunidades aplicadas a un escenario de sistemas de alojamiento sin jaulas en la cunicultura intensiva.

¿Qué es la ganadería de precisión? ¿Cómo nos puede ayudar?

La ganadería de precisión (PLF, por sus siglas en inglés de Precision Livestock Farming) se basa en el uso de la tecnología para monitorizar a los animales mediante sensores. Su objetivo es manejar a los animales a través de la monitorización continua, automatizada y en tiempo real de la salud, el bienestar, la producción, la reproducción y el ambiente (Berckmans, 2017).

Se trata de una herramienta esencial para el personal ganadero en el escenario actual de producción, quizás decisiva ante los desafíos planteados anteriormente. La PLF incluye herramientas tecnológicas para controlar a los animales y/o su ambiente y servir de ayuda a las personas que se encargan de tal fin. Actualmente, la tecnología disponible es muy potente y permite ampliar la información que el personal encargado del cuidado de los animales puede tener. Para ello, la PLF aplica principios y técnicas de ingeniería de procesos para monitorizar, modelizar y manejar automáticamente la producción animal (Norton et al., 2019; Tullo et al., 2019).

Esta disciplina comenzó en los años 90, pero fue en 2001, cuando se propuso el término PLF por primera vez. Más tarde, en 2003, en la primera conferencia europea sobre PLF celebrada en Berlín, se establecieron las características clave que determinan cómo monitorizar a los animales. Se describió que los organismos vivos son sistemas Complejos, Individualmente diferentes, Temporalmente variables y Dinámicos – llamados sistemas CITD. Estas características de los sistemas animales definen en gran medida cómo monitorizar a los animales (medir, modelizar, monitorizar y gestionar la información sobre los mismos). Como el resto de organismos complejos, los animales son únicos y dinámicos. Además, su respuesta (fisiológica, por ejemplo) ante un determinado estímulo o agente estresor (por ejemplo, una reducción de pocos grados en la temperatura ambiental) es variable en el

tiempo, pudiendo variar con la edad o peso vivo. Esto justifica que la monitorización deba ser a tiempo real y continua, las 24 horas al día, los 365 días al año.

En este sentido, la PLF se convierte en una herramienta de gestión activa, adaptable y clave para la toma de decisiones que optimicen la gestión técnico-económica del sistema. Su implementación práctica puede suponer un avance significativo en el manejo animal y gestión global de la granja dado que abre la puerta a una toma de decisiones objetiva sobre los pilares fundamentales de la producción animal como la nutrición, reproducción, salud y genética; precisando de la colaboración entre todos los profesionales.

En el contexto actual, con grandes granjas y animales alojados en grupos cada vez más numerosos, las personas encargadas del cuidado y cría de los animales pueden beneficiarse de la ayuda de herramientas automáticas que permitan monitorizar de forma continuada y a tiempo real a estos animales, de forma grupal o individualizada. El tipo de información que podemos manejar en este ámbito es extraordinario, por ejemplo: la identificación individual de los animales, su comportamiento, el peso vivo, la condición corporal, el estrés por calor, la tasa de respiración, las interacciones sociales, el consumo de pienso, la conversión del alimento... algunos autores incluyen emociones (dolor y frustración, por ejemplo). A continuación, se describen algunos ejemplos de cómo puede ayudar a los profesionales del sector. Para ilustrar estos casos, me centraré en cómo las herramientas de precisión pueden apoyar a los profesionales de tres ámbitos concretos: veterinaria, genética y nutrición.

Respecto a la veterinaria, la PLF tiene un elevado potencial para mejorar la salud animal a través del diagnóstico precoz de enfermedades. El conocimiento de las bio-respuestas (respuestas fisiológicas o comportamentales ante cambios ambientales) de los animales en tiempo real, permite realizar acciones rápidas que benefician a los animales en ese momento, de forma más eficaz que sin ese conocimiento (Brown-Brandl *et al.*, 2019; Bus *et al.*, 2020). Por lo tanto, se trata de tecnologías con un inmenso potencial para la detección temprana de enfermedades, proporcionando una alerta anticipada y automática de posibles animales enfermos. De hecho, la detección temprana de enfermedades permite adelantar la aplicación del tratamiento, que puede ser totalmente dirigido y selectivo solo para los animales que muestren los primeros signos de enfermedad, contribuyendo a mejorar su efectividad. Esta utilidad es una de las principales aplicaciones y oportunidades de la PLF, en un contexto de reducción del uso de antibióticos y es especialmente relevante en animales alojados en grupo, donde el riesgo de propagación de enfermedades es considerablemente más alto que en otras situaciones. Para detectar la aparición incipiente de un brote, podemos monitorizar diferentes variables de comportamiento animal (comportamiento alimenticio y/o de bebida) y aplicar tecnologías de seguimiento (*animal tracking*) junto con visión computarizada de animales individuales, entre otras. *Esta tecnología podría utilizarse potencialmente en conejos jóvenes en crecimiento, más concretamente alrededor del destete cuando más probabilidad hay de que aparezcan trastornos digestivos.*

En cuanto a genética, los desarrollos en la PLF han permitido el uso de fenotipado o monitorización "de alto rendimiento" (*high-throughput phenotyping*). *Las herramientas de precisión permiten recoger cientos de rasgos de manera continua de muchos animales al mismo tiempo. El fenotipado de alto rendimiento en las poblaciones de animales de granja tiene dos ventajas según Pérez-Enciso et al. (2021): (1) se pueden definir y medir rasgos novedosos que no podrían ser registrados antes (por ejemplo comportamiento alimentario, eficiencia alimentaria, temperatura corporal e incluso comportamientos más complejos como la sociabilidad, entre otros); y (2) los rasgos clásicos ahora pueden registrarse automáticamente, de forma continua y no invasiva, sobre un elevado número de animales en condiciones de campo (hasta ahora esto solo era posible en núcleos con una población de animales "élite"). Un ejemplo que ilustra este caso es la obtención de datos de peso vivo y/o condición corporal individual a través del uso de imagen, mediante cámaras 2D ó 3D. Según Neethirajan y Kemp (2021), anteriormente, estas observaciones tenían que llevarse a cabo con mucho tiempo y dedicación de recursos humanos y económicos, e incluso entonces, los resultados eran imposibles de estandarizar u obtener continuamente. Según estos autores, el fenotipado digital ofrece información objetiva, fiable, robusta y repetible, que puede servir para desarrollar estándares y plataformas de intercambio de la información a largo plazo.*

En el área de la nutrición, se han probado con éxito las tecnologías de PLF basadas en la identificación individual para desarrollar sistemas de alimentación electrónica. La identificación por radiofrecuencia (RFID) es una tecnología que sirve para identificar y rastrear animales individuales mediante el uso de ondas de radio y campos electromagnéticos. Los sistemas RFID consisten en etiquetas (microchip) que se colocan en los animales a identificar y un lector (antena) para recibir y transmitir la información (Brown-Brandl *et al.*, 2019). Estos sistemas RFID se utilizan con éxito para regular la alimentación de cerdas gestantes y cerdos de engorde alojados en grupo. Su uso permite el seguimiento continuo y automático del consumo individual (tipo y cantidad de pienso), así

como el estudio del comportamiento alimenticio (frecuencia, duración y tasa de alimentación; Bus *et al.*, 2021). Esto, permite la implementación de un sistema de alimentación a medida. Con la ayuda de herramientas de precisión de identificación animal, tipo RFID, es viable ajustar el suministro de nutrientes a los requerimientos individuales de los diferentes animales que viven en grupos. Esta tecnología podría utilizarse potencialmente en alojamientos semi-grupales en conejas ya que la creación de grupos estables llevará a convivencia de animales de diferentes tipos (madres y gazapos) y estados fisiológicos (lactantes y no lactantes).

Sensores y el proceso para manejar los datos de campo

Para medir las respuestas de los animales y cómo interactúan con su ambiente, podemos distinguir sensores portátiles y sensores remotos. Éstos también pueden combinarse. Generalmente, son preferibles los sensores remotos, dado que no son invasivos. La elección de uno u otro depende de las necesidades, pero generalmente, los sensores deben cumplir todas o alguna de estas funciones:

- i. Identificar animales individualmente (*animal recognition*)
- ii. Realizar un seguimiento (*animal tracking*) individual de los mismos (rastrear su posición, evolución del crecimiento, monitorizar su comportamiento...)
- iii. Controlar el ambiente donde se alojan de forma continua y a tiempo real

Los sensores portátiles pueden medir variables fisiológicas. Algunos ejemplos son: (1) termómetros y cámaras infrarrojo para medir temperatura corporal, (2) implantes, sensores basados en fotopletimografía o electrocardiografía para medir ritmo cardíaco, (3) sensores digitales de humedad para medir sudoración, (4) bolos para medir salud intestinal, (5) comederos inteligentes para medir comportamiento alimenticio, (6) micrófonos para medir salud respiratoria, (7) acelerómetros, pedómetros y GPS para medir actividad – localización y velocidad de movimiento y (8) RFID para identificar y medir localización y comportamiento.

Los sensores remotos se asocian a cámaras o micrófonos. La imagen y visión computarizada se ha utilizado para numerosas aplicaciones tanto en aves como en porcino. Algunas de ellas, han dado paso a prototipos comerciales como, por ejemplo, una cámara 3D para monitorizar automáticamente el peso de cerdos de engorde. La cámara, instalada de forma cenital en la nave graba los movimientos de los animales y predice el peso vivo con una exactitud aceptable para cerdos > 40 kg. Las cámaras para la identificación individual de los animales se pueden utilizar mediante la variación en la apariencia (conformación y color del pelaje) del animal completo, el marcado visual o trabajar en combinación con etiquetas RFID. Otro ejemplo comercial en el porcino de engorde es la utilización del sonido para predecir la salud respiratoria de los cerdos. A través de un micrófono integrado con un sistema de inteligencia artificial, se analiza el sonido (tos). Este modelo puede predecir la aparición de enfermedades respiratorias porcinas antes de que las personas observen los primeros síntomas.

En este contexto, con la amplia gama de sensores existentes – ojo, no todos ellos diseñados para animales, ni comercialmente disponibles – lo complicado no es conseguir los sensores. No se trata solo de conseguir datos, sino de información de calidad. Por ejemplo, la cámara Kinect (Microsoft), es capaz de ofrecer imágenes de profundidad y puedes adquirirla a un coste muy bajo. Sin embargo, el reto es conseguir transformar los datos de los sensores en algoritmos fiables y robustos que puedan responder a la pregunta en cuestión y predecir la respuesta. Para ello, debemos predecir la variable objetivo, que exista un criterio de referencia (*gold standard*) y una variable característica (*feature variable*) que puedas medir de forma simple en el animal con exactitud (Berkmans, 2013). La variable objetivo se relaciona directamente con el objetivo final del algoritmo. Por ejemplo, el estado de salud de un animal. ¿Está enfermo? Puede contestarse con Sí o No. La variable característica es la que medimos. Se calcula a partir de las mediciones sobre el animal a nivel de campo y que son captadas por las señales de sensores portátiles o remotos. Aquí el desafío es elegir bien la/s variable/s a medir, dado que los animales pueden expresar lo mismo de diversas formas. El criterio de referencia es totalmente necesario y se reduce normalmente a una forma generalmente aceptada por consenso de medir el estado de la variable objetivo. Establecer un criterio de referencia exacto es uno de los elementos más difíciles de desarrollo de algoritmos PLF.

Oportunidades de ganadería de precisión en sistemas de alojamiento sin jaulas en cunicultura

Los sistemas de alojamiento sin jaulas en cunicultura se asocian a sistemas con una mayor actividad locomotora de los animales. En primer lugar, los sistemas con mayor libertad de movimiento, muestran una menor eficiencia alimenticia que puede resultar en una disminución de la productividad animal (Machado *et al.*, 2019; Matics *et al.*, 2019) y de la rentabilidad y sostenibilidad de la granja, comparado con sistemas donde la actividad física

de los animales es menor. Además, el alojamiento en grupo dificulta la alimentación de precisión, ajustada y a medida de cada individuo en cada momento. Utilizando el enfoque de alimentación de la población o grupo, las variaciones individuales según el estado fisiológico, la condición corporal, la genética o la salud animal no pueden atenderse (Pomar y Remus, 2019). En segundo lugar, los sistemas de alojamiento en grupo provocan estrés social y aparecen comportamientos agonísticos para establecer la jerarquía. Estos comportamientos agresivos entre animales pueden aparecer para establecer las relaciones sociales y mantenerse cuando compiten por recursos limitados. Por ejemplo, en conejas hembras alojadas en grupo, se han descrito interacciones agresivas y una elevada mortalidad de hembras reproductoras y crías (Pérez-Fuentes *et al.*, 2020; Szendrő *et al.*, 2019). Finalmente, los sistemas sin jaulas también suponen un mayor riesgo de transmisión de enfermedades que afectan negativamente la salud y el bienestar de los animales. Esto podría aumentar la necesidad de utilizar antibióticos en un contexto de demanda para reducir su uso (PRAN, 2022). En conejos de engorde, los trastornos intestinales como, entre otras enfermedades, la enteropatía epizoótica del conejo (ERE) son una de las principales causas de mortalidad. El aumento de la mortalidad tiene un impacto negativo en la rentabilidad de la granja (Gidenne *et al.*, 2012).

Ante estos desafíos, la tecnología es una herramienta muy potente que ofrece un potencial enorme para contribuir a resolver algunos de estos desafíos hacia una cunicultura que pueda mantener la productividad animal, la rentabilidad y sostenibilidad de la granja. La **Tabla 1** muestra algunas de las oportunidades que ofrecen las herramientas de precisión, aplicadas a un escenario de sistemas de alojamiento sin jaulas en cunicultura, así como los distintos tipos de sensores que podrían utilizarse. El potencial es enorme y la tecnología puede servir como ayuda en distintos campos dentro de la producción cunícola. Sin embargo, son muy pocas las tecnologías que están siendo desarrolladas y/o validadas para esta especie. En general, aunque los avances científicos en el campo de la investigación son a veces suficientes, la implementación es todavía muy limitada, casi en todas las especies. Esto requiere conciliar los avances científicos con la innovación y transferencia tecnológica práctica. Para ello, es esencial trabajar en colaboración investigación – sector – industria.

Tabla 1. Oportunidades que ofrecen las herramientas de precisión, aplicadas a un escenario de sistemas de alojamiento sin jaulas en cunicultura.

Desafíos	Oportunidades	Sensores
Eficiencia alimentaria y ajuste a las necesidades nutricionales de cada individuo	- Monitorización continua del comportamiento alimenticio - Monitorización continua del peso y condición corporal - Desarrollo de sistemas de alimentación de precisión que se ajuste a las necesidades nutricionales individuales	RFID Cámara + RFID
Agresiones y comportamientos agonísticos	- Identificación de agresiones y animales agresivos	Cámara + RFID Acelerómetros ¿Micrófono?
Riego de transmisión de enfermedades	- Detección precoz de signos de enfermedad - Tratamientos veterinarios selectivos e individualizados	RFID Cámara + RFID Acelerómetro ¿Micrófono?

RFID: identificación por radiofrecuencia

Conclusiones

La ciudadanía demanda mejoras en los sistemas de producción animal y exige que el animal y sus necesidades sean el núcleo de los mismos. La enorme transformación del sector ganadero en los últimos años, como el sector cunícola, ha revolucionado los sistemas de producción actuales, así como el tipo de alojamiento de los animales. Las granjas capaces de afrontar los cambios y que sobreviven en esta situación tan inestable, son generalmente cada vez de mayor tamaño, buscando maximizar la rentabilidad y aprovechar las economías de escala. Estas granjas modernas alojan un gran número de animales que dependen en gran medida del cuidado de las personas. Sin embargo, las personas tienen un tiempo limitado para el manejo de los animales diariamente, y esto dificulta la atención y cuidado individualizado de los mismos.

Las herramientas de precisión en ganadería pueden ayudar al sector productor en el cuidado de los animales, facilitando una mayor comprensión de las necesidades individuales de los mismos. En este sentido, se ha

convertido en un aliado fundamental para la toma de decisiones optimizadas en granja. Permite incorporar nuevas variables sobre los animales de manera individualizada, objetivas, simples de medir y fiables sobre sus bio-respuestas en todo momento (24/7). Todo esto de forma automatizada, sin aumentar los costes de mano de obra. Esta información procedente de sensores debe integrarse en la gestión técnica de la empresa ganadera, combinando de forma innovadora, los datos productivos, económicos y de rentabilidad, con las necesidades reales de los animales. Además, favorecerá una nueva industria digital, con flujos de información continuos que pueden ir de los animales hasta los consumidores que quieren conocer en detalle cómo se han criado cada uno de los animales. La información podrá intercambiarse y conectarse entre granjas de una forma rápida y directa, abriendo paso a una nueva industria que pueda compartir su imagen, sus avances y sus resultados con la sociedad de una forma abierta y transparente, favoreciendo así su aceptación. Esto puede contribuir sin duda, a acercar posiciones entre las demandas sociales y las del sector productivo, contribuyendo a alcanzar los más altos niveles de producción, eficiencia, resiliencia y bienestar en la cría de animales para la producción de alimentos, seguros, nutritivos y de calidad.

Agradecimientos: Este trabajo se enmarca dentro del proyecto SMART-RAB "Precision feeding for a sustainable rabbit production" (AICO/2021/256) financiado por la Conselleria d'Innovació, Universitats, Ciència i Societat Digital, Generalitat Valenciana. Agradezco los comentarios para mejorar el texto y la revisión crítica de mis colegas Adrián Ramón Moragues y Juan José Pascual.

Bibliografía

- Berckmans D. 2017. General introduction to precision livestock farming. *Anim Front* 7 (1): 6-11.
- Berckmans D. 2013. Basic principles of PLF: Gold standard, labelling and field data. En: *Proceedings of the 6th European Conference on Precision Livestock Farming, ECPLF2013, Leuven*, pp. 21-29.
- Brown-Brandl TM, Adrion F, Maselyne J, Kapun, A, Hessel EF, Saeys W, Van Nuffel A, Gallmann E. 2019. A Review of passive radio frequency identification systems for animal monitoring in livestock facilities. *Appl Eng Agric* 35(4): 579-591.
- Bus JD, Boumans IJMM, Webb LE, Bokkers EAM. 2021. The potential of feeding patterns to assess generic welfare in growing-finishing pigs. *Appl Anim Behav Sci* 241: 105383.
- Compassion in world farming. 2020. Why the EU must stop caging farm animals. "End the Cage Age" report. En: <https://www.endthecageage.eu/how-close-are-we-to-a-cage-free-europe/>
- DG Health and Food Safety. 2017. European Commission. Commercial rabbit farming in the European Union. Overview report. En: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/5029d977-387c-11e8-b5fe-01aa75ed71a1/language-en>
- DGHealthandFoodSafety.2021.CommunicationfromtheCommissionontheEuropeanCitizens'Initiative(ECI)"EndtheCage Age". European Union. En: [https://ec.europa.eu/transparency/documents-register/detail?ref=C\(2021\)4747&lang=en](https://ec.europa.eu/transparency/documents-register/detail?ref=C(2021)4747&lang=en).
- Fraser D. 2006. El bienestar animal y la intensificación de la producción. *Animal. Una interpretación alternativa. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO*. En: <http://www.fao.org/3/a0158s/a0158s00.htm#Contents>.
- Garnett T. 2015. Gut feelings and possible tomorrows: (where) does animal farming fit?. *Food Climate Research Network and the Oxford Martin Programme on the Future of Food, University of Oxford, Reino Unido*.
- Garnett T, Godfray C. 2012. Sustainable intensification in agriculture. Navigating a course through competing food system priorities, *Food Climate Research Network and the Oxford Martin Programme on the Future of Food, University of Oxford, Reino Unido*.
- Gasa J. 2018. Consideraciones para una alimentación de futuro en el sector. En: Díaz MA (Ed.). *El sector porcino de la incertidumbre al liderazgo. Monografías. Cajamar Caja Rural, España*.

- 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 (9): 1407-1419.
- Heezen J. 2020. End the cage age: Looking for alternatives. Policy Department for Citizens' Rights and Constitutional Affairs. PE 658.539, European Union, Brussels, Bélgica.
- Kollenda E, Baldock D, Hiller N, Lorant A. 2020. Transitioning towards cage-free farming in the EU: Assessment of environmental and socio-economic impacts of increased animal welfare standards. Policy report by the Institute for European Environmental Policy, Brussels & London.
- Machado LC, Martínez-Paredes E, Cervera C. 2019. Performance of rabbit does housed in collective pens and individual cages. *World Rabbit Sci* 27: 227-235
- Matics Z, Cullere M, Dalle Zotte A, Szendrő K, Szendrő Z, Odermatt M, Atkári T, Radnai I, Nagy I, Gerencsér Z. 2019. Effect of cage and pen housing on the live performance, carcass, and meat quality traits of growing rabbits. *Ital J Anim Sci* 18 (1): 441-449.
- Neethirajan S, Kemp B. 2021. Digital phenotyping in livestock farming. *Animals* 11(7): 2009.
- Norton T, Chen C, Larsen MLV, Berckmans D. 2019. Review: Precision livestock farming: building 'digital representations' to bring the animals closer to the farmer. *Animal* 13 (12): 3009-3017.
- Pérez-Enciso M, Steibel JP. 2021. Phenomes: the current frontier in animal breeding. *Genet Sel Evol* 53: 22.
- Pérez-Fuentes S, Muñoz-Silvestre A, Moreno-Grua E, Martínez-Paredes E, Viana D, Selva L, Villagrà A, Sanz-Tejero C, Pascual JJ, Cervera C, Corpa JM. 2020. Effect of different housing systems (single and group penning) on the health and welfare of commercial female rabbits. *Animal* 14 (6): 1270-1277.
- Pinillos RG, Appleby MC, Manteca X, Scott-Park F, Smith C, Velarde A. 2016. One Welfare - a platform for improving human and animal welfare. *Vet Rec* 179(16): 412-413.
- Pomar C, Remus A. 2019. Precision pig feeding: a breakthrough toward sustainability. *Anim Front* 9(2): 52-59.
- PRAN, Plan Nacional Resistencia Antibióticos. 2022. Plan nacional frente a la resistencia a los antibióticos 2022-2024. En: <https://resistenciaantibioticos.es/>
- Szendrő ZS, Trocino A, Hoy ST, Xiccato G, Villagrà A, Maertens L. 2019. A review of recent research outcomes on the housing of farmed domestic rabbits: reproducing does. *World Rabbit Sci* 27: 1-14.
- Tullo E, Finzi A, Guarino M. 2019. Review: Environmental impact of livestock farming and Precision Livestock Farming as a mitigation strategy. *Sci Total Environ* 650: 2751-2760.
- Van Damme LGW, Delezie E, Maertens L, Ampe B, Tuytens FAM. 2023. Effect of group size and escape enrichment on reproductive performance of breeding does in part-time group housing. *World Rabbit Sci* 31: 47-55.

Staphylococcus aureus en cunicultura. Nuevos retos, nuevas herramientas

Staphylococcus aureus in rabbit farming. New challenges, new tools

Viana D*, Arnau-Bonachera A*, Mascarós P, Martínez-Seijas C, Díaz-Mendez JF, Selva L, 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 n° 2, 46115 Alfara del Patriarca, Valencia, Spain.

*dviana@uchceu.es; alberto.arnau@uchceu.es

Resumen

Las infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus* son un problema de primer orden en cunicultura. Las lesiones más habitualmente asociadas a esta bacteria son dermatitis supurativa, abscesos, pododermatitis y mastitis. La estafilococosis en granjas de conejos está relacionada con cepas mayoritariamente asociadas al complejo clonal (CC) 121, siendo el segundo más común el CC96. Las cepas asociadas al CC121 se consideran cepas más virulentas que las asociadas a CC96, observándose diferencias de infectividad a nivel experimental y en la respuesta inmunitaria de los conejos frente a ambos tipos de cepas. Mediante un análisis filogenético se ha comprobado que las cepas de conejo pertenecientes al CC mayoritario proceden de un salto desde el humano al conejo, donde resultó clave el gen *dltB*, localizado en el cromosoma central, y sin intervención de elementos genéticos móviles. Uno de los problemas más importantes para combatir la estafilococia es la resistencia a antibióticos. Las cepas procedentes de granjas de conejos y resistentes a meticilina (LA-MRSA) son multirresistentes y pertenecen mayoritariamente al CC96. Con el objetivo de seguir investigando la evolución y las características de las cepas de *S. aureus* y como se relacionan con los conejos y facilitar el análisis de datos se ha desarrollado una aplicación basada en Power BI® que permite introducir datos con diversos formatos y origen y analizarlos de forma intuitiva y visual.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, patología, conejo.

Abstract

Infections caused by *Staphylococcus aureus* are a major problem in rabbit farming. The most common lesions associated with this bacterium are suppurative dermatitis, abscesses, foot rot and mastitis. Staphylococcosis in rabbit farms is related to strains mostly associated with the clonal complex (CC) 121 and, secondly, CC96. CC121-associated strains are considered more virulent than CC96-associated strains, with differences in infectivity observed in experimental infections and in the immune response of rabbits to both types of strains. Phylogenetic analysis has shown that rabbit strains belonging to the major CC originated from a jump from humans to rabbits, where the *dltB* gene on the central chromosome was key, without the involvement of mobile genetic elements. One of the most significant problems in combating staphylococcosis is antibiotic resistance. Strains from rabbit farms that are resistant to methicillin (LA-MRSA) are multidrug-resistant and mostly belong to CC96. To continue investigating the evolution and characteristics of *S. aureus* strains and their relationship with rabbits and facilitate data analysis, a Power BI®-based application has been developed that allows data to be entered in various formats and from various sources and analyzed in an intuitive and visual manner.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, pathology, rabbit.

Introducción

Staphylococcus aureus está considerada una de las especies bacterianas de mayor importancia, desde el punto de vista sanitario, tanto para el hombre como para los animales (Kloos, 1980). Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y comúnmente está considerada como hospedador habitual de la piel (Kloos, 1980) y mucosas, principalmente en la cavidad nasal (Peacock et al., 2001; Selva et al., 2015; Wertheim et al., 2005); encontrándose también en la mayoría de los productos de origen animal (Kloos, 1980). La gran mayoría de las infecciones por esta bacteria provocan portadores asintomáticos. Por tanto, *S. aureus* se considera una bacteria oportunista, ya que requiere de factores predisponentes para originar lesiones (Feil et al., 2003). En los humanos, el principal problema provocado por

S. aureus tiene lugar en el ámbito hospitalario, siendo la causa más importante de infecciones nosocomiales (Jones, 2003). Provoca un amplio espectro de enfermedades, desde infecciones leves de la piel hasta endocarditis, shock tóxico y neumonía necrotizante (Tenover and Gaynes, 2000). *S. aureus* también es uno de los mayores patógenos en medicina veterinaria, afectando a diversas especies animales, infectándose un elevado número de explotaciones animales, implicando graves pérdidas económicas y suponiendo un riesgo de zoonosis. En el caso del conejo, las infecciones por *S. aureus* causan pérdidas económicas considerables en cunicultura comercial y los signos clínicos de la infección por *S. aureus* están presentes en más del 60% de las granjas de conejos (Rosell and de la Fuente, 2018, 2009). La infección de conejos por este patógeno está asociada principalmente con dermatitis supurativa, abscesos, pododermatitis y mastitis (Corpa et al., 2010), siendo la mastitis crónica la principal causa para el sacrificio de conejas enfermas en las granjas de conejos (Rosell and de la Fuente, 2018; Segura et al., 2007).

Clonalidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus puede infectar a una amplia variedad de animales y puede transmitirse entre diversas especies. Sin embargo, la mayoría de los aislados procedentes de un hospedador concreto difieren, a nivel de su genoma, de los aislados de un hospedador diferente, agrupándose en complejos clonales (CC), lo que sugiere la existencia de clones específicos de hospedador (Herron-Olson et al., 2007; Lowder et al., 2009). Se ha sugerido, además, que esta especificidad puede estar determinada por unos pocos genes o combinaciones de genes (Sung et al., 2008). Dado que *S. aureus* posee un genoma central altamente conservado, es probable que las adaptaciones específicas de hospedador se basen en genes localizados en elementos genéticos móviles (EGM). La adquisición o pérdida de uno o más EGM puede implicar que *S. aureus* pueda adaptarse a un nuevo hospedador (Viana et al., 2010). La estafilococosis en granjas de conejos está relacionada con diversos genotipos que se agrupan principalmente en dos complejos clonales. El mayoritario, con cepas pertenecientes al complejo clonal (CC) 121 (Vancraeynest et al., 2006; Viana et al., 2011) y, el segundo más común, con cepas pertenecientes al CC96. Otros clones pertenecientes a CC1 o CC398 se detectan con menor frecuencia en las granjas de conejos (Viana et al., 2011). Los aislados de conejo son significativamente diferentes de los encontrados en humanos y rumiantes, por ejemplo, lo que sugiere la presencia de factores específicos que han permitido a la bacteria la adaptación al conejo (Viana et al., 2007). Mediante análisis filogenético se ha comprobado que las cepas de conejo pertenecientes al CC121 proceden de un salto desde el humano al conejo hace aproximadamente 48 años (Viana et al., 2015a). Inicialmente se analizó si este salto de especie se produjo gracias a modificaciones en EGMs. El análisis comparativo de los genomas accesorios de las cepas ST121 mostró que la mayoría de las cepas humanas contenían EGMs que codifican toxinas involucradas en la patogénesis de enfermedades humanas, como la leucocidina de Pantón-Valentine y las toxinas exfoliativas, y todas, excepto una, contenían un fago convertidor de β -hemolisina que codifica el grupo de evasión inmunitaria específico en los aislados humanos. Sin embargo, ninguna de las cepas de conejo contenía estos EGMs, lo que indica que éstos no eran necesarios para la infección por *S. aureus* de conejos (Viana et al., 2015a). Además, las cepas de conejo no contenían EGMs que fueran únicos de los aislados procedentes de conejo, lo que indica que la adquisición de EGMs específicos de conejo no es necesario para causar la infección. Mediante el análisis del genoma central se demostró que el cambio de un nucleótido en el gen *dltB* es suficiente para permitir que una cepa procedente de una lesión humana confiera infectividad en el conejo, es decir, permite un cambio de especie. *DltB* es una proteína de membrana integral codificada por el operón *dltABCD* que probablemente confiere carga positiva a la pared de la bacteria mediante la incorporación de D-alanina (Peschel et al., 1999) y de esta manera resistir la acción de los péptidos catiónicos. Sin embargo, ni la composición de la pared celular ni la cantidad de D-alanina se relacionaron con la capacidad infectiva, sugiriendo una función diferente.

Portadores nasales y su relación con la estafilococia

El estado de portador nasal de *S. aureus* se considera una fuente importante de infección en los seres humanos (Marshall y McBryde, 2014; Perl et al., 2002). En los seres humanos, casi un tercio de la población está colonizada por *S. aureus* en la actualidad. Además, muchos de los casos de bacteriemia por esta bacteria parecen ser de origen endógeno, originándose a partir de la colonización de la mucosa nasal. Por tanto, ser portador nasal de *S. aureus* se considera un factor predisponente para el desarrollo de infección en los seres humanos. En los conejos, hay pocos estudios sobre la colonización de *S. aureus* (Hermans et al., 2000, 1999; Selva et al., 2015). En estos trabajos se describieron porcentajes que variaban entre el 32,1 – 56%. El estado de portador nasal se asoció con la presencia de lesiones clínicas por *S. aureus* en el 84,2% de los conejos, mientras que el porcentaje de portadores sanos fue de 28,8%. Además, la relación entre el estado de portador nasal de *S. aureus* y la infección clínica fue respaldada por el hecho de que las cepas de *S. aureus* nasales y las cepas intralesionales compartían el mismo genotipo en el 91,7% de los casos (Selva et al., 2015). Por tanto, los portadores nasales parecen desempeñar un papel clave en la patogénesis de las infecciones estafilocócicas y podrían ser un factor de riesgo para el desarrollo de lesiones estafilocócicas.

Virulencia de las cepas de *Staphylococcus aureus*

En las granjas de conejo, se han identificado dos tipos principales de cepas de *S. aureus* según su virulencia: las cepas de alta virulencia, capaces de propagarse rápidamente en toda la explotación, y las cepas de baja virulencia, que causan infecciones más limitadas (Hermans et al., 2003). Estudios posteriores de tipificación molecular encontraron que la mayoría de las cepas de alta virulencia pertenecían al clon ST121 (Vancraeynest et al., 2006; Viana et al., 2011), mientras que las cepas clasificadas como de baja virulencia pertenecen al clon ST96 (Penadés et al., 2020). Además de esta clasificación, relacionada con el comportamiento clínico de las cepas, también se ha podido corroborar en modelos experimentales, tanto de piel (Meulemans et al., 2007; Muñoz-Silvestre et al., 2020) como de glándula mamaria (Penadés et al., 2020), observándose lesiones más leves en cepas de baja virulencia. Sin embargo, en los casos naturales no se pueden observar diferencias en las lesiones producidas según el genotipo de la cepa aislada (Segura et al., 2007; Viana et al., 2011), lo que sugiere que los modelos experimentales pueden no reproducir todos los aspectos de la patogenia de la enfermedad, por ejemplo, pueden variar los niveles de expresión de factores de virulencia, y además, pueden no reproducir factores que pueden influir en la respuesta inmunitaria, como, por ejemplo, factores inmunosupresores.

A nivel genético, las principales diferencias entre cepas fueron a nivel del grupo de genes de enterotoxinas ("enterotoxin gene cluster", egc), detectados únicamente en las cepas de alta virulencia ST121, y el grupo de genes de evasión inmunológica ("immune-evasion-cluster genes", IEC), detectado únicamente en las cepas de baja virulencia ST96 (Viana et al., 2015b). Estos resultados sugieren que el grupo de genes egc puede ser relevante para la capacidad de infección en conejos, mientras que el clúster de inmuno-evasión, relacionado con cepas humanas, podría indicar que son cepas que no están completamente adaptadas al conejo. Además, estos grupos de genes están codificados en un profago que se integra en el gen que codifica para la beta-toxina, que también tiene relevancia en la capacidad de infección en conejos (Viana et al., 2015a). Igualmente, se ha relacionado con cepas altamente virulentas los genes *bbp*, *selm* y un patrón de RAPD específico de alta virulencia llamado «flank» (Vancraeynest et al., 2007). A nivel de respuesta inmunitaria, también se han observado diferencias en conejos con mastitis naturales infectados con cepas de alta virulencia ST121 y cepas de baja virulencia ST96. La infección de las glándulas mamarias con cepas ST121 resultó en niveles elevados de granulocitos y reducción de los números de células B, células T, células CD4⁺ T y células CD8⁺ T en comparación con las glándulas mamarias infectadas con cepas ST96 (Guerrero et al., 2015).

Por otra parte, la adaptación a los diferentes nichos y hospedadores está controlada por una compleja red de reguladores transcripcionales. *S. aureus* posee 16 sistemas de dos componentes (TCS), que son vías de transducción de señales que permiten que las células se adapten a los diversos microambientes de su ciclo vital. Mediante el empleo de modelos in vivo se ha realizado una evaluación sistemática de todos los TCS de esta bacteria, determinándose que los sistemas TCS5 (GraRS), TCS6 (SaeRS) y TCS12 (VraSR) regulan genes esenciales tanto en cepas humanas como de conejo para superar el sistema inmunitario innato del hospedador y producir lesiones en los conejos, al no observarse lesiones en las cepas mutantes en estos reguladores (Penadés, 2017). Dichos reguladores están involucrados en la resistencia de *S. aureus* a los factores antimicrobianos del sistema inmunitario innato, como los péptidos antimicrobianos producidos por las células epiteliales y los neutrófilos, mecanismo de defensa clave en infecciones dérmicas en estos animales. Por lo tanto, el sistema inmunitario innato jugaría un papel fundamental en el éxito de una infección por *S. aureus*.

Patogenia de las infecciones estafilocócicas cutáneas en conejos

Empleando un modelo experimental de infección se examinó la respuesta inmunitaria y la patogénesis de las infecciones cutáneas provocadas por *S. aureus* (Muñoz-Silvestre et al., 2020). Para ello, los conejos fueron infectados con dosis bajas de diferentes cepas de esta bacteria por vía intradérmica y se evaluó la evolución de las lesiones en la piel, así como la respuesta inmunitaria local y sistémica. Inicialmente, predominaron los fenómenos vasculares, observándose pequeñas pápulas rojizas ligeramente elevadas, que fueron caracterizadas histológicamente por la presencia de cambios vasculares agudos, pequeños abscesos organizados, a veces con bacterias internas y rodeados de heterófilos, que se distribuyeron difusamente. Un hallazgo interesante fue el aumento agudo y único de los linfocitos CD25⁺ antes del inicio de la inflamación. Estas células se consideran células T reguladoras, esenciales para prevenir la exacerbación de la respuesta inflamatoria, aunque se ha descrito que pierden su actividad en presencia de *S. aureus*. En el tercer día después de la infección, se observaron lesiones nodulares que alcanzaban su mayor volumen y la mayor concentración de bacterias. Microscópicamente, los cambios vasculares aumentaron en gravedad, y se observaron abscesos rodeados por una capa necrótica eosinofílica en cuyo núcleo se observaron fenómenos de Splendore-Hoeppli

con bacterias internas. Alrededor del absceso, se observó incremento en el número de linfocitos T (CD3+) y macrófagos (RAM11+), en comparación con los días anteriores, que se mantuvieron altos hasta el día 21 después de la infección, y se relacionaron con el aumento del número de monocitos y linfocitos en la sangre el segundo día después de la infección. En el séptimo día después de la infección, el 50% de los nódulos se abrió como consecuencia de la necrosis epidérmica, lo que desencadenó una liberación de pus y una reducción tanto del tamaño de la lesión como del número de bacterias aisladas. Estas lesiones epidérmicas generaron un nuevo episodio inflamatorio, caracterizado periféricamente por un aumento en el número de heterófilos en la sangre, que duró hasta el día 14 después de la infección. En términos histológicos, las lesiones alcanzaron su punto más grave, con varios fenómenos de Splendore-Hoeppli rodeados de muchos linfocitos T (CD3+), células plasmáticas (IgG+) y macrófagos (RAM11+).

Mediante este modelo de infección empleando bajas dosis de bacterias también se evaluaron algunos genes de virulencia relacionados con la gravedad de las lesiones. Pero, con el empleo del modelo de dosis bajas, los mutantes *JDcoaDvwb*, *JDhla*, *JDpsmα* y *ϑDagr* no modificaron la gravedad y desarrollo de los abscesos. Probablemente, esto se deba a que algunos fenómenos relacionados con la gravedad, como los fenómenos de necrosis en la piel, sean consecuencia de la producción masiva de toxinas bacterianas debido a la elevada concentración bacteriana empleada en otros modelos animales, lo que simularía estados más avanzados de la enfermedad (Muñoz-Silvestre et al., 2020).

Resistencias a antibióticos

Uno de los problemas más importantes que surgen a la hora de combatir este patógeno son las resistencias a los antibióticos. El aumento de estas resistencias en las últimas décadas se ha convertido en un problema grave de salud pública. Una de las resistencias que más importancia adquiere, en especial en esta bacteria, es la resistencia a la meticilina. La presencia de cepas de *S. aureus* procedentes de ganadería y con resistencia a la meticilina, conocidas como LA-MRSA por sus siglas inglesas (Smith, 2015), se describieron inicialmente en cerdos europeos entre 2003 y 2005 para posteriormente diseminarse y detectarse en muchas otras especies animales, incluyendo el conejo (Agnoletti et al., 2014). En un estudio realizado en la Península Ibérica por Moreno-Grúa y colaboradores (2018) se encontró un 11,25% de cepas de LA-MRSA, en 240 aislados procedentes de 19 explotaciones de conejos. Estas cepas pertenecieron mayoritariamente al CC96 (clon ST2855) y, en menor medida, CC5, CC398 y CC130. No se detectaron resistencias a meticilina en cepas pertenecientes al CC121. Aunque la mayoría de aislados LA-MRSA analizados fueron multiresistentes (resistentes a tres o más clases de antibióticos), los aislados ST2855 mostraron resistencia a un mayor número de grupos de antibióticos, especialmente gran resistencia a macrólidos. Entre las lesiones donde se aisló *S. aureus* hubo asociación significativa entre la hepatitis y la metritis con LA-MRSA. Por otra parte, otro de los antibióticos de gran importancia en salud pública es la vancomicina, destinado al tratamiento de infecciones resistentes a meticilina. Ninguno de los aislados LA-MRSA presentó resistencia a vancomicina.

Nuevos retos, nuevas herramientas: StaphyMAP

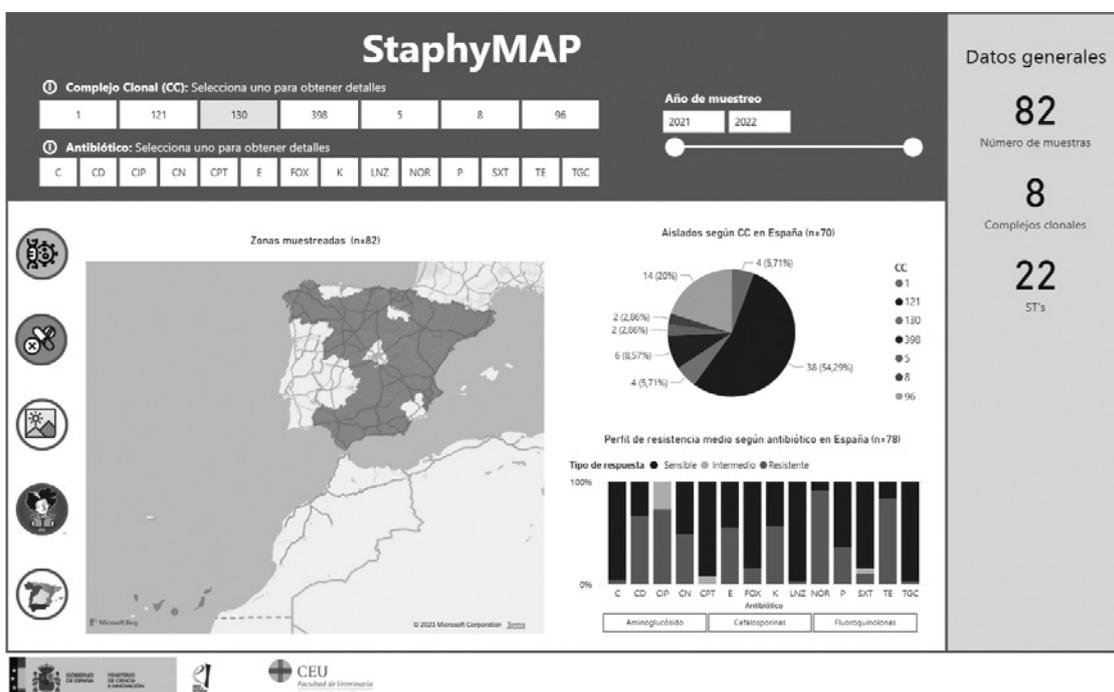
Una de las conclusiones que se extraen de la anterior revisión bibliográfica sobre las infecciones estafilocócicas en cunicultura es la importancia de seguir investigando la evolución y las características de las cepas de *S. aureus* asociadas a conejos, así como mejorar la comprensión de la interacción entre estos animales y la bacteria. A pesar de ser una enfermedad de difícil solución, este conocimiento incrementará las posibilidades de mejora en la prevención y el tratamiento de las infecciones en cunicultura y minimizará las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad. Para facilitar la consecución de este objetivo se ha llevado a cabo el diseño de una aplicación (StaphyMAP), diseñada para cumplir dos grupos de objetivos. Por una parte, se plantearon objetivos de diseño y, por otra parte, se plantearon objetivos de funcionalidad. En cuanto a los objetivos de diseño se pretendió que la aplicación fuera (i) atractiva visualmente, (ii) intuitiva para que pudiera ser utilizada sin necesidad de una formación previa e (iii) interactiva para que la experiencia de usuario fuera lo más satisfactoria posible. En cuanto a los objetivos de funcionalidad se pretendió que la aplicación fuera útil para:

- **Investigación.** Mediante el uso de StaphyMAP se pretende responder algunas preguntas de interés científico tales como determinar el origen y distribución de las cepas observadas en la península ibérica.
- **Formativo.** Con esta aplicación se pretende generar una herramienta que ayude a los veterinarios actuales y futuros a incrementar sus conocimientos sobre los problemas generados por *S. aureus* en cunicultura.

• **Toma de decisiones a nivel de granja.** La información sobre la sensibilidad antibiótica de las cepas de *S. aureus* puede ser ayudar al veterinario a tomar una decisión en cuanto al antibiótico a utilizar, en un primer momento, mientras recibe resultados laboratoriales, reduciendo el empleo de antibióticos de amplio espectro, más susceptibles de generar resistencias.

Para el desarrollo de la aplicación se utilizó Power BI®, que es la herramienta de Business Intelligence de Microsoft. Esta herramienta permite realizar consultas a multitud de fuentes de información, así como relacionar y analizar los datos con el objetivo de mostrarlos de una forma sencilla e intuitiva para el usuario final. Los datos introducidos pueden ser muy diversos en formato (texto, número, ubicaciones, url, imagen, etc.) y en origen (ficheros Excel, Web, Bases de datos, ubicaciones en la nube, etc.). Todo esto, hace que Power BI sea una herramienta muy flexible y capaz de adaptarse a los objetivos marcados.

Figura 1. Pantalla principal de la aplicación StaphyMAP



El acceso a la herramienta se realiza vía web a través de cualquier navegador. Una vez se ha accedido con las credenciales necesarias se muestra la pantalla principal. Esta pantalla principal se encuentra dividida en cuatro zonas (Figura 1). La zona 1, ubicada en la parte superior, está diseñada para seleccionar la información que se desea visualizar. En este caso, se ha configurado para seleccionar la información según el tipo de Complejo Clonal (CC), antibiótico o fecha de toma de muestra. En la zona 2 aparece la información agregada en varios gráficos. Los valores y el significado de la información mostrada en cada gráfico varían según los criterios seleccionados en la zona 1. En este sentido, se muestra un mapa donde la intensidad del color puede indicar la proporción de veces que se ha encontrado un determinado CC o puede mostrar el grado de resistencia a un determinado antibiótico en una zona. En la zona 3 se muestran datos generales sobre el número de muestras analizadas, granjas muestreadas, etc. Esta información también se recalcula dependiendo de los criterios seleccionados en la zona 1. Finalmente, en la zona 4 se presenta un menú de botones a través del cual se puede acceder a otras funcionalidades de la aplicación. Desde este menú se puede acceder a (i) detalles sobre los CC encontrados, (ii) información sobre los antibióticos utilizados, (iii) una galería de imágenes con fotografías etiquetadas de las lesiones en la que se puede realizar búsquedas y acceder a otros datos. También se puede acceder a (iv) información publicada sobre *S. aureus* en cunicultura (científica y de divulgación) o (v) un mapa alternativo donde se muestra el complejo clonal predominante en cada zona.

Agradecimientos: Este proyecto está financiado por la Universidad CEU Cardenal Herrera (INDI22/11) y el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-117897RB-I00).

Bibliografía

- Agnoletti F, Mazzolini E, Bacchin C, Bano L, Berto G, Rigoli R, Muffato G, Coato P, Tonon E, Drigo I. 2014. First reporting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in an industrial rabbit holding and in farm-related people. *Vet Microbiol* 170:172-177.
- Corpa JM, Hermans K, Haesebrouck F, 2010. Main pathologies associated with *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review. *World Rabbit Sci* 17.
- Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NPJ. 2003. How Clonal Is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* 185:3307-3316.
- Guerrero I, Ferrian S, Penadés M, García-Quirós A, Pascual JJ, Selva L, Viana D, Corpa JM. 2015. Host responses associated with chronic staphylococcal mastitis in rabbits. *Vet J* 204:338-344.
- Hermans K, De Herdt P, Devriese LA, Godard C, Haesebrouck F. 2000. Colonisation of rabbits with *Staphylococcus aureus* after experimental infection with high and low virulence strains. *Vet Microbiol* 72:277-284.
- Hermans K, De Herdt P, Devriese LA, Hendrickx W, Godard C, Haesebrouck F. 1999. Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Vet Microbiol* 67:37-46.
- Hermans K, Devriese LA, Haesebrouck F. 2003. Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. *Vet Microbiol* 91:57-64.
- Herron-Olson L, Fitzgerald JR, Musser, JM, Kapur V. 2007. Molecular Correlates of Host Specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2:e1120.
- Jones RN. 2003. Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Semin Respir Crit Care Med* 24:121-134.
- Kloos WE. 1980. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol* 34:559-592.
- Lowder BV, Guinane CM, Ben Zakour NL, Weinert LA, Conway-Morris A, Cartwright RA, Simpson AJ, Rambaut A, Nübel U, Fitzgerald JR. 2009. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci* 106:19545-19550.
- Marshall C, McBryde E. 2014. The role of *Staphylococcus aureus* carriage in the pathogenesis of bloodstream infection. *BMC Res Notes* 7:428.
- Meulemans L, Hermans K, Duchateau L, Haesebrouck F. 2007. High and low virulence *Staphylococcus aureus* strains in a rabbit skin infection model. *Vet Microbiol* 125:333-340.
- 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.
- Muñoz-Silvestre A, Penadés M, Selva L, Pérez-Fuentes S, Moreno-Grúa E, García-Quirós A, Pascual JJ, Arnau-Bonachera A, Barragán A, Corpa JM, Viana D. 2020. Pathogenesis of Intradermal Staphylococcal Infections: Rabbit Experimental Approach to Natural *Staphylococcus aureus* Skin Infections. *Am J Pathol* 190:1188-1210.
- Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD, 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* 9:605-610.
- Penadés M. 2017. *Staphylococcus aureus* infections in rabbits from different genetic lines: study of the host, the bacterium and the bacterial-host interaction. CEU Cardenal Herrera University, Alfara del Patriarca (Valencia).
- Penadés M, Viana D, García-Quirós A, Muñoz-Silvestre A, Moreno-Grúa 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* 51:1-15.
- Perl TM, Cullen JJ, Wenzel RP, Zimmerman MB, Pfaller MA, Sheppard D, Twombly J, French PP, Herwaldt LA. 2002. Intranasal Mupirocin to Prevent Postoperative *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* 346:1871-1877.
- Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Götz F. 1999. Inactivation of the *dlt* Operon in *Staphylococcus aureus* Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides. *J Biol Chem* 274:8405-8410.
- Rosell JM, de la Fuente LF. 2018. Mastitis on Rabbit Farms: Prevalence and Risk Factors. *Animals* 8.
- Rosell JM, de la Fuente LF. 2009. Culling and mortality in breeding rabbits. *Prev Vet Med* 88:120-127.
- Segura P, Martínez J, Peris B, Selva L, Viana D, Penadés JR, Corpa JM. 2007. Staphylococcal infections in rabbit does on two industrial farms. *Vet Rec* 160:869-872.
- Selva L, Viana D, Corpa JM. 2015. *Staphylococcus aureus* nasal carriage could be a risk for development of clinical infections in rabbits. *World Rabbit Sci* 23:181-184.
- Smith TC. 2015. Livestock-Associated *Staphylococcus aureus*: The United States Experience. *PLoS Pathog* 11:e1004564-8.
- Sung JML, Lloyd DH, Lindsay JA. 2008. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiol (N Y)* 154:1949-1959.
- Tenover, FC, Gaynes RP. 2000. The epidemiology of *Staphylococcus* infections. En: Fischetti V. A., Novick RP, Ferretti JJ., Portnoy DA, Rood JJ. (Ed.). *Gram-Positive Pathogens*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 414-421.
- 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 B Infect Dis Vet Public Health* 53:418-422.
- Vancraeynest D, Haesebrouck F, Hermans K. 2007. Multiplex PCR assay for the detection of high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. *Vet Microbiol* 121:368-372.
- Viana D, Blanco J, Tormo-Más MÁ, Selva L, Guinane CM, Baselga R, Corpa JM, Lasa I, Novick RP, Fitzgerald JR, Penadés JR. 2010. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Mol Microbiol* 77:1583-1594.
- Viana D, Comos M, McAdam PR, Ward MJ, Selva L, Guinane CM, González-Muñoz BM, Tristan A, Foster SJ, Fitzgerald J, Penadés JR. 2015a. A single natural nucleotide mutation alters bacterial pathogen host-tropism. *Nat Genet* 47:361.
- Viana D, Selva L, Callanan JJ, Guerrero I, Ferrian S, Corpa JM. 2011. Strains of *Staphylococcus aureus* and pathology associated with chronic suppurative mastitis in rabbits. *Vet J* 190:403-407.
- Viana D, Selva L, Penadés M, Corpa JM. 2015b. Screening of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits. *World Rabbit Sci* 23:111-185.
- Viana D, Selva L, Segura P, Penadés JR, Corpa JM. 2007. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit lesions. *Vet Microbiol* 121:288-298.
- Wertheim HFL, Mells DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751-762.

GENÉTICA

Tendencias Genéticas en Tres Líneas de Conejo Seleccionadas por Eficiencia Alimentaria

Sánchez J P, Pascual M, Piles M.

Creación de una línea seleccionada por eficiencia alimentaria.

1. Criterios de selección

Blasco A, Martínez-Álvaro M

Evaluación de la calidad espermática en líneas de conejo seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada

Baeza M, Serrano D, Argente MJ, García ML

Tendencias Genéticas en Tres Líneas de Conejo Seleccionadas por Eficiencia Alimentaria

Genetic Trends in Three Rabbit Lines Selected for Feed Efficiency

Sánchez JP*, Pascual M, Piles M

1Programa de Genética y Mejora Animal, IRTA, 08140, Caldes de Montbui, España

*juanpablo.sanchez@irta.es

Resumen

Una mejora de la eficiencia en el uso del pienso tendrá consecuencias positivas tanto en el balance económico de las granjas como en su huella medioambiental. Con el objetivo de generar animales con mayor eficiencia alimenticia, hemos realizado un experimento de selección de 7 generaciones -34 lotes- para mejorar la eficiencia alimenticia en 3 líneas de conejos. Las líneas ADGR, RFI y GRP han sido seleccionadas para crecimiento bajo restricción de alimento, consumo de pienso residual individual y consumo de pienso residual promedio de la jaula (4 animales), respectivamente. A pesar de que los animales en las líneas ADGR y RFI se criaron en grupos (6 animales), como se usaron comederos electrónicos fue posible un registro individual del consumo. Los caracteres estudiados fueron la ganancia media diaria (GMD), el consumo medio diario de pienso (CMD) y el índice de conversión (IC = CMD / GMD). En la línea GRP los caracteres se registraron como promedio de jaula (n=873) mientras que en las líneas RFI (n=2.482) y ADGR (n=2.343) como registros individuales. Como tendencias genéticas se ofrecen los coeficientes de regresión sobre el año de nacimiento, de los valores genéticos predichos promediados para el año de nacimiento. Las predicciones del valor de cría se obtuvieron con REML. Las tendencias genéticas estimadas en las líneas RFI y ADGR fueron 0,03 ((g/d)/año) (P>0,05) y 1,20 ((g/d)/año) (P<0,01) para GMD; -1,79 ((g/d)/año) (P<0,01) y 0,34 ((g/d)/año) (P<0,05) para CMD; y -0,09 ((g/d)/g/d)/año) (P<0,01) y -0,01 (((g/d)/(g/d))/año) (P<0,05) para IC. En la línea GRP las tendencias genéticas fueron 0,04 ((g/d)/año) (P>0,05), -1,67 ((g/d)/año) (P<0,01) y -0,07 (((g/d)/(g/d))/año) (P<0,01), para GMD, CMD e IC, respectivamente. Podemos concluir que las tres estrategias de selección implementadas para mejorar la eficiencia alimenticia en conejos alojados en grupo parecen estar siendo ser efectivas.

Palabras clave: Eficiencia Alimentaria, Selección, Genética, Comederos electrónicos, Conejos.

Abstract

An improvement of the efficiency in the use of the feed will have positive consequence on both the economic balance of the rabbitries and on their environmental fingerprint. Aiming to generate animals with enhanced feed efficiency we have conducted a selection experiment for 7 generations -34 batches- to improve feed efficiency in 3 rabbit lines. ADGR, RFI and GRP lines have been selected for growth under feed restriction, individual residual feed intake and cage-average (4 animals) residual feed intake, respectively. In spite of animals in lines ADGR and RFI were raised in groups (6 animals), as we used electronic feeders an individual recording of the feed intake was possible. The studied traits were average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI) and feed conversion ratio (FCR=ADFI/ADG). In the line GRP they were cage-average records (n=873) while in RFI (n=2,482) and ADGR (n=2,343) lines they were individual records. The reported genetic trends are the regression coefficients of the within year-of-birth average predicted breeding values on the year-of-birth. Breeding value predictions were obtained with REML. The estimated genetic trends in RFI and ADGR lines were 0.03 ((g/d)/year) (P>0.05) and 1.20((g/d)/year) (P<0.01) for ADG; -1.79 ((g/d)/year) (P<0.01) and 0.34 ((g/d)/year) (P<0.05) for ADFI; and -0.09 ((g/d)/g/d)/year) (P<0.01) and -0.01 (((g/d)/(g/d))/year) (P<0.05) for FCR. In the line GRP the genetic trends were 0.04 ((g/d)/year) (P>0.05), -1.67 ((g/d)/year) (P<0.01) and -0.07 (((g/d)/(g/d))/year) (P<0.01), for ADG, ADFI and FCR, respectively. It can be concluded that the three selection strategies implemented to improve feed efficiency of rabbits raised in groups are being effective.

Keywords: Feed Efficiency, Selection, Genetic, Electronic Feeders, Rabbits.

Introducción

Los costes de alimentación suponen hasta un 60-70% (Cartuche *et al.*, 2014) del total de los costes de producción de las granjas cunícolas. Una reducción del consumo de pienso favorecerá la rentabilidad, y limitará la excreción al ambiente de moléculas contaminantes (Hegarty *et al.*, 2017). En el año 2018 iniciamos tres procesos de selección para incrementar la eficiencia alimentaria siguiendo distintas estrategias de selección directa, la particularidad de estos procesos es que los candidatos se crían en grupo, mientras que en experimentos previos la cría se ha hecho en jaulas individuales (Drouilhet *et al.*, 2013). Esto es importante porque a nivel comercial los animales se crían en grupo y los efectos de interacción social pueden ser importantes (Piles *et al.*, 2017). Nuestro objetivo es estimar las tendencias genéticas para los caracteres implicados en la eficiencia alimentaria de las tres líneas.

Material y métodos

Las tres poblaciones bajo estudio son: ADGR, seleccionada por crecimiento diario bajo restricción; RFI, selecciona por consumo de pienso residual individual; y GRP, selecciona por el consumo de pienso residual del grupo, siendo la unidad de selección la jaula. La información para las evaluaciones son los registros individuales del peso del animal y de su consumo utilizando comederos electrónicos (Sánchez *et al.*, 2018) en las líneas ADGR y RFI o bien el consumo y peso del grupo en la línea GRP. Más detalles de los procesos de selección se pueden encontrar en Sánchez *et al.* (2019). La selección abarca 7 generaciones en 34 lotes. Los caracteres analizados en este estudio fueron la ganancia de peso media diaria (GMD), el consumo medio diario (CMD) y el índice de conversión ($IC = \text{CMD}/\text{GMD}$) utilizando las medias del grupo en la línea GRP o información individual en las otras dos. Las estimas de tendencias genéticas que se ofrecen son los coeficientes de regresión, sobre el año de nacimiento, de las medias de las predicciones de valor genético de los animales nacidos un mismo año. Las predicciones de valor genético se obtuvieron ajustando diferentes modelos (Piles y Sánchez, 2019) mediante REML.

Resultados y discusión

En la **Tabla 1** se muestran estadísticos descriptivos de las tres líneas implicadas en el estudio. Como el período de estudio excluye la fase inicial post-destete los índices de conversión que se observan son más elevados que los podríamos haber obtenido si se hubiese incluido la primera semana post-destete.

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de los caracteres bajo estudio en cada una de las líneas

	ADGR(n=2.343)		RFI(n=2.482)		GRP(n=873)*	
	Media	Varianza	Media	Varianza	Media	Varianza
Peso 42d (Kg)	1,24	0,05	1,23	0,05	1,22	0,03
Peso 60d (Kg)	1,91	0,06	2,02	0,06	2,08	0,03
Ganancia Media Diaria (g/d)	37,71	61,67	44,68	56,27	48,62	38,67
Consumo Medio Diario (g/d)	140,45	1.808,72	157,01	1598,12	169,09	679,00
Índice de Conversión ((g/d)/(g/d))	3,83	1,49	3,58	0,39	3,51	0,28

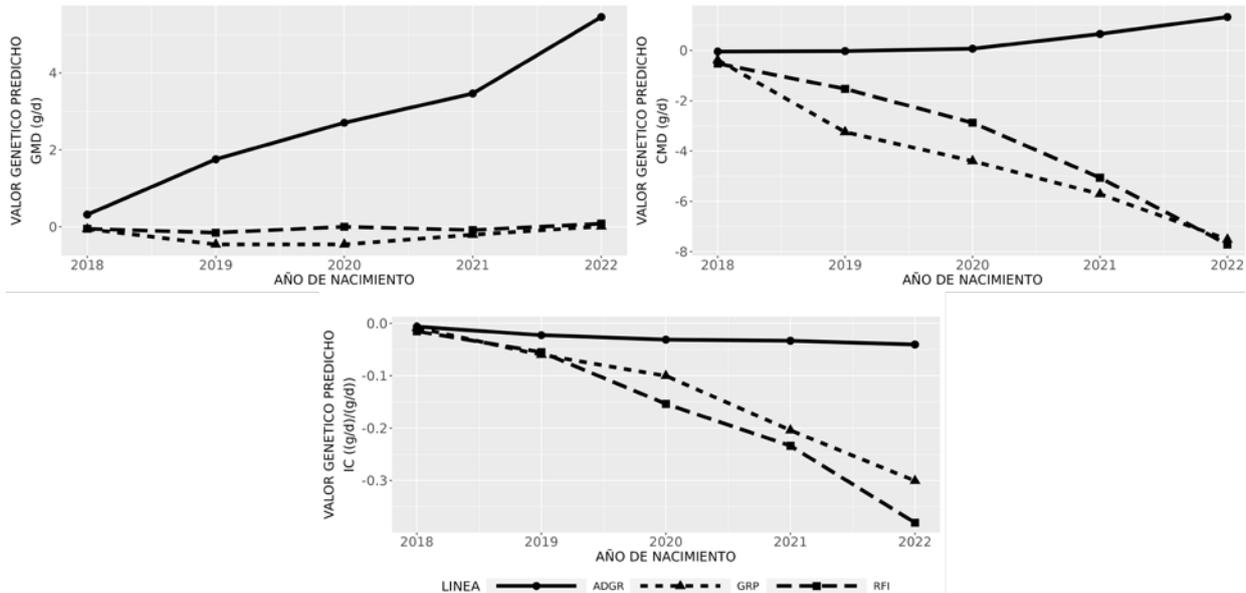
*En la línea GRP los estadísticos se refieren a promedio de la jaula, en el resto de las líneas a los datos individuales.

Se puede apreciar cómo el efecto de la restricción en la línea ADGR, más allá de las respuestas genéticas que se pudieran haber conseguido, supone una reducción de crecimiento, respecto a la línea GRP de unos 10-11 g/d. En la línea ADGR la restricción se hacía limitando el tiempo de acceso al comedero a 12 horas durante el periodo nocturno. Esto supuso, en promedio, un consumo del 83% de lo que consume la línea GRP que se alimenta con comederos convencionales a voluntad. En la línea RFI también parece haber una cierta restricción alimentaria (92%) con respecto al consumo de la línea GRP, esto podría deberse a que, si bien el acceso al pienso de los animales RFI es continuo, para los animales. Este ligero menor consumo va acompañado de un crecimiento 4 g/d menor. La interpretación de estas diferencias entre las líneas se ha de hacer con precaución porque en ellas se confunde por un lado el modo de alimentación, y como ya se ha dicho, la posible respuesta que en las distintas poblaciones vamos acumulando durante el proceso de selección.

Las tendencias genéticas (**Figura 1**) estimadas en las líneas RFI y ADGR fueron 0,03 ((g/d)/año) ($P > 0,05$) y 1,20((g/d)/año) ($P < 0,01$) para GMD; -1,79 ((g/d)/año) ($P < 0,01$) y 0,34 ((g/d)/año) ($P < 0,05$) para CMD; y -0,09 ((g/g)/año) ($P < 0,01$) y -0,01 (((g/d)/(g/d))/año) ($P < 0,05$) para IC. En la línea GRP las tendencias genéticas estimadas

fueron: 0,04 ((g/d)/año) ($P>0,05$), -1,67 ((g/d)/año) ($P<0,01$) y -0,07 (((g/d)/(g/d))/año) ($P<0,01$), para GMD, CMD e IC, respectivamente. Estas tendencias se corresponden bien con las respectivas estimas de heredabilidad, que para la línea RFI fueron: 0,16(0,04), 0,07(0,03) y 0,16(0,04), para GMD, CMD e IC, respectivamente; para la línea ADGR: 0,21(0,05), 0,02(0,02) y 0,02(0,02); y para la línea GRP 0,08(0,11), 0,08(0,09) y 0,19(0,14). Las tendencias genéticas para GMD nunca se acompañaron de tendencias ambientales, pero para CMD e IC en la línea RFI sí se observaron tendencias ambientales de signo contrario a las genéticas, un indicio de sobreestimación de las segundas. Estas tendencias ambientales pueden explicarse por cambios a lo largo del proceso de selección en los parámetros de configuración de los comederos electrónicos.

Figura 1. Tendencias Genéticas por Línea y Carácter.



GMD: ganancia de peso media diaria; CMD: consumo medio diario; IC: Índice de conversión.

En conclusión, la selección para la mejora de la eficiencia alimentaria parece estar siendo efectiva en las tres poblaciones. No obstante, estos resultados de respuesta basados en tendencias genéticas se están validando con experimentos que incluyen una población control no seleccionada.

Agradecimientos

Financiado por los proyectos PID2021-128173OR-C21, RTI2018-097610-R-I00 y RTA2014-00015-C02-0. Agradecemos el trabajo e implicación del personal de la granja cunícola IRTA.

Bibliografía

Cartuche L, Pascual M, Gómez EA, Blasco A. 2014. Economic weights in rabbit meat production. *World Rabbit Sci*, 22: 165-177.

Drouilhet L, Gilbert H, Balmisse E, Ruesche J, Tircazes A, Larzul C, Garreau H. 2013. Genetic parameters for two selection criteria for feed efficiency in rabbits. *J Anim Sci* 91:3121-3128.

Hegarty RS, Goopy JP, Herd RM, McCorkell B. 2007. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *J Anim Sci* 85:1479-1486

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. *Genet Sel Evol* 49(1):58.

Piles, M, Sánchez, JP. 2019. *J Anim Breed Genet* 136:474-483.

Sánchez JP, Piles M, Pascual M, Rafel O. 2018. Dispositivo para el control individual de consumo durante el engorde de conejos alojados en jaulas colectivas. Resultados Preliminares. En: *XLIII Symposium de Cunicultura de ASESCU*. Calamocha, Spain, pp 125-129.

Sánchez JP, Pascual M, Perucho O, Piles M. 2019. Selección para mejorar la eficiencia alimentaria de gazapos alojados en grupo usando comederos electrónicos. En: *XLIV Symposium de Cunicultura de ASESCU*. Aranda de Duero, Spain, pp 93-98.

Creación de una línea seleccionada por eficiencia alimentaria. 1. Criterios de selección

A new line selected for feed efficiency. 1. Selection criteria

Blasco A*, Martínez-Álvaro M

Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de València. Apartado 22012. València 46022.

**ablasco@dca.upv.es*

Resumen

Se examinan distintos posibles criterios para definir la eficiencia alimentaria, con el objeto de proponer al más adecuado para una línea de selección que actúe como macho terminal en la industria. Se comparan el índice de selección por consumo y velocidad de crecimiento, el índice de conversión de pienso en peso vivo, el consumo a crecimiento constante, el crecimiento a consumo constante, el consumo residual, y el crecimiento residual. Después de examinar sus ventajas e inconvenientes y sus relaciones, se concluye que el crecimiento a consumo constante o el crecimiento residual son preferibles a los otros.

Palabras clave: selección, eficiencia alimentaria, índice de conversión, consumo residual.

Abstract

Different criteria are examined to define feed efficiency, in order to propose the most suitable for a selection line that acts as terminal male in the industry. The selection index by feed intake and growth rate, the feed conversion ratio, the feed intake at constant growth, the growth at constant feed intake, the residual feed intake, and the residual growth rate are compared. After examining their advantages and disadvantages and their relationships, it is concluded that growth at constant feed intake or residual growth rate are preferable to the others.

Keywords: genetic selection, feed conversion rate, residual feed intake.

Introducción

En la Universidad Politécnica de Valencia se va a crear una línea de selección por eficiencia alimentaria. Esta línea es uno de los objetivos del Proyecto PID2020-115558GB-C21 del Plan Nacional de Investigación. El carácter eficiencia alimentaria es el más importante, junto con el tamaño de camada, en la producción cunícola (Cartuche *et al.*, 2014), por lo que es un objetivo claro de selección en las líneas de macho terminal. Hasta el momento, salvo en los experimentos de selección de Drohuillet *et al.* (2016) y Sánchez *et al.* (2021) la eficiencia se ha seleccionado en líneas comerciales indirectamente a través de la selección por velocidad de crecimiento. Sin embargo, en conejo, al contrario que en porcino o en aves, la correlación genética entre velocidad de crecimiento y eficiencia alimentaria, medida como índice de conversión de pienso en peso vivo, es muy baja (en torno a $-0,4$; Blasco *et al.*, 2018), por lo que la selección indirecta es poco eficaz. Es por ello que se pretende crear una línea directamente seleccionada por eficiencia alimentaria.

El primer paso es definir claramente cuál de los posibles criterios de selección por eficiencia alimentaria debe usarse. A continuación, compararemos distintos criterios y examinaremos sus relaciones, para acabar proponiendo uno de ellos como criterio de selección para mejorar el objetivo eficiencia alimentaria.

Criterios de selección

Supondremos que disponemos de los datos individuales de consumo de pienso entre destete y sacrificio, y de los pesos individuales al destete y al sacrificio. No supondremos que disponemos de pesos intermedios ni de datos de consumo intermedio. Supondremos que la alimentación es *ad libitum*, no consideraremos el caso de alimentación restringida.

Índice de selección (I): El índice de selección es el procedimiento óptimo desde el punto de vista económico, el que produce el máximo beneficio económico. Consiste en dar pesos económicos al consumo y al crecimiento, estimar sus parámetros genéticos (varianzas y covarianzas genéticas) y fenotípicos y calcular los pesos del índice para que el beneficio económico sea máximo. Los caracteres se suponen centrados; esto es, precorregidos por efectos ambientales (habitualmente efectos fijos como el tipo de pienso o la tanda). Los detalles se pueden encontrar en Blasco (2021).

Índice de conversión (IC): Es el método más tradicional para seleccionar por eficiencia alimentaria. Consiste en seleccionar los animales con menor cociente Consumo/Crecimiento.

Consumo a crecimiento constante (CoCrC): Consiste en seleccionar a los animales que menos consumen en un periodo dado para un crecimiento determinado en el mismo periodo. Para estimarlo, se corrige el consumo en un periodo determinado (normalmente del destete al sacrificio) por el crecimiento durante el mismo periodo, mediante una ecuación de regresión.

Crecimiento a consumo constante (CrCoC): Consiste en seleccionar a los animales que más crecen en un periodo dado para un consumo de pienso determinado en el mismo periodo. Para estimarlo se corrige el crecimiento durante el mismo periodo en que se mide el consumo (normalmente del destete al sacrificio) por el consumo durante ese periodo, mediante una ecuación de regresión.

Consumo residual (CoR): Es el consumo a peso constante, corregido por necesidades de mantenimiento. Se calcula como el consumo a peso constante añadiendo un término a la ecuación de regresión: el peso medio del periodo medido, o el peso medio elevado a 0,75 (que son las necesidades de mantenimiento del animal adulto), o el peso medio elevado a otra potencia que represente las necesidades de mantenimiento en crecimiento (p. ej. en cerdos se usa en ocasiones 0,60, Noblet *et al.*, 1999).

Crecimiento residual (CrR): Es el crecimiento a consumo constante corrigiendo por necesidades de mantenimiento. Se calcula como el crecimiento a consumo constante añadiendo un término a la ecuación de regresión: el peso medio del periodo medido, o el peso medio elevado a 0,75, o el peso medio elevado a otra potencia que represente las necesidades de mantenimiento en crecimiento.

Material y métodos

Analizamos una base de datos proporcionada por el profesor de nuestro Instituto Enrique Blas. Consiste en datos de 293 gazapos en crecimiento a los que se les midió el peso al destete (4 semanas de edad) y al sacrificio (9 semanas de edad) y su consumo de pienso en ese periodo. Los conejos fueron alimentados con 10 piensos distintos y medidos en 5 tandas. Todos fueron engordados en la misma nave con el mismo manejo y las mismas condiciones ambientales.

Los análisis de regresión para los criterios de selección fueron hechos con programas en lenguaje R. Antes de estimar los criterios de selección, los caracteres consumo y crecimiento fueron precorregidos por los efectos fijos de tanda y pienso. Los parámetros genéticos del índice I fueron tomados de la literatura (revisión de Blasco *et al.*, 2018), y los pesos económicos calculados con los datos de lonjas que proporciona ASESCU y con datos propios para el precio del pienso. A cada individuo se le asignó un valor para cada uno de los criterios de selección establecidos y se calcularon las correlaciones entre criterios.

Resultados y discusión

El criterio de selección más eficaz desde el punto de vista económico es, por la forma en la que está construido, el índice de selección I por consumo y crecimiento. Este procedimiento tiene dos inconvenientes. El primero es un inconveniente menor; consiste en que un individuo puede ser seleccionado preferentemente por su bajo consumo, su elevado crecimiento o por una combinación de ambos; puede que no se seleccionen los caracteres en una sola dirección. El segundo inconveniente, mucho más serio, es que el índice debe incluir los parámetros genéticos verdaderos, y hacen falta miles de datos para estimarlos con precisión; los índices varían mucho en función de los parámetros genéticos estimados. Los pesos económicos se estiman con más facilidad y los índices son menos sensibles a errores en estos pesos. En la práctica los índices se van ajustando según se va viendo el progreso genético; por ejemplo, dando más peso a un carácter que no ha progresado suficiente-

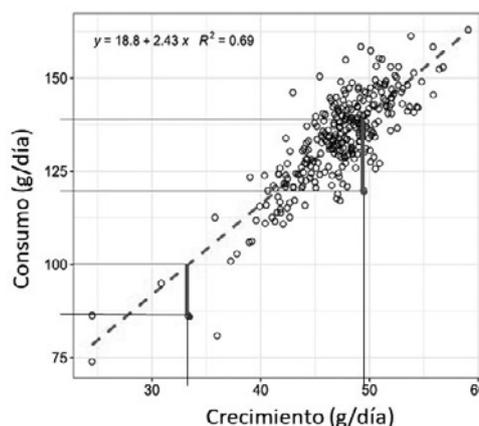
mente respecto al otro. El índice es en teoría el mejor método, pero el índice que en realidad se aplica puede estar lejos del que realmente interesa, y esta es una de las causas por las que han aparecido criterios distintos enfocados a seleccionar la eficacia sin depender de la estima los parámetros genéticos. Los criterios alternativos más comúnmente usados son el índice de conversión (IC) y el consumo residual (CoR).

El índice de conversión ha sido criticado por varias razones. En primer lugar, un individuo puede tener un buen índice por consumir poco, crecer mucho o por situaciones intermedias, por lo que, como en el caso de los índices de selección, no se va preferentemente en una dirección, pero en este caso consumo y crecimiento no están sopesados para dar el máximo beneficio económico. En segundo lugar, la distribución del IC no es normal (es un cociente entre distribuciones normales correlacionadas), lo que genera algunas dificultades de tipo estadístico. Estas críticas afectan a todos los caracteres que se expresan como cocientes, y resulta curioso que otros caracteres del tipo cociente como la supervivencia, el rendimiento de la canal o el contenido en carne no se vean sometidos a las mismas críticas. En cualquier caso, para evitar los problemas de los cocientes, se propuso usar el Consumo residual como alternativa. Además de estas críticas, en la práctica la selección afecta más al carácter más variable del cociente, por lo que se tiende a seleccionar como más eficaces a los individuos que consumen menos, lo que a la larga podría presentar problemas (por ejemplo, al reducir el apetito se reducen las reservas de grasa en las hembras, que son necesarias en la lactación; Gilbert *et al.*, 2012, en cerdos).

El Consumo a crecimiento constante es otra forma de medir la eficiencia: se calcula una ecuación de regresión del consumo teniendo como variable dependiente el crecimiento, se estiman los residuos de la ecuación y se selecciona por los menores residuos. Biológicamente hablando es como seleccionar a los animales que han consumido menos pienso como si todos hubieran crecido igual. En la **Figura 1** se observa la relación entre crecimiento y consumo. Se supone que para un crecimiento de 30, 40, 50 o 60 g/día los individuos deberían haber consumido los valores que están sobre la línea discontinua, y los que consumieron menos (por ejemplo, los residuos que están representados por las dos líneas verticales de mayor grosor) son los seleccionados.

El consumo residual (CoR) tiene en cuenta que el pienso se usa como energía de mantenimiento y energía para producir tejidos, órganos, etc., por lo que pretende estimar el consumo destinado a producción y descontar el de mantenimiento; esto es, mide el consumo no sólo como si los animales hubieran crecido igual sino también como si tuvieran las mismas necesidades de mantenimiento. El uso generalizado de la corrección que se conoce como peso metabólico (el peso elevado a la potencia de 0,75) es discutible, ya que ese coeficiente se refiere sólo a animales adultos, y no es el mismo que el de animales en crecimiento (que varía con el tiempo). Por otra parte, aunque desde el punto de vista de la mejora de la eficiencia alimentaria es razonable descontar la energía de mantenimiento, desde el punto de vista económico sólo el pienso total consumido tiene relevancia.

Figura 1. Relación entre consumo de pienso y crecimiento



Tanto el Consumo a crecimiento constante como el Consumo residual tienen el mismo inconveniente que el índice de conversión: reducen el apetito con consecuencias a largo plazo no deseadas. Por otra parte, en ambos casos se supone que el residuo mide directamente la eficiencia en la utilización del alimento, pero en realidad el residuo incluye todos los efectos aleatorios no dependientes de la eficiencia que no se han considerado en el modelo; por ejemplo, si se mide a un animal antes de que haya comido se tendrá un peso menor que si se le mide nada más comer; lo mismo ocurre si se le mide con la vejiga de la orina y el intestino llenos o no, y de muchos otros factores. Es por eso que es conveniente estimar la parte genética del residuo para seleccionar (me-

diante un BLUP, por ejemplo) pero esto genera un nuevo problema, porque lo que se obtiene no es un residuo sino una estima de un residuo; esto implica que se toman los residuos como verdaderos a la hora de calcular parámetros genéticos o cualquier otro parámetro, y no se tiene en cuenta el error de estimación ni el hecho de que los residuos están incorrelacionados pero las estimas de los residuos no.

El Crecimiento a consumo constante y el Crecimiento residual pretenden mejorar la eficiencia alimentaria seleccionando a los animales que más crecen para una cantidad de consumo determinada. Esto no quiere decir que se les someta a restricciones alimentarias, sino que simplemente se ha corregido el crecimiento por el consumo de pienso, teniendo también en cuenta en el crecimiento residual el pienso empleado en energía de mantenimiento. La ventaja de estos criterios es que no tienen el inconveniente de la pérdida de apetito que conllevan los tres criterios anteriores. Además, desde el punto de vista de la compañía de mejora genética animal que los aplique, tienen la ventaja de que además de mejorar la eficiencia alimentaria aumentan la velocidad de crecimiento, que es algo que el ganadero ve, mientras que es más difícil que aprecie el consumo de pienso. Estos criterios tienen, de todas formas, los mismos problemas estadísticos que los anteriores. Para resolverlos, Piles *et al.* (2007) propusieron una solución usando estadística Bayesiana; esta solución es computacionalmente más compleja, pero perfectamente factible de implementar en un programa de mejora genética.

En ocasiones se han propuesto índices de selección que incluyen alguno de estos criterios (normalmente FCR) junto a consumo y crecimiento. Esto da lugar a índices más complejos y no necesariamente óptimos, por lo que en general no es recomendable.

En la **tabla 1** se muestran las correlaciones entre los criterios.

Tabla 1. Correlaciones entre los criterios de selección. Correlaciones de Pearson (error estándar) por encima de la diagonal y correlaciones de Spearman por debajo de la diagonal.

	I	IC	CoCrC	CrCoC	CoR	CrR
I		0,34 (0,05)	0,58 (0,04)	-0,04 (0,06)	0,55 (0,04)	-0,03 (0,06)
IC	0,41		0,95 (0,01)	-0,94 (0,01)	0,90 (0,01)	-0,74 (0,03)
CoCrC	0,60	0,97		-0,83 (0,02)	0,95 (0,01)	-0,65 (0,03)
CrCoC	-0,12	-0,94	-0,83		-0,79 (0,02)	0,78 (0,02)
CoR	0,56	0,90	0,94	-0,78		-0,42 (0,05)
CrR	-0,11	-0,73	-0,66	0,78	-0,42	

I: Índice de selección. IC: Índice de conversión. CoCrC: Consumo a crecimiento constante. CrCoC: Crecimiento a consumo constante. CoR: Consumo residual. CrR: Crecimiento residual

Las elevadas correlaciones entre criterios sugieren que los individuos que serían seleccionados serían en gran parte los mismos, o bastante individuos similares. El índice de selección da valores de correlación inferiores, pero, como dijimos, es sensible a los parámetros usados e índices distintos darían resultados diferentes.

Con todos los argumentos expuestos, el Crecimiento a consumo constante o el Crecimiento residual podrían ser criterios sencillos de implementar y una forma de mejorar la eficiencia alimentaria sin disminuir el apetito y que al mismo tiempo aumentara la velocidad de crecimiento, algo que los ganaderos fácilmente aprecian. Un estudio más detallado debería hacer un análisis de robustez del índice y estimar la respuesta esperada en cada uno de los casos, antes de tomar una decisión definitiva.

Agradecimientos

Agradecemos a Enrique Blas que pusiera a nuestra disposición su base de datos para este trabajo. Financiado por el proyecto PID2020-115558GB-C21. MMA agradece la ayuda RYC2021-032618-I al Ministerio de Ciencia e Innovación, financiada por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y por European Union NextGenerationEU/PRTR

Bibliografía

Blasco A, Nagy I, Hernandez P. 2018. Genetics of growth, carcass and meat quality in rabbits. *Meat Sci* 145: 178-185.

Blasco A. 2021. *Mejora genética animal. Síntesis. Madrid*

Cartuche L, Pascual M, Gómez EA, Blasco A. 2014. Economic weights in Rabbits. *World Rabbit Science* 22: 165-177.

Drouilhet L, Achard CS, Zemb O, Molette C, Gidenne T, Larzul C, 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: 38-48.

Gilbert H, Bidanel JP, Billon Y, Lagant H, Guillouet P, Sellier P., Noblet J, Hermes S. 2012. Correlated responses in sow appetite, residual feed intake, body composition, and reproduction after divergent selection for residual feed intake in the growing pig. *J Anim Sci* 90:1097-1108.

Noblet J, Karege C, Dubois S, van Milgen J. 1999. Metabolic Utilization of Energy and Maintenance Requirements in Growing Pigs: Effects of Sex and Genotype. *J Anim Sci* 77:1208-1216.

Piles M, García-Tomás M, Rafel O, Ramon J, Ibañez-Escriche N, Varona L. 2007. Individual efficiency for the use of feed resources in rabbits. *J Anim Sci* 85:2846-2853.

Sánchez JP, Perucho O, Pascual M, Rafel O, Piles M. 2021. Electronic feeder to record individual feed intake on rabbits raised in collective cages. 12th World Rabbit Congress, 1-3 July 2020, Nantes, Francia.

Evaluación de la calidad espermática en líneas de conejo seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada

Assessment of sperm quality in rabbit lines divergently selected for litter size variability

Baeza M, Serrano D, Argente MJ, García ML

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH),

Universidad Miguel Hernández, Ctra. de Beniel km 3,2, 03312 Orihuela, Spain

marina.baeza@goumh.umh.es.

*ablasco@dca.upv.es

Resumen

El objetivo de este trabajo es estudiar la respuesta correlacionada en calidad espermática de dos líneas seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada: línea High seleccionada para incrementar la variabilidad del tamaño de camada y línea Low seleccionada para disminuir la variabilidad. Para ello, se analizaron 136 muestras de semen procedentes de 34 conejos jóvenes de ambas líneas. Se extrajeron dos muestras de semen por macho cada 7 días durante 6 semanas y se analizaron los siguientes parámetros de calidad espermática: volumen, gel, motilidad, concentración, producción total, porcentaje de espermatozoides normales, porcentaje de espermatozoides con gota, porcentaje de espermatozoides anormales de cabeza, cola y pieza intermedia, porcentaje de acrosomas reaccionados y porcentaje de espermatozoides vivo y muertos. Los análisis estadísticos se realizaron con metodología bayesiana. Los resultados obtenidos indicaron que ambas líneas presentaron valores similares para el volumen (0,85 ml para la línea Low y 0,84 ml para la línea High), motilidad (4,50 y 4,68), concentración (21,88 y 24,98 millones de espermatozoides), porcentaje de espermatozoides normales (85,66 y 88,09%) y porcentaje de acrosomas reaccionados (2,37 y 2,62%). La línea Low presentó una mayor viabilidad espermática (88,77% de espermatozoides vivos) que la línea High (79,55%; $P = 95\%$). En conclusión, la selección por variabilidad del tamaño de camada parece que no ha producido una respuesta correlacionada en la calidad del semen en machos que inician su vida productiva, a excepción de la viabilidad que es superior en la línea seleccionada para homogeneizar el tamaño de camada.

Palabras clave: Resiliencia, respuesta correlacionada, selección, viabilidad espermática.

Abstract

The objective is to study the correlated response in sperm quality of two lines divergently selected for litter size variability: High line selected to increase litter size variability and Low line selected to decrease litter size variability. For this purpose, 136 semen samples from 34 young rabbits of both lines were analysed. Two semen samples per male were extracted every 7 days for 6 weeks and the following sperm quality parameters were analysed: volume, gel, motility, concentration, total production, percentage of normal spermatozoa, percentage of drop, percentage of abnormal head, tail and midpiece spermatozoa, percentage of reacted acrosomes and percentage of live and dead spermatozoa. Statistical analyses were performed using Bayesian methodology. Both lines showed similar values for volume (0.85 ml for the Low line and 0.84 ml for the High line), motility (4.50 and 4.68), concentration (21.88 and 24.98 million spermatozoa), percentage of normal spermatozoa (85.66 and 88.09%) and percentage of reacted acrosomes (2.37 and 2.62%). The Low line showed higher sperm viability (88.77% of live spermatozoa) than the High line (79.55%; $P = 95\%$). In conclusion, selection for litter size variability does not seem to have produced a correlated response in semen quality in males starting their productive life, except for viability which is higher in the line selected to homogenise litter size.

Keywords: correlated response, resilience, selection, semen viability.

Introducción

En cunicultura, se están llevando a cabo programas de mejora genética desde hace más de cuatro décadas para incrementar la productividad en las explotaciones ganaderas. Hoy en día, todos los eslabones de la cadena de producción, desde el ganadero hasta el consumidor, están concienciados en producir de forma rentable un producto de calidad y con unos estándares de bienestar (Agea *et al.*, 2020). La selección de dos líneas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada al nacimiento ha conducido a que la línea seleccionada para homogeneizar el tamaño de camada (línea Low) sea más resistente a enfermedades y al estrés, y por tanto tenga un mayor bienestar animal, que la línea seleccionada para aumentar dicha variabilidad (línea High, Argente *et al.*, 2019). Además, la productividad de la línea Low es superior a la de la línea High (Blasco *et al.*, 2017).

La línea Low tiene interés para los productores de carne de conejo pues puede ser utilizada como una de las líneas maternas en la obtención de la hembra híbrida del cruce a tres vías. La difusión de esta línea a los ganaderos se realizaría principalmente a través de las dosis de semen de sus machos. En este sentido, evaluar las características del semen proporciona información sobre su capacidad fecundante (Brun *et al.*, 2002), ya que las características seminales se ven afectadas por factores genéticos, de alimentación, estado de salud, condición de cría, estación y frecuencia de recogida (Alvariño, 2000).

El objetivo de este trabajo es estudiar la respuesta correlacionada en calidad espermática 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 2022/VSC/PEA/0226.

1. Material animal

Se analizaron 136 muestras de semen procedentes de 34 conejos jóvenes entre los 4,5 y 6 meses de edad. Los machos pertenecen a la generación 17 de selección de un experimento divergente por variabilidad ambiental en tamaño de camada (Blasco *et al.*, 2017). Los animales fueron alojados en la granja de la Escuela Politécnica de Orihuela de la UMH. Los animales se ubicaron en jaulas individuales y se les administró un pienso comercial. El acceso a la alimentación y el agua fue *ad libitum*. El ambiente fue controlado con un fotoperiodo de 16 L: 8D. Las temperaturas oscilaron entre 11-17 °C y la humedad relativa entre el 46-98%.

2. Diseño experimental

Se extrajeron dos muestras de semen por macho cada 7 días, con una separación de tiempo entre cada una de 30 minutos. La extracción se realizó a través de una vagina artificial de silicona, previamente calentada. En la muestra se analizó la presencia de gel, y se midió el volumen. La muestra se diluyó 1/1 con un medio tris-cítrico-glucosa y se midió la motilidad bajo microscopio con una lente de 40x en una escala del 0 (siendo el valor más bajo) al 5 (siendo el valor más alto). Por último, se analizó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos con una tinción de eosina/negrosina sobre una muestra de 100 espermatozoides. Las dos extracciones de un mismo macho se mezclaron y se realizó una dilución 1:9 con glutaraldehído al 0,2%. Se analizó la concentración de espermatozoides con una cámara Bürker, la producción total de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales, con gota, anormales de cola, anormales de cabeza, de pieza intermedia y de acrosoma reaccionado.

3. Modelo estadístico

El modelo estadístico incluyó las covariables del peso y la edad del macho y los efectos de línea (con 2 niveles, Low y High), semana (con 6 niveles, excepto para el porcentaje de vivos y muertos que fueron 5 niveles), gel (con 2 niveles, presencia y ausencia), animal y el error. En el caso del volumen, la motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos además se incluyó el efecto de orden de recogida (con 2 niveles, primera o segunda). Se utilizó metodología bayesiana con el programa Rabbit.

Resultados y discusión

La **tabla 1** muestra las diferencias en volumen, presencia de gel, motilidad, concentración y producción total entre las líneas seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada. Ambas líneas presentaron valores similares para estos caracteres. Por tanto, no se ha producido una respuesta correlacionada a la

selección para estos caracteres. Los valores obtenidos para el volumen fueron superiores a los observados por Fouda *et al.* (2022) para la línea APRI con el mismo fotoperiodo. También la motilidad presentó valores superiores en estudios anteriores de estas mismas líneas (Díaz *et al.*, 2021). La concentración y producción total de espermatozoides es muy inferior a los encontrados para machos adultos de la línea materna V criada en Alejandría (El-Gindy, 2021). García *et al.* (2004) observaron que las características seminales mejoran con la edad, siendo la edad de máxima producción entre los 10-18 meses de edad.

El porcentaje de espermatozoides normales fue alto y similar en ambas líneas (85%; $P = 63\%$, **Tabla 2**). Tampoco se ha producido una respuesta correlacionada en otros parámetros como el porcentaje de gota citoplasmática (alrededor de un 8%; $P = 69\%$), el porcentaje de anormales de cola (alrededor del 12,5%; $P = 72\%$), y el porcentaje de anormales de pieza intermedia y de acrosoma reaccionado ($P = 77\%$). Los valores de gota citoplasmática son superiores a los encontrados para estas mismas líneas por Díaz *et al.* (2021). Este resultado está justificado por la edad de los machos de este trabajo que acaban de empezar su vida productiva, lo que lleva asociado un mayor porcentaje de gota citoplasmática como un síntoma de inmadurez del macho. La calidad espermática es alta comparada con los resultados de El-Ratel *et al.* (2022) que obtuvo un mayor porcentaje de espermatozoides anormales tanto de cabeza como de cola. Además, la capacidad fecundante de los espermatozoides podría ser elevada, dado el bajo porcentaje de espermatozoides con el acrosoma reaccionado, similares a machos adultos de estas mismas líneas (Díaz *et al.*, 2021).

Tabla 1. Diferencias de las características del semen (I) entre las líneas Low y High.

	Línea		D	HPD _{95%}	P (%)
	Low	High			
Volumen (ml)	0,85	0,84	0,01	-0,12;0,13	56
Gel	0,40	0,36	0,04	-0,22;0,28	64
Motilidad	4,50	4,68	-0,18	-0,52;0,15	86
Concentración (10 ⁶ /ml)	21,88	24,98	-3,10	-13,85;8,16	70
Producción total (10 ⁶)	66,36	73,38	-7,02	-49,81;31,71	64

D: diferencia entre las líneas Low y High. HPD_{95%}: región de alta densidad al 95%. P: probabilidad de que la diferencia sea > 0 cuando $D > 0$, o sea < 0 cuando $D < 0$.

Tabla 2. Diferencias de las características del semen (II) entre las líneas Low y High.

Espermatozoides	Línea		D	HPD _{95%}	P (%)
	Low	High			
Normales (%)	85,70	85,09	0,57	-2,61;4,77	63
Gota (%)	8,94	8,06	0,88	-2,71;4,69	69
Anormales Cola (%)	12,21	13,18	-1,06	-4,52;2,39	72
Anormales Cabeza (%)	1,07	0,99	0,05	-0,42;0,54	58
Anormales Pieza intermedia (%)	0,92	0,72	0,20	-0,34;0,76	77
Acrosoma reaccionado (%)	2,37	2,62	-0,25	-0,96;0,49	77
Vivos (%)	88,77	79,55	9,22	-1,29;20,99	95
Muertos (%)	11,21	20,26	-9,05	-19,51;2,68	95

D: diferencia entre las líneas Low y High. HPD_{95%}: región de alta densidad al 95%. P: probabilidad de que la diferencia sea > 0 cuando $D > 0$, o sea < 0 cuando $D < 0$.

La viabilidad de los espermatozoides es superior en la línea Low (88,77% de espermatozoides vivos) que en la línea High (79,55 % de espermatozoides vivos; $P = 95\%$). Los valores obtenidos son superiores a los mostrados por Adeyemi *et al.* (2020) con la misma metodología de tinción.

En conclusión, la selección por variabilidad del tamaño de camada parece que no ha producido una respuesta correlacionada sobre la calidad del semen en machos que inician su vida productiva, a excepción de la viabilidad que es superior en la línea seleccionada para homogeneizar el tamaño de camada. Sin embargo, son necesarios más estudios que amplíen la edad de los machos y estudien la relación entre la calidad del espermatozoide con la fertilidad.

Agradecimientos

Este estudio forma parte del programa AGROALNEXT y ha sido financiado por MCIN con fondos de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17.11) y por la Generalitat Valenciana.

Bibliografía

- Adeyemi AA, Ibrahim OW, Ajayi OO, Ayeni ST. 2020. Semen indices, growth response and sperm reserve of male rabbits fed zinc supplemented diets. *World Rabbit Sci* 28: 199-206.
- Agea I, García ML, Argente MJ, Blasco A. 2020. Selección por variabilidad del tamaño de camada: una metodología indirecta para mejorar el bienestar de la coneja. *Boletín de cunicultura* 192: 29-31.
- Alvariño JMR. 2000. Reproductive performance of male rabbits. En: 7th World Rabbit Congress. Valencia, España, pp. 13-36.
- Argente MJ, García ML, Zbořilová K, Petruška P, Capcarová M, Blasco A. 2019. Correlated response to selection for litter size environmental variability in rabbits' resilience. *Animal* 13(10): 2348-2355.
- Blasco A, Martínez-Álvarez M, García ML, Ibáñez-Escriche N, Argente MJ. 2017. Selection for environmental variance of litter size in rabbits. *Genet Sel Evol* 49: 48-55.
- Brun JM, Theau-Clément M, Bolet G. 2002. The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 70: 139-149.
- Díaz JV, Argente MJ, García ML. 2021. Effect of postbiotic based on lactic acid bacteria on semen quality and health of male rabbits. *Animals* 11: 1007.
- El-Gindy YM. 2021. Improvement in quality and storage ability of rabbit semen by using black or thyme seed as dietary supplementation. *J Anim Physiol Anim Nutr* 106: 642-654.
- El-Ratel I, El-Moghazy M, El-Gaml A, El-Naser IA. 2022. Effects of propolis ethanolic extract administration on quality of fresh and cryopreserved semen, redox status, and sperm flow cytometry parameters of heat-stressed rabbit bucks. *Adv Anim Vet Sci* 10(12): 2578-2588.
- Fouda SF, El-Raghi AA, Abdel-Khalek E, Hassan MA, El-Ratel IT. 2022. Impact of lighting regimes on reproductive performance and sperm ultrastructure in rabbit bucks under very severe heat stress conditions. *Livest Sci* 255:104780.
- García ML, Andrés I, Caselles P, Lavara R. 2004. Estudio de la edad de los machos de conejo en la inseminación artificial. *Boletín de Cunicultura* 132: 17-25.

SOSTENIBILIDAD

**Caracterización de la Cunicultura como un Sistema
Agroalimentario Sostenible: revisión sistemática**
Manjarrez-Martínez NR, Aguilar-Ávila J, Aguilar-Gallegos N,
Sagarnaga-Villegas LM

Caracterización de la Cunicultura como un Sistema Agroalimentario Sostenible: revisión sistemática

Characterization of Cuniculture as a Sustainable Agrifood System: systematic review

Manjarrez-Martínez NR*, Aguilar-Ávila J, Aguilar-Gallegos N, Sagarnaga-Villegas LM

Centro de Investigaciones Económicas Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM) - Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230. México.

*nestor.manjarrez@ciestaam.edu.mx

Resumen

El objetivo de esta investigación fue analizar las principales características de la cunicultura como parte de un sistema alimentario sostenible, con la finalidad de aportar información descriptiva que contribuya a fomentar la producción, venta y consumo de carne de conejo en México como una fuente importante de proteína de alta calidad nutricional. Se llevó a cabo una revisión sistemática de literatura en la base de datos Scopus sobre la producción de carne de conejo y los sistemas alimentarios sostenibles. En las búsquedas de información se utilizaron las palabras clave "Rabbit production", "Rabbit farming", "Rabbit meat" y "sustainable food systems". Los mejores resultados obtuvieron fueron "sustainable food systems" (726), "Rabbit meat" (214) y "Rabbit production" (68). El 55 % de las publicaciones para "sustainable food systems" se concentra en Estados Unidos (164), Reino Unido (132) e Italia (101). Para "Rabbit meat", el 58 % de las publicaciones se concentra en Italia (47), China (29), Polonia (25) y España (24), mientras que para "Rabbit production", el 51 % de las publicaciones se realiza en España (35), Francia (10), Egipto (9) y México (8). Italia y China presentan un mayor número de publicaciones relacionadas con la carne de conejo, mientras que España y Francia se enfocan hacia la producción. La producción de carne de conejo se adapta a las características del medio rural en México (resiliente), participan todos los integrantes de la familia (inclusiva), tiene bajos costos de producción, alta rentabilidad (eficiente) y se puede aprovechar de manera integral (sostenible): carne (saludable), piel, vísceras y excretas. La cunicultura reúne las características deseables para los Sistemas Alimentarios sostenibles: es inclusiva, resiliente, saludable, sostenible y eficiente, puede contribuir al logro de la seguridad alimentaria, por lo que es necesario establecer estrategias para fomentarla.

Palabras clave: Carne de conejo, seguridad alimentaria, saludable, resiliente, eficiente.

Abstract

The objective of this research was to analyze the main characteristics of rabbit farming as part of a sustainable food system, in order to provide descriptive information that contributes to promoting the production, sale and consumption of rabbit meat in Mexico as an important source of protein of high nutritional quality. A systematic literature review was carried out in the Scopus database on rabbit meat production and sustainable food systems. The keywords "Rabbit production", "Rabbit farming", "Rabbit meat" and "sustainable food systems" were used in the information searches. The ones that obtained the best results were "sustainable food systems" (726), "Rabbit meat" (214) and "Rabbit production" (68). 55% of the publications for "sustainable food systems" are concentrated in the United States (164), the United Kingdom (132) and Italy (101). For "Rabbit meat", 58% of the publications are concentrated in Italy (47), China (29), Poland (25) and Spain (24), while for "Rabbit production", 51% of the publications are performed in Spain (35), France (10), Egypt (9) and Mexico (8). Italy and China present a greater number of publications related to rabbit meat, while Spain and France focus on production. Rabbit meat production is adapted to the characteristics of the rural environment in Mexico (resilient), all family members participate (inclusive), it has low production costs, high profitability (efficient) and can be used comprehensively (Sustainable): meat (healthy), skin, viscera and excreta. Rabbit farming meets the desirable characteristics for sustainable Food Systems: it is inclusive, resilient, healthy, sustainable and efficient, it can contribute to achieving food security, so it is necessary to establish strategies to promote it.

Keywords: Rabbit meat, food safety, healthy, resilient, efficient.

Introducción

Un Sistema Alimentario (SA) reúne todos los elementos y actividades integrales que van desde la producción, procesamiento, transporte, consumo y gestión de los residuos de los alimentos. Se contemplan medio ambiente, insumos, personas, procesos, instituciones, políticas públicas, entre otros. Los SA modernos deben contribuir a mejorar la seguridad alimentaria nutricional y en el logro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (HLPE, 2014). En ese sentido, la cunicultura es una actividad económica importante que se desarrolla en zonas rurales y que puede ser analizada bajo este enfoque. La producción de carne de conejo involucra a productores, proveedores, técnicos, rastros, procesadores y al consumidor final. Asimismo, genera alimentos saludables de alta calidad nutricional que aportan proteína, vitaminas y minerales a los consumidores (Baviera-Puig *et al.*, 2017). El objetivo de la presente investigación fue analizar mediante una revisión sistemática las principales características de la cunicultura como parte de un sistema alimentario sostenible, con la finalidad de aportar información descriptiva que contribuya a fomentar la producción, venta y consumo de carne de conejo en México como una fuente importante de proteína de alta calidad nutricional.

Material y métodos

En el desarrollo de esta investigación se llevó a cabo una revisión sistemática de literatura (Koutsos *et al.*, 2019) more complete, repeatable, and less biased type literature review that can successfully lead to evidence-based conclusions. This study attempts to develop a framework for systematic review with guidelines on how to conduct an effective systematic review for agricultural research. Systematic reviews require more time and effort but they can be used to conduct a comprehensive literature review, identifying potentially eligible articles on primary agricultural research and answering certain focused questions. A systematic review is also conducted as an example to examine whether systematic reviews are used in agricultural sciences. It was found that in the last two decades about a third (N = 29 out of 89 or 32.5% en la base de datos Scopus sobre la producción de carne de conejo y los SA sostenibles, sus relaciones e interacciones. Con base en lo anterior, en las búsquedas de información se utilizaron las siguientes palabras clave contenidas en el título, en el abstract o en las keywords de los artículos: TITLE-ABS-KEY ("Rabbit production"), TITLE-ABS-KEY ("Rabbit farming"), TITLE-ABS-KEY ("Rabbit meat"), TITLE-ABS-KEY ("sustainable food systems") y ("Rabbit production and sustainable food systems").

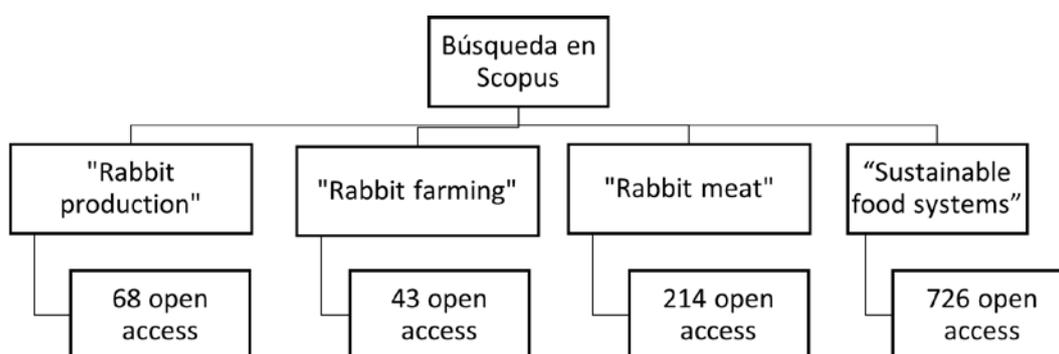
Se aplicaron tres filtros: año (2012 a 2023), tipo de documento (artículos y revisiones) y de acceso abierto (open Access). En el análisis de la información obtenida, se identificó el país y la revista que publican sobre estos temas.

En los resultados obtenidos se revisaron los artículos de interés y en algunos casos se descargaron los archivos completos (en pdf), con la finalidad de utilizarlos en el análisis de la presente investigación.

Resultados y discusión

En la búsqueda de información se obtuvieron diferentes resultados en cada una de las palabras clave. Las que mejores resultados presentaron fueron "Sustainable food systems" (726), "Rabbit meat (214) y "Rabbit production" (68) (Figura 1). La que obtuvo menores resultados fue la combinación de palabras clave "Rabbit production and sustainable food systems" (2).

Figura 1. Resultados de la búsqueda en Scopus por palabra clave.



El 55 % de las publicaciones para “sustainable food systems” se concentra en Estados Unidos (164), Reino Unido (132) e Italia (101). Las revistas con más publicaciones son Sustainability (ISSN:2071-1050) (109), Frontiers in Sustainable Food Systems (E-ISSN:2571-581X) (75) y Foods (E-ISSN:2304-8158) (24). En el caso de “Rabbit meat”, el 58 % de las publicaciones se concentra en Italia (47), China (29), Polonia (25) y España (24). Las revistas que más publican sobre este tema son: World Rabbit Science (E-ISSN:2076-2615) (26), Animals (E-ISSN:2076-2615) (17) y Meat Science (ISSN:0309-1740) (10). Para el caso de las palabras clave “Rabbit production”, el 51 % de las publicaciones se realiza en España (35), Francia (10), Egipto (9) y México (8), asimismo, las revistas con más publicaciones son World Rabbit Science (E-ISSN:2076-2615) (18), Animals (E-ISSN:2076-2615) (6) e Italian Journal of Animal Science (ISSN:1594-4077) (3). En los resultados obtenidos se observó que Italia y China presentan un mayor número de publicaciones relacionadas con la carne de conejo, mientras que España y Francia se enfocan hacia la producción.

En el análisis de los artículos relacionados con el tema de investigación, se obtuvo que la cunicultura es una actividad económica importante que presenta las cinco características deseables de los SA sostenibles modernos (International Food Policy Research Institute (IFPRI), 2021). En México la producción extensiva y semi intensiva de carne de conejo se adapta a las características del medio rural (resiliente), tiene bajos costos de producción, alta rentabilidad (eficiente) y se puede aprovechar de manera integral al 100% (sostenible): carne (saludable), piel y pelo (talabartería) (Jaramillo *et al.*, 2015). Al respecto, Lukefahr *et al.* (2004) relative to the success of several other species (cattle, swine, chickens and turkeys, señalan que las granjas cunícolas a baja escala son ideales para jóvenes que viven en áreas rurales y periurbanas, sobre todo cuando se cría como una especie de traspatio, debido a sus bajos costos de producción cuando son administrados de manera familiar, en los que la mano de obra se comparte entre sus miembros a un costo imperceptible.

El desarrollo y fomento de la cunicultura en México puede contribuir al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la agenda 2030, entre los que se pueden mencionar: Fin de la pobreza (1), Hambre cero (2), Salud y bienestar (3), Igualdad de género (5) y Producción y consumo responsable (12) (Tabla 1). La producción de carne de conejo es una alternativa ideal como fuente de proteína saludable y como producto sustituto de algunos tipos de carnes rojas, considerando los graves problemas de enfermedades crónico degenerativas que enfrenta la población mexicana (Olivares *et al.*, 2009). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el consumo de carne de conejo, debido a que favorece el desarrollo cognitivo y de las funciones del cuerpo en bebés, niños, adolescentes y adultos al ser rica en proteínas de alto valor biológico, aminoácidos esenciales, vitaminas B y minerales, además de tener bajo contenido de grasa, ácidos grasos y colesterol (Escribá-Pérez *et al.*, 2019) recommended by the World Health Organisation. However, the presence of children under 18 in the home has been found to decrease the frequency of rabbit meat consumption. If we focus on households with children under 18, 52.5% of minors do not consume rabbit meat. The main reason why children (intended as people under 18 yr old).

Tabla 1. Descripción de las características de los SA sostenibles presentes en la cunicultura.

Fuente	Características de los SA sostenibles modernos					ODS
	Inclusivos	Resilientes	Saludables	Sostenibles	Eficientes	
Baviera-Puig <i>et al.</i> , 2017.	✓		✓			1,2
Li <i>et al.</i> , 2018.		✓	✓		✓	2,3,12
Cullere y Dalle Zotte, 2018.			✓		✓	2,3,5
Montero-Vicente <i>et al.</i> , 2018.			✓		✓	1,2
Petrescu and Petrescu-Mag, 2018.	✓		✓		✓	2,3,5
Trocino <i>et al.</i> , 2019.			✓		✓	2,3,5
Escribá-Pérez <i>et al.</i> , 2019.		✓	✓		✓	2,3
Magalhães <i>et al.</i> , 2022.	✓		✓		✓	1,2,3,5

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible.

En la cunicultura participan jóvenes, mujeres, hombres y personas adultas (inclusiva) debido al fácil manejo de esta especie. Asimismo, se realizan prácticas integradoras para aprovechar todos los productos, subproductos y desechos de las granjas. Las excretas se pueden transformar en abonos orgánicos para su venta o uso en el culti-

vo de forrajes que complementen la dieta del conejo (Lukefahr et al., 2004) relative to the success of several other species (cattle, swine, chickens and turkeys. Cullere y Dalle Zotte (2018), señalan que el conejo tiene ventajas sobre otras especies, como son: tasa de crecimiento rápido, alta capacidad para utilizar alimentos fibrosos, madurez sexual temprana, corta duración de la gestación y producción de carne a bajo costo. Al respecto Aguilar et al. (2014), describen que la cunicultura es viable en términos económicos y financieros al analizar una unidad representativa de producción de 20 vientres en el estado de Hidalgo, México.

En conclusión, la cunicultura presenta las características deseables para los Sistemas Alimentarios sostenibles: es inclusiva, resiliente, saludable, sostenible y eficiente. La carne de conejo es saludable, de alto valor nutricional y puede contribuir al logro de la seguridad alimentaria, por lo que es necesario establecer estrategias para fomentar la producción, comercialización y consumo de este tipo de carne en México.

Bibliografía

- Aguilar GN, Olvera MJA, Rabanales MJL, Romero GM. 2014. Ingresos y costos de producción 2013: Unidades Representativas de Producción, Trópico Húmedo y Mesa Central - Peneles de productores. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Baviera-Puig A, Buitrago-Vera J, Escriba-Perez C, Montero-Vicente L. 2017. Rabbit meat sector value chain. *World Rabbit Science* 25:95-108.
- Cullere M, Dalle Zotte A. 2018. Rabbit meat production and consumption: State of knowledge and future perspectives. *Meat Science* 143:137-146.
- Escribá-Pérez C, Baviera-Puig A, Montero-Vicente L, Buitrago-Vera J. 2019. Children's consumption of rabbit meat. *World Rabbit Science* 27(3): 113-122.
- HLPE. 2014. Las Pérdidas y el Desperdicio de Alimentos en el Contexto de Sistemas Alimentarios Sostenibles. Un informe del Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición del Comité de Seguridad Alimentaria Mundial. Roma, 2014.
- International Food Policy Research Institute (IFPRI). 2021. Informe 2021 de políticas alimentarias mundiales: transformar los sistemas alimentarios después de la COVID-19: Sinopsis. International Food Policy Research Institute (IFPRI). Washington, DC.
- Jaramillo VJL, Vargas LS, Guerrero RJD. 2015. Preferencias de consumidores y disponibilidad a pagar por atributos de calidad en carne de conejo orgánico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 6(2):221-232.
- Koutsos TM, Menexes GC, Dordas CA. 2019. An efficient framework for conducting systematic literature reviews in agricultural sciences. *Science of the Total Environment* 682:106-117.
- Li S, Zeng W, Li R, Hoffman LC, He Z, Sun Q, Li H. 2018. Rabbit meat production and processing in China. *Meat Science* 145:320 - 328.
- Lukefahr SD, Cheeke PR, McNitt JI, Patton NM. 2004. Limitations of intensive meat rabbit production in North America: A review. *Canadian Journal of Animal Science* 84(3): 349-360.
- Magalhães LCC, Costa RB, De Camargo GMF. 2022. Consumption of rabbit meat in Brazil: Potential and limitations. *Meat Science* 191(May).
- Montero-Vicente L, Escribá-Pérez C, Baviera-Puig A, Buitrago-Vera J. 2018. Analysis of the commercial value of rabbit meat based on positioning of the different types of fresh meat. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(3).
- Olivares PR, Gómez CMA, Schwentesius RR, Carrera CB. 2009. Alternativas a la producción y mercadeo para la carne de conejo en Tlaxcala, México. *Región y Sociedad* 21:191-207.
- Padilla FC, Sagarnaga VLM. 2017. Competitividad de la cunicultura familiar en la zona centro de México. PRZEDSIĘBIORCZOŚCI ZARZĄDZANIE 2017.

Petrescu DC, Petrescu-Mag RM. 2018. Consumer behaviour related to rabbit meat as functional food. World Rabbit Science 26(4):321-333.

Trocino A, Cotozzolo E, Zomeño C, Petracci M, Xiccato G, Castellini C. 2019. Rabbit production and science: the world and Italian scenarios from 1998 to 2018. Italian Journal of Animal Science 18(1):1361-1371.

NUTRICIÓN

Uso de ácidos orgánicos en gazapos post-destete: Elección de acidificante y dosis

Ramón-Moragues A, Vaggi C, Franch J, Martínez-Paredes E, Peixoto-Gonçalves C, Ródenas L, López MC, Marín-García PJ, Blas E, Pascual JJ, Cambra-López M

Entrenamiento de las conejas durante la recría: efecto sobre la flexibilidad de las reservas corporales y la reproducción a largo plazo

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

Efecto del nivel de calcio sobre los rendimientos productivos de gazapos en crecimiento

de la Cruz P, del Pozo R, Martín L, Rybicka A, Velasco B, Nicodemus N, García J

Efecto de la inclusión de productos de algas sobre la digestibilidad fecal y otros parámetros digestivos en gazapos en crecimiento.

Alfonzo R, Pérez E, Al-Soufi S, de la Cruz P, Silva V, Martín L, del Pozo R, Rybicka A, Buján M, Domínguez H, Torres MD, López-Alonso M, Nicodemus N, García J

Relaciones entre el crecimiento y la eficiencia alimentaria con los caracteres de comportamiento alimentario e indicadores de posición social de gazapos.

Piles M, Mora M, Tusell L, Pascual M, Sánchez JP

Forraje verde hidropónico de maíz (*Zea mays*) como suplemento alimenticio sobre los parámetros productivos del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en la etapa de engorde.

Durán-García M, Caridad-del Rosario J

Uso de ácidos orgánicos en gazapos post-destete: Elección de acidificante y dosis

Use of organic acids in post-weaning rabbit: Choice of acid and dose

Ramón-Moragues A^{1*}, Vaggi C², Franch J¹, Martínez-Paredes E¹, Peixoto-Gonçalves C¹, Ródenas L¹, López MC¹, Marín-García PJ³, Blas E¹, Pascual JJ¹, Cambra-López M¹

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de Valencia, 46022, Valencia, España.

²ERP Unit of Nutritional Physiology, University of Veterinary Medicine, 1210, Viena, Austria.

³Department of Animal Production and Health, Veterinary Public Health and Food Science and Technology (PASAPTA), Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, 46115 Valencia, España.

*adramo@upv.es

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento de ácidos orgánicos (AO) en el agua de bebida de gazapos post-destete a diferentes pH, sobre la evolución del pH a lo largo del tracto gastrointestinal, la actividad de la pepsina gástrica y el rendimiento de los animales. Se testaron 6 ácidos orgánicos (acético, fórmico, propiónico, láctico, cítrico y butírico) a 3 concentraciones (pH 3, 4 y 5). Además, se incluyó un control negativo (agua sin acidificar). El estudio se realizó con 228 conejos destetados (28 días de vida) divididos en 2 tandas y tuvo una duración de 7 días. En cada tanda, los animales se distribuyeron en los 19 tratamientos experimentales y se alojaron en jaulas colectivas (6 animales/jaula, tratamiento y tanda). Los animales fueron alimentados con un pienso comercial sin medicar. A los 31 y 35 días de vida, en cada tanda, se sacrificaron 3 animales por día y tratamiento y se midió el pH del contenido digestivo en el fundus, antrum, duodeno, yeyuno, íleon y ciego, así como la actividad enzimática de la pepsina gástrica. Diariamente, se registró el consumo de agua y pienso por jaula y el peso vivo individual para calcular la ganancia media diaria. Según los resultados, la inclusión de AO en el agua de bebida a pH 3 redujo el consumo de agua y pienso, penalizando los crecimientos. Los AO redujeron el pH del contenido del íleon y ciego, promoviendo a pH 4 la actividad de la pepsina gástrica. Los AO con mayor potencial para su uso en el post-destete según los resultados obtenidos fueron el ácido fórmico, acético y cítrico a pH 4.

Palabras clave: conejos de cebo, aditivos, ácidos orgánicos, pepsina gástrica, destete.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the use of organic acids (OA) in the water of post-weaning rabbit at different pH in the evolution of pH in the gut, gastric pepsin activity and animal performance. Six organic acids (acetic, formic, propionic, lactic, citric, and butyric) were tested at 3 concentrations (pH 3, 4 and 5). In addition, a negative control (non-acidified water) was included. The study was conducted with 228 weaned rabbits (28 days old) divided into 2 batches and lasted 7 days. In each batch, animals were divided into the 19 experimental treatments and housed in group cages (6 animals per cage, treatment and batch). Animals were fed an unmedicated commercial feed. At 31 and 35 days of age, 3 animals per day and treatment were slaughtered in each batch and we measured the pH in the fundus, antrum, duodenum, jejunum, ileum, and cecum besides gastric pepsin enzyme activity. Daily water and feed intake per cage and individual live weight were recorded to calculate average daily gain. According to the results, the inclusion of OA in the drinking water of at pH 3 reduced water and feed intake, limiting growth. OA reduced the pH in the ileum and caecum, promoting gastric pepsin activity at pH 4. According to our results, formic, acetic, and citric acid at pH 4 presented the highest potential for use in rabbits post-weaning.

Keywords: growing rabbits, additives, organic acids, gastric pepsin, weaning.

Introducción

La incidencia de trastornos digestivos en gazapos post-destete es elevada. Durante las primeras semanas posteriores al destete, la microbiota intestinal de los gazapos es inestable y se suceden cambios en las comunidades microbianas comensales (Combes *et al.*, 2011). Estos trastornos digestivos causan una elevada mortalidad y morbilidad en los gazapos tras el destete (Rosell *et al.*, 2016). Este tipo de patologías está causado por bacterias, normalmente de los géneros *Bacteroides*, *Clostridium* y *Escherichia* como en el caso de la enteropatía epizootica del conejo (Bäuerl *et al.*, 2014).

Tras el destete, los gazapos tienen una baja capacidad de acidificación, debido a un sistema digestivo inmaduro (Gidenne *et al.*, 2002). Esto, junto con la elevada capacidad tampón de las dietas y la baja actividad de algunas de las enzimas digestivas que limitan la digestión de los nutrientes, pueden favorecer la proliferación de patógenos. Por ello, es necesario evaluar estrategias que modulen el ambiente gastrointestinal de los gazapos durante el post-destete, reduciendo la incidencia de trastornos digestivos y aumentando la sostenibilidad y rendimiento de los sistemas de producción cunícolas.

Los ácidos orgánicos (AO) se usan en la alimentación de animales monogástricos, especialmente en animales jóvenes como lechones, para disminuir la mortalidad por diarreas post-destete. En lechones, se ha demostrado que los AO son capaces de reducir el pH gástrico, reforzando la barrera ácida del estómago, promoviendo la actividad enzimática de la pepsina y modulando la digestión de la proteína (Tugnoli *et al.*, 2020). Los AO presentan también propiedades antimicrobianas, que se basan por un lado, en la reducción del pH que limita el crecimiento y multiplicación de microorganismos; y, por otro lado, en las moléculas de los AO no disociadas y apolares que pueden atravesar la pared celular de las bacterias (Russell y Diez-González, 1998). En el citoplasma bacteriano, los AO se disocian liberando H^+ reduciendo el pH del interior, con efectos nocivos para la bacteria. Sin embargo, no todos los ácidos se comportan igual, ya que su capacidad para reducir el pH viene marcada por su constante de disociación (pKa), por lo que su efecto dependerá de la concentración del ácido, su peso molecular, el número de grupos carboxilo que contenga, su forma de administración, la dieta utilizada y otras variables relacionadas con el animal.

A pesar de que se han descrito efectos positivos sobre la salud digestiva y los rendimientos productivos de los AO en monogástricos (porcino y aves, principalmente), éstos no pueden extrapolarse directamente al conejo, debido a la diferencia en su fisiología digestiva. Además, aunque algunas mezclas multi-ácidos desarrolladas para otras especies se utilizan en granjas comerciales de conejos, existe poca información fiable sobre su eficacia. Por lo tanto, es necesario conocer qué AO, la dosis y cómo suministrarlo para conseguir una adecuada reducción del pH gástrico que proteja al gazapo frente a patógenos y optimice la actividad de la pepsina, con capacidad para modular el ambiente en el intestino delgado y que promueva una microbiota adecuada en su ciego.

El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento de seis AO a tres niveles de pH en el agua de bebida en gazapos post-destete, sobre la evolución del pH a lo largo del tracto gastrointestinal, la actividad de la pepsina gástrica y el rendimiento de los animales. Esta información es necesaria para finalmente elegir los AO candidatos más adecuados para utilizar en cunicultura.

Material y métodos

La prueba se desarrolló en la granja y laboratorio de la Unidad de Nutrición Animal de la Universitat Politècnica de València (UPV). El procedimiento experimental fue autorizado por el Comité de ética en investigación de la UPV y la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural con el código 2022 VSC PEA 0111.

Se testaron seis ácidos orgánicos (acético, fórmico, propiónico, láctico, cítrico y butírico) a tres concentraciones distintas para alcanzar pH 3, 4 y 5 en el agua de bebida. Además, se incluyó un control negativo (agua sin acidificar a pH 8). En total se evaluaron 19 tratamientos en agua: acético (ACET3-ACET4-ACET5), fórmico (FOR3-FOR4-FOR5), propiónico (PROP3-PROP4-PROP5), láctico (LAC3-LAC4-LAC5), cítrico (CIT3-CIT4-CIT5), butírico (BUT3-BUT4-BUT5) y el control (CON). Los animales fueron alimentados con pienso comercial no medicado (CUNIVITA Sd G GR, NANTA; 19,7% fibra bruta y 14,5 % proteína bruta) durante todo el estudio. Se emplearon 228 conejos (línea genética LP de la UPV) destetados a los 28 días de vida. La prueba se realizó en dos tandas de 114 conejos cada una, con una duración experimental de 7 días por tanda (hasta los 35 días de vida). Los animales se distribuyeron en jaulas colectivas (50 x 80 x 32 cm) con 6 animales procedentes de distintas camadas por jaula y

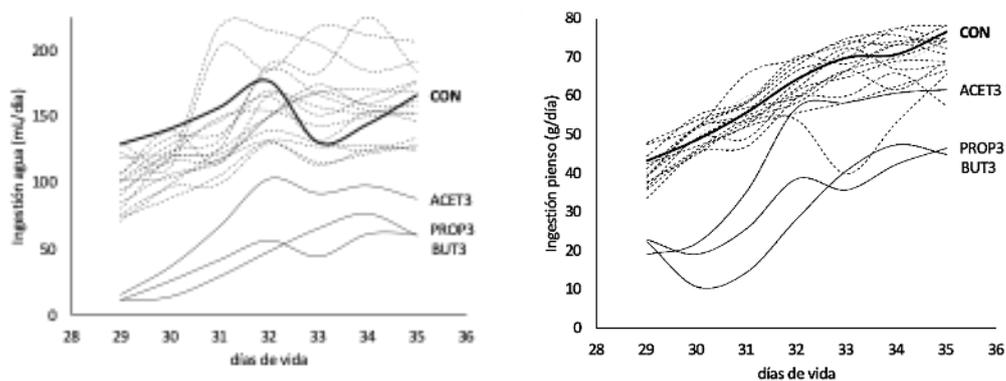
a cada jaula se le asignó un tratamiento (1 jaula/tratamiento y tanda). A los 31 y 35 días de vida, en cada tanda, se sacrificaron 3 animales por día y tratamiento, para medir los parámetros fisiológicos digestivos. Asimismo, durante el periodo experimental se registró diariamente el consumo de agua y pienso por jaula y el peso vivo (PV) individual. Con ello, se calculó la ganancia media diaria (GMD) por periodos. El animal fue la unidad experimental para las medidas de pH a lo largo del tracto gastrointestinal (fundus, antrum, duodeno, yeyuno, íleon y ciego), la actividad de pepsina gástrica y el PV y GMD. La jaula fue la unidad experimental para el consumo medio diario de agua (CMD-A) y de pienso (CMD-P). La medida del pH gástrico se realizó directamente con un electrodo 2 PORE Steel T (XS Sensor). El pH en los tramos del intestino delgado y ciego se midió por separado en tubos eppendorf (5 mL) con un electrodo para microvolúmenes MICRO electrode (XS Sensor). La determinación de la actividad enzimática de la pepsina se realizó según el método descrito por Rick y Fritsch (1974).

Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando el paquete estadístico SAS System Software® SAS 9,3 para evaluar como principales efectos fijos los AO y pH sobre las variables estudiadas, incluyendo además los efectos fijos del día del muestreo y la tanda. La significancia se estableció en $P \leq 0,05$.

Resultados y discusión

Los animales se destetaron con 532 g de media y alcanzaron un PV a los 35 días de 727 g de media. La **Figura 1** muestra la evolución diaria del CMD-A y CMD-P para cada uno de los tratamientos. El CMD-A y CMD-P aumentó progresivamente en todos los tratamientos, pero el uso de AO afectó el nivel de ingestión de agua y alimento. La inclusión de ACET3, PROP3 y BUT3 redujo significativamente el CMD-A. Esto pudo deberse a que se trata de ácidos con un fuerte olor que provocaron un rechazo hacia el agua de bebida ofrecida, especialmente durante los primeros tres días. El CMD-A condicionó el CMD-P que mostró una evolución similar en estos tres tratamientos respecto al CON. Consecuentemente, el PV fue menor en ACET3, PROP3 y BUT3 ($-100 \pm 32,5$ g, $-174 \pm 32,5$ g y $-228 \pm 32,5$ g de PV; $P < 0,05$, respectivamente a los 35 días en comparación con CON). Del mismo modo, estos tratamientos presentaron una GMD menor al CON o negativa hasta el día 31. El resto de los tratamientos se comportaron de forma similar al CON, excepto el LAC5 que mostró un menor PV ($-101 \pm 32,5$; P -valor=0,030) y LAC4 que presentó una GMD inferior en el periodo de los 31 a 35 días de vida ($-13,3 \pm$ g/día; P -valor=0,029).

Figura 1. Evolución del consumo medio de agua y pienso de los 28 a 35 días de vida en función del ácido y pH utilizado.



La línea continua aquellos tratamientos que mostraron diferencias significativas respecto al control (CON): ácido acético (ACET), ácido propiónico (PROP) y ácido butírico (BUT) a pH 3.

La **Tabla 1** muestra la evolución del pH a lo largo del tracto gastrointestinal y la actividad de la pepsina gástrica en función del AO y pH utilizado. Globalmente, los AO mostraron una capacidad limitada para reducir el pH gástrico y en los primeros tramos del intestino delgado. Sin embargo, en el ciego, la inclusión de CIT, FOR y PROP redujo ($P < 0,05$) el pH respecto al CON. En el caso del pH, la dosis de pH 4 y 5 redujo el pH tanto en el íleon como en el ciego respecto al CON ($P < 0,05$). La actividad de la pepsina fue significativamente mayor ($P < 0,05$) a dosis de pH 4 comparado con el resto. Pese a que globalmente los valores de actividad de la pepsina para ACET y CIT fueron más bajos que en CON, a pH 4 (datos no mostrados) la actividad enzimática fue equivalente a la del CON.

Tabla 1. Valores del pH y actividad pepsina en el tracto gastrointestinal.

Efecto	Fundus	Antrum	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciego	Act. pepsina
Control	3,29	1,45 ^{ab}	7,32	7,53	7,70 ^{ab}	5,78 ^{ab}	175,0 ^a
Acético	3,91	1,52 ^b	7,18	7,46	7,59 ^b	5,66 ^{bc}	86,9 ^{cd}
Fórmico	3,85	1,54 ^{ab}	7,17	7,47	7,61 ^b	5,60 ^c	119,7 ^{ac}
Ácido Propiónico	3,88	1,52 ^b	7,16	7,51	7,67 ^a	5,62 ^c	94,7 ^{bcd}
Láctico	4,13	1,56 ^{ab}	7,17	7,48	7,60 ^b	5,67 ^{abc}	110,5 ^{ad}
Cítrico	4,02	1,61 ^a	7,12	7,50	7,60 ^b	5,60 ^c	75,5 ^d
Butírico	3,60	1,50 ^b	7,23	7,50	7,63 ^b	5,74 ^a	129,8 ^{ab}
P-valor Ácido	0,455	0,119	0,637	0,630	0,133	<0,001	0,025
EEM Ácido	0,476	0,074	0,120	0,056	0,061	0,066	32,80
P-valor Día	0,282	0,309	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,461
P-valor Ácido*día	0,162	0,543	0,593	0,567	0,329	0,003	0,927
3	3,79	1,53	7,21	7,52 ^a	7,66 ^a	5,71 ^a	88,4 ^b
pH 4	4,08	1,56	7,16	7,49 ^{ab}	7,60 ^b	5,65 ^b	136,6 ^a
5	3,83	1,53	7,16	7,47 ^b	7,61 ^b	5,62 ^b	83,3 ^b
P-valor pH	0,234	0,353	0,468	0,080	0,040	0,011	0,020
EEM pH	0,133	0,021	0,034	0,016	0,018	0,019	9,42
P-valor Día	0,897	0,217	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,889
P-valor Ácido*pH	0,001	0,229	<0,05	0,377	0,240	0,166	0,015

a-d Valores dentro de una columna sin superíndice en común son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$). n= 36 para ácidos, n=12 para control y n= 72 para pH. EEM: Error estándar de la media. Act. pepsina expresada como unidades de pepsina por g de contenido estomacal.

Algunos autores han observado efectos positivos en el rendimiento productivo con la introducción de mezclas de AO comerciales en conejos de cebo (Zhu *et al.*, 2014), mientras que otros pese a obtener una mejora del rendimiento, observaron un aumento de la mortalidad durante el cebo con su suplementación (Cesari *et al.*, 2008). Nuestros resultados indican que la capacidad de acidificación del ambiente gastrointestinal de los AO y su efecto sobre la actividad enzimática de la pepsina es limitada. Esto puede deberse al tipo de dieta, al comportamiento de los AO (pKa) y a las características de los animales (edad, sexo, genética, y estado de salud). La mejora en el rendimiento observada por Cesari *et al.* (2008) y Zhu *et al.* (2014) pudo deberse a que la duración del periodo de administración de los AO fue durante todo el engorde, superior al de este estudio. Los efectos observados a nivel del ciego indican que algunos AO son capaces de proporcionar más moléculas sin disociar, manteniendo su capacidad antimicrobiana (Russell y Diez-González, 1998) en un lugar idóneo.

Conclusión

Extender la duración de la suplementación de AO durante el engorde podría mejorar los resultados de rendimiento y modular el ambiente gastrointestinal de los gazapos. Los AO con mayor potencial para su uso en el post-destete según los resultados obtenidos fueron el ácido fórmico, el ácido acético y el ácido cítrico a pH 4.

Agradecimientos

Al Proyecto SMART-RAB (AICO/2021/256; GVA) y al Programa Investigo (Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia - Financiado por la UE-NextGenerationEU).

Bibliografía

- Bäuerl C, Collado MC, Zúñiga M, Blas E, & Martínez GP. 2014. Changes in cecal microbiota and mucosal gene expression revealed new aspects of epizootic rabbit enteropathy. *PLoS One*, 9(8):105707.
- Cesari V, Toschi I, Pisoni AM, Grilli G, Cesari N. 2008. Effect of dietary acidification on growth performance and caecal characteristics in rabbits. *Nutrition and digestive physiology. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy.*
- Combes S, Michilland RJ, Monteils V, Cauquil L, Soulié V, Tran NU, Gidenne T, Fortun-Lamothe L. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microbiol Ecol* 77:680-689.
- Gidenne T and Fortun-Lamothe L. 2002. Feeding strategy for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. *Animal Sci* 75:169-184.
- Rick W and Fritsch WP. 1974. Chymotrypsin, trypsin and pepsin. In: H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic, New York, pp. 1006-1057.
- Rosell JM, de la Fuente LF. 2016. Causes of mortality in breeding rabbits. *Preventive Veterinary Medicine* 127:56-63.
- Russell JB, Diez-González F. 1998. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv Microb Physiol* 39: 205-234.
- Tugnoli B, Giovagnoni G, Piva A, Grilli E. 2020. From acidifiers to intestinal health enhancers: How organic acids can improve growth efficiency of pigs. *Animals* 10, 134.
- Zhu KH, Xu XR, Sun DF, Tang JL, Zhang YK. 2014. Effects of drinking water acidification by organic acidifier on growth performance, digestive enzyme activity and caecal bacteria in growing rabbits. *Ani Feed Sci and Technology* 190:87-94.

Entrenamiento de las conejas durante la recría: efecto sobre la flexibilidad de las reservas corporales y la reproducción a largo plazo

Training of rabbit does during rearing: effect on the body reserves' flexibility and long-term reproduction

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

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

*jupascu@dca.upv.es

Resumen

Se evaluó el efecto de la aplicación de estrategias de recría en conejas jóvenes, basada en 0 a 3 esquemas de restricción alimentaria, sobre la flexibilidad de sus reservas corporales y reproducción a largo plazo. Cada restricción fue de 6 días de reducción progresiva desde *ad libitum* a cero y 3 días de recuperación progresiva hasta *ad libitum*. A los 63 días de edad, 120 conejas se dividieron en 4 estrategias: AL, alimentadas *ad libitum*; 1R, alimentadas *ad libitum* con una restricción de 92 a 101 días de edad; 2R, alimentadas *ad libitum* con dos restricciones de 70 a 79 y de 114 a 123 días; 3R, alimentadas *ad libitum* con tres restricciones de 70 a 79, 92 a 101 y 114 a 123 días. Las hembras fueron inseminadas artificialmente (IA) a los 137 días de edad y 11 días postparto. Se controló el peso vivo (PV), el espesor de la grasa perirrenal (EGP) y el consumo de alimento de las hembras hasta el 2º parto. Se controló el tamaño de camada viva y total al nacer hasta el 9º parto. Unos días antes de la 1ª IA, las conejas fueron desafiadas con isoproterenol para determinar su potencial lipolítico. Las conejas jóvenes de las estrategias R mostraron claras pérdidas de PV y EGP durante las restricciones, pero recuperaron valores similares al grupo AL semanas después de la realimentación. En la 1ª IA, las hembras R tenían una concentración sanguínea basal más baja de ácidos grasos no esterificados respecto a las hembras AL (-13,9 $\mu\text{Eq/L}$; $P=0,002$). Hubo un incremento lineal del total de nacidos y nacidos vivos durante 9 ciclos reproductivos con el número de restricciones aplicadas durante la recría (+0,47 y +0,42 por restricción, respectivamente; $P<0,05$). Las restricciones no afectaron la flexibilidad de las reservas corporales, pero mejoraron la prolificidad.

Palabras clave: recría, alimentación, restricción, reproducción, reservas corporales.

Abstract

This work evaluated the effect of a rearing training strategy for young rabbit does, based on 0 to 3 feed restriction schemes, on their body reserves flexibility and long-term reproduction. Each restriction was 6 days of progressive reduction from *ad libitum* to zero and 3 days of progressive recovery until *ad libitum* feeding. At 63 days of age, 120 rabbit females were divided into 4 strategies: AL, fed *ad libitum*; 1R, fed *ad libitum* with one restriction scheme from 92 to 101 days of age; 2R, fed *ad libitum* with two restriction schemes from 70 to 79 and 114 to 123 days; 3R, fed *ad libitum* with three restriction schemes from 70 to 79, 92 to 101 and 114 to 123 days. Females were artificially inseminated (AI) at 137 days of age and at 11 days postpartum thereafter. Live weight (LW), perirenal fat thickness (PFT) and feed intake of females were controlled until the 2nd parturition. Alive and total litter size at birth was controlled until the 9th reproductive cycle. A few days before the first AI, does were challenged with isoproterenol to determine their lipolytic potential. Young rabbit does from the R strategies showed clear losses of LW and PFT during the application of restriction schemes but recovered the AL group values some weeks after refeeding. At first AI, R females had lower basal blood concentration of non-esterified fatty acids with respect to AL females (on av. -13.9 $\mu\text{Eq NEFA/L}$; $P=0.002$). There was a linear increase of total born and born alive during 9 reproductive cycles with the number of restrictions applied during rearing (+0.47 and +0.42 per restriction,

respectively; $P < 0.05$). The restrictions applied during rearing did not affect body reserves' flexibility but improved the prolificacy of the females.

Keywords: rearing, feeding, restriction, reproduction, body reserves.

Introducción

El estado corporal es un componente fundamental en las conejas reproductoras. Disponer de las reservas corporales adecuadas en cada momento de la vida de la coneja nos asegura poder optimizar la reproducción, siendo además garante de la salud y el bienestar de la coneja (Pascual *et al.*, 2013).

Las conejas primíparas, aunque no han alcanzado aún su tamaño adulto, suelen llegar al final de su primera gestación con unos niveles de reservas corporales bastante elevados, mostrando posteriormente una considerable movilización de reservas previa al momento del primer parto (Savietto *et al.*, 2016) y una recuperación prolongada de dichas reservas corporales a lo largo del mismo ciclo reproductivo. Esta fluctuación de las reservas durante los primeros ciclos puede afectar a las conejas, ya que puede producir una desviación relevante en trayectoria natural de sus reservas corporales definidas genéticamente por la homeorresis, poniendo a la coneja en un estado de mayor riesgo frente a desafíos. Posteriormente, a medida que avanzan los partos, la intensidad de estas movilizaciones y recuperaciones de reservas corporales disminuyen (Quevedo, 2005). Esto ha sido también observado en otras especies. Por ejemplo, las vacas lecheras primíparas también suelen llegar al primer parto con un mayor estado corporal que las adultas, mostrando igualmente una mayor dificultad de recuperar las reservas corporales perdidas alrededor del parto que las vacas múltiparas (Roche *et al.*, 2009).

Así pues, parece que la flexibilidad de las reservas corporales o la capacidad de los animales para limitar movilizaciones excesivas y facilitar recuperación de éstas podría mejorar con la edad o a medida que los tejidos adiposos son entrenados a lo largo de los partos. Como la mayoría de los reproductores son seleccionados por criterios productivos tempranos, y los primeros ciclos tienen mucha importancia en la productividad general de la granja, sería interesante explorar la posibilidad de mejorar esta capacidad de los animales lo antes posible. Así, nuestra hipótesis inicial va enfocada a que un entrenamiento en uso de las reservas corporales durante la recría podría mejorar la capacidad de recuperación de las conejas reproductoras jóvenes durante los primeros ciclos, contribuyendo a optimizar tanto su futura reproducción como su potencial supervivencia.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de diferentes esquemas de restricción durante la fase de recría de las conejas jóvenes, basadas en simular las caídas de ingestión observadas alrededor del parto, sobre la movilización de sus reservas corporales durante el primer ciclo reproductivo y su reproducción a largo plazo.

Material y métodos

Se utilizaron un total de 120 conejas de la línea LP (Universitat Politècnica de València, UPV). El procedimiento fue aprobado por el Comité de Ética en la Experimentación Animal de la UPV (código: 2022/VSC/PE/0167). A los 63 días de vida, las 120 conejas fueron asignadas aleatoriamente a cada una de las cuatro estrategias de alimentación durante la recría (30 animales por estrategia): AL, conejas alimentadas *ad libitum* en todo momento; 1R, conejas alimentadas *ad libitum* pero con la aplicación de una restricción de 92 a 101 días de edad; 2R, conejas alimentadas *ad libitum* con dos restricciones de 70 a 79 y de 114 a 123 días de vida; y finalmente, 3R, conejas alimentadas *ad libitum* con tres restricciones de 70 a 79, 92 a 101 y 114 a 123 días de vida. Cada restricción consistió en 6 días de reducción progresiva desde *ad libitum* a cero y 3 días de recuperación progresiva hasta alcanzar de nuevo la alimentación *ad libitum*. El valor de ingestión *ad libitum* para determinar la reducción progresiva se calculó para cada coneja a partir de su ingestión durante los 14 días antes la aplicación de la restricción. Las conejas fueron alimentadas en todo momento con un pienso comercial para conejas reproductoras (GESALPA versión UPV de NANTA S.L.) que contenía un 17,4% de proteína bruta y un 15,5% de fibra bruta.

Las hembras fueron inseminadas artificialmente (IA) a los 137 días de edad con la misma mezcla de semen de machos LP y a los 11 días postparto hasta su noveno parto. Se controló el peso vivo (PV) y la ingestión de pienso a los 63, 70, 79, 92, 101, 114, 123, 137 (1ª IA), primer parto, 18 días postparto (dpp), 28 dpp (destete) y segundo parto. El espesor de la grasa perirrenal (EGP) mediante ultrasonidos (Pascual *et al.*, 2004) se controló los días 63, 79, 101, 123, 137, primer parto, 18 días postparto (dpp), 28 dpp (destete) y segundo parto. Posteriormente se controló el tamaño de camada viva y total al nacer hasta el noveno parto. Unos días antes de la 1ª IA, las conejas

fueron desafiadas con isoproterenol (50 mg/kg PV) para determinar su potencial lipolítico, según el procedimiento descrito por Theilgaard et al. (2005). Se obtuvieron muestras de sangre a tiempo 0 y 7 min del desafío que fueron analizadas para determinar su contenido en ácidos grasos no esterificados (NEFA) en un analizador automático Wako Diagnostics 20R (Toshiba Medial Systems Co., Ltd., Tokyo, Japón).

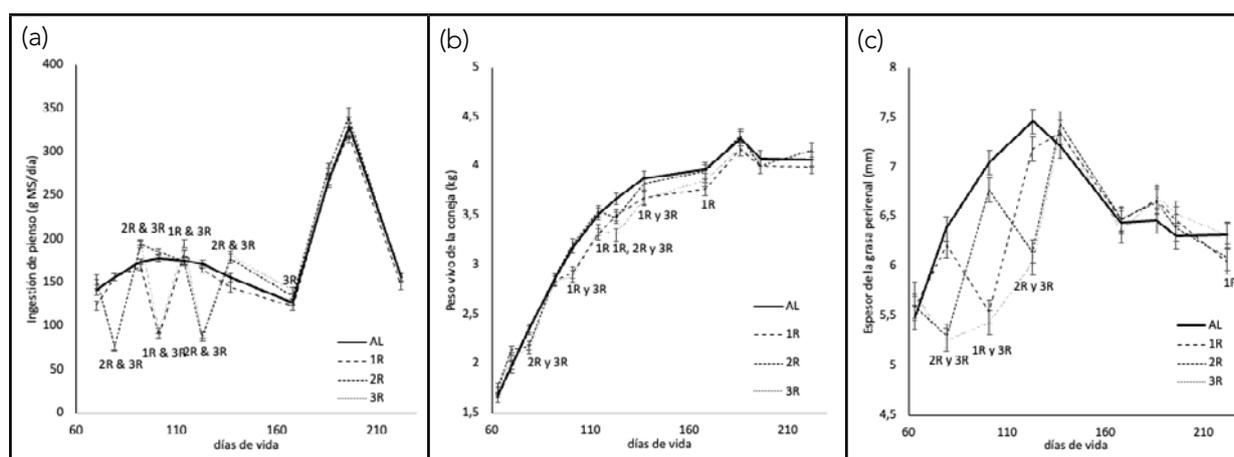
Los datos de PV, consumo de pienso, EGP y tamaño de camada al parto fueron analizados estadísticamente mediante un procedimiento MIXED de SAS (2015) para el análisis de medidas repetidas, con un modelo que incluyó el tratamiento y el día de vida o parto como factores fijos y el efecto aleatorio de la coneja. Los datos de NEFA en sangre fueron analizados con un modelo GLM de SAS, con un modelo que incluyó el tratamiento como efecto fijo. Se realizó contrastes ortogonales para determinar el efecto lineal y cuadrático del tratamiento.

Resultados y discusión

La **Figura 1** muestra la evolución de la ingestión de pienso, PV y EGP de las conejas hasta el segundo parto en función de la estrategia de restricción aplicada durante la recría. Podemos ver en la **Figura 1a** que las conejas de la estrategia AL mostraron el patrón de ingestión habitual de las conejas primíparas, con un aumento hasta la 1ª IA, para luego disminuir durante la gestación (especialmente en los últimos 10 días preparto; Savietto et al., 2016), para luego aumentar durante la lactación, volviendo a caer durante la segunda gestación. La aplicación de las diferentes estrategias de restricción no tuvo ningún efecto sobre ingestión de pienso posterior de las conejas, sólo las conejas de la estrategia 3R mostraron una mayor ingestión de pienso durante la primera gestación que las de la AL (+11,1%; $P < 0,05$).

Como era de esperar, las conejas de las estrategias 1R, 2R y 3R mostraron claras pérdidas de PV y EGP durante la aplicación de las restricciones (**Figuras 1b y 1c**), pero recuperaron los valores de las conejas con la estrategia AL semanas después de volver a alimentarse *ad libitum*. Tan solo las conejas de la estrategia 1R mostraron puntualmente un menor PV al primer parto (-5,0%; $P < 0,05$) y un menor EGP al segundo parto (-4,3%; $P < 0,03$). En cualquier caso, las estrategias basadas en la restricción si llevaron a un crecimiento corporal y de las reservas más paulatino respecto a la estrategia AL, aunque al inicio de la reproducción todos los animales mostraran valores similares.

Figura 1. Efecto de la estrategia de alimentación en recría (AL; *ad libitum*; 1R con una restricción; 2R: con dos restricciones; 3R: con tres restricciones) sobre la evolución del consumo de pienso (a), peso vivo (b) y espesor de la grasa perirenal (c) de las conejas entre los 63 días de vida y su segundo parto. Se marcan aquellas estrategias de restricción (1R, 2R y 3R) que fueron significativamente distintas a la AL en cada momento.



Respecto a la movilización y recuperación de reservas alrededor del parto, aunque sí parece observarse una menor recuperación postparto con la estrategia AL con que las R (0 vs. 3,7%), no se observaron diferencias significativas. De hecho, no se observaron diferencias significativas para el potencial lipolítico de las conejas a la primera IA, calculado como la diferencia entre la concentración de NEFA entre los momentos 0 y 7 min tras la aplicación del desafío con isoprotenerol (de promedio +165 y +137 mEq/L, para las conejas AL y R, respectivamente). Sin embargo, las conejas de las estrategias 1R, 2R y 3R tuvieron una concentración sanguínea basal más baja de NEFA

respecto a las AL a la primera IA ($-13,9 \pm 4,5$ mEq/L; $P=0,002$). Estos resultados podrían indicarnos que las conejas sometidas a cualquiera de las estrategias de restricción durante la recría parecen mostrar un desarrollo más paulatino durante dicha recría y un menor contenido de NEFA en sangre a la primera inseminación, que puede ser indicativo de estar aún en un periodo de constitución de reservas. Resultados similares han sido observados con anterioridad por Martínez-Paredes *et al.* (2012) con sistemas de recría basados en piensos fibrosos, donde también se obtiene un desarrollo más pausado, así como una menor concentración en NEFA en sangre (esta vez al primer parto), en comparación con la utilización ad libitum de piensos comerciales para conejas.

En lo que se refiere al efecto de la estrategia de recría utilizada sobre la reproducción a largo plazo, la **Tabla 1** recoge los principales efectos de las distintas estrategias sobre el número de nacidos a lo largo de los primeros 9 partos. Aunque, inicialmente no se observaron diferencias significativas para el efecto de la estrategia sobre el tamaño de camada, si se observó un incremento lineal del número de gazapos nacidos, tanto totales como vivos, durante los 9 ciclos reproductivos con el número de restricciones aplicadas durante la crianza ($+0,47 \pm 0,20$ y $+0,42 \pm 0,29$ gazapos al parto por restricción, respectivamente; $P < 0,05$). Estos resultados coinciden con los obtenidos también a largo plazo por Martínez-Paredes *et al.* (2018) con piensos fibrosos administrados ad libitum durante la recría. En dicho trabajo, los autores observan que la utilización de piensos fibrosos durante toda la recría produce un desarrollo más paulatino de las conejas, así como un aumento significativo del número de nacidos vivos y destetados a largo plazo respecto al uso de un pienso comercial.

Tabla 1. Efecto de la estrategia de alimentación en recría (AL; ad libitum; 1R con una restricción; 2R: con dos restricciones; 3R: con tres restricciones) sobre el tamaño de camada medio al parto de las conejas durante sus primeros 9 ciclos reproductivos.

	Estrategia de alimentación				ESM	P-valor	Efecto lineal
	AL	1R	2R	3R			
Nacidos totales	10,04a	10,69ab	10,72ab	11,28b	0,37	0,1177	0,0322
Nacidos vivos	9,33a	9,31a	9,61ab	10,6b	0,41	0,0859	0,0263

ESM: error estándar medio.

En conclusión, las estrategias de restricción en recría testadas en este estudio, basadas en la simulación de la ingestión y movilización que sufren las conejas alrededor del parto, no pareció afectar a la flexibilidad de uso de las reservas corporales de las conejas de modo que pudiera mejorar su capacidad de afrontar los ciclos reproductivos. Sin embargo, tal y como se ha observado anteriormente en otros estudios de restricción alimentaria durante la recría, el desarrollo paulatino de las conejas durante dicho periodo parece contribuir a mejorar la capacidad reproductiva de las conejas a largo plazo.

Agradecimientos

Agradecemos la ayuda de M^a Carmen López Luján por su ayuda en algunos controles puntuales, así como a Juan Carlos Moreno por su colaboración en el mantenimiento de la población y las instalaciones de nuestra granja experimental.

Bibliografía

Martínez-Paredes E, Ródenas L, Martínez-Vallespín B, Cervera C, Blas E, Brecchia G, Boiti C, Pascual JJ. 2012. Effects of feeding programme on the performance and energy balance of nulliparous rabbit does. *Animal* 6: 1086-1095.

Martínez-Paredes E, Ródenas L, Pascual JJ, Saviotto D. 2018. Early development and reproductive lifespan of rabbit females: implications of growth rate, rearing diet and body condition at first mating. *Animal* 12: 2347-2355.

Pascual JJ, Blanco J, Piquer O, Quevedo F, Cervera C. 2004. Ultrasound measurements of perirenal fat thickness to estimate the body condition of reproducing rabbit does in different physiological states. *World Rabbit Sci* 12: 7-21.

Pascual JJ, Savietto D, Cervera C, Baselga M. 2013. Resources allocation in reproductive rabbit does: a review of feeding and genetic strategies for suitable performances. *World Rabbit Sci* 21: 123-144.

Quevedo F. 2005. Adecuación de la nutrición a la mejora genética de la coneja reproductora. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de València, España, 218pp.

SAS. 2015. SAS/STAT 9.3 User's Guide. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

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.

Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP. 2009. Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J Dairy Sci* 92: 5769-5801.

Theilgaard P, Facila S, Blas E, Baselga M, Pascual JJ. 2005. Time and dose response of blood non-esterified fatty acids to adrenergic stimulation in rabbit does. *World Rabbit Sci* 13: 189-195.

Efecto del nivel de calcio sobre los rendimientos productivos de gazapos en crecimiento

Effect of level of dietary calcium on growth traits of growing rabbits

de la Cruz P, del Pozo R, Martín L, Rybicka A, Velasco B, Nicodemus N, García J

Dept. Producción Agraria. ETS Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. C/Senda del Rey 18. 28040 Madrid.

*javier.garcia@upm.es

Resumen

Se formularon cuatro piensos diferentes (variando únicamente el porcentaje de calcio mediante la inclusión de carbonato cálcico): el primero sin carbonato cálcico añadido (0,45% Ca), y otros tres con 0,525, 0,600 y 1,000% Ca, y 10,3 MJ energía digestible/kg. Los piensos se suministraron *ad libitum* a un total de 236 conejos, destetados y alojados en jaulas individuales desde los 30 hasta los 64 días de edad (59 gazapos/tratamiento). El incremento del nivel de calcio redujo linealmente la velocidad de crecimiento y la eficiencia alimenticia ($P = 0,036$). Además, el aumento del calcio tendió a reducir la ingestión ($P = 0,086$) y a aumentar la suma de la mortalidad y la morbilidad ($P = 0,095$), sin afectar al valor de mortalidad. El incremento del nivel de calcio no modificó las características (resistencia y elasticidad) de las tibias ($P = 0,35$).

Palabras clave: calcio, rendimientos productivos, salud, retención mineral, conejo.

Abstract

Four diets were formulated (varying only the percentage of calcium with the inclusion of calcium carbonate): the first one without added calcium carbonate (0.45% Ca), and three others with 0.525, 0.600 and 1.000% Ca and 10.3 MJ digestible energy/kg. The diets were fed *ad libitum* to a total of 236 rabbits, weaned and housed in individual cages from 30 to 64 days of age (59 rabbits/treatment). Increasing calcium level linearly reduced growth rate and feed efficiency from 30 to 64 d of age ($P = 0.036$). In addition, increasing calcium tended to reduce feed intake ($P = 0.086$) and increased the sum of mortality and morbidity ($P = 0.095$), without affecting the mortality rate. The increase of calcium level impaired the mineral retention efficiency and increased the urinary mineral excretion ($P < 0,001$) but did not change the strength and elasticity characteristics of the tibia ($P = 0.35$).

Keywords: calcium, growth performance, health, mineral retention, rabbit.

Introducción

En condiciones de incidencia de enteropatía epizootica ninguna de las estrategias nutricionales estudiadas (nivel y tipo de fibra, proteína, restricción) garantiza mantener unos niveles de mortalidad reducidos, lo que sugiere que podría haber otros posibles factores de incidencia que no se estén considerando. El nivel de calcio del pienso podría ser uno de estos factores teniendo en cuenta el impacto negativo que ejerce sobre la enteritis necrótica en pollos de engorde, enfermedad en la que también está implicado *Clostridium perfringens*. En trabajos previos, la reducción del nivel de calcio en pollos (en un 33%) redujo la tasa de mortalidad, mejoró la morfología de la mucosa y aumentó el pH yeyunal, lo que podría estar relacionado con la actividad/producción de toxinas de *C. perfringens* (Paiva et al., 2013 y 2014). Por el contrario, el aumento del nivel de calcio en pienso de pollos de engorde afectados por una enteritis necrótica subclínica aumentó la mortalidad y disminuyó la digestibilidad ileal de la proteína, sin observarse otros efectos (Zanu et al., 2020a, 2020b). En lechones, el aumento de calcio por encima de los requerimientos redujo la expresión génica que codifica las proteínas de las uniones estrechas de los enterocitos de la mucosa, y que están directamente vinculadas con la permeabilidad paracelular de la misma (Metzlez-Zebeli et al., 2015). Estos resultados muestran el interés de estudiar si la reducción del nivel de calcio en los piensos de conejos, donde en ocasiones suele estar en exceso, ejerce un efecto positivo sobre los rendimientos productivos y la mortalidad.

Material y métodos

Se formuló un pienso control con un 0,45% de calcio, que fue el nivel más bajo posible con los ingredientes disponibles en la fábrica. Los ingredientes fueron granos de cereal, torta de girasol y soja, subproductos de cereales, melaza, pulpa de remolacha, alfalfa y paja, con el objetivo que estuviese cercano a las recomendaciones de calcio más bajas (NRC, 1977; Furlan *et al.*, 1997). Además, el pienso se formuló con un 0,4% de fósforo, 34% de fibra neutro detergente, 10,9% de proteína bruta digestible y 10,3 MJ energía digestible/kg pienso (ED). A partir de este pienso base se fue añadiendo calcio en forma de carbonato cálcico (39% de calcio) para la elaboración de los piensos restantes. De esta manera, se obtuvieron 4 piensos con porcentajes de inclusión de calcio creciente: 1) P-1 (0,450% Ca) nivel de calcio estándar aportado únicamente por los ingredientes (0,44 g Ca total/MJ ED); 2) P-2 (0,525% Ca) aportado por los ingredientes, más la adición de 0,192% CaCO_3 ; 3) P-3 (0,600% Ca) aportado por los ingredientes, más la adición de 0,3848% CaCO_3 , para aportar un contenido de acuerdo con las recomendaciones actuales de gazapos en crecimiento (Mateos *et al.*, 2020); 4) P-4 (1,000% Ca) aportado por los ingredientes más la adición de 1,4104% CaCO_3 , para aportar un contenido de acuerdo a las recomendaciones actuales de conejas reproductoras (Mateos *et al.*, 2020). El contenido en cenizas aumentó de 7,36 a 7,91% MS entre piensos extremos. Un total de 236 gazapos híbridos (línea V x R de la Universidad Politécnica de Valencia) con un peso medio de 565 ± 105 g (media \pm desviación estándar), provenientes de 32 camadas y dos naves (N1 y N2) diferentes, fueron destetados con 30 días de edad y posteriormente alojados individualmente (59 gazapos/tratamiento), bloqueados por camada y asignados al azar a los piensos. Los gazapos tuvieron acceso *ad libitum* al pienso y al agua hasta los 64 días de edad. Tras un ayuno de 16 h se sacrificaron 12 gazapos/tratamiento para determinar el rendimiento a la canal y las características de la tibia. Se utilizaron 11 gazapos/tratamiento para determinar la digestibilidad fecal de 43 a 47 d de edad. La estimación de la composición corporal y de la canal, así como el balance mineral se determinaron por bioimpedancia de acuerdo con Saiz *et al.* (2017 y 2022). Se analizó estadísticamente el efecto lineal del nivel del calcio de los piensos sobre los rendimientos productivos utilizando un modelo mixto que incluyó el efecto lineal del calcio, el peso inicial como covariable, la nave de origen, y el hecho de haber realizado o no la bioimpedancia al animal, como efectos fijos y la camada como efecto aleatorio. La mortalidad y la morbilidad (animales que pesaron menos de 1700 g al final del cebo) se analizaron utilizando un modelo logístico que incluyó los efectos fijos anteriores. Los valores de digestibilidad fecal de los distintos componentes del pienso se analizaron mediante un análisis de varianza que consideró el efecto lineal del nivel de calcio. Los resultados del balance mineral se analizaron considerando el efecto lineal del nivel de calcio, el peso inicial como covariable, la nave de origen como efecto fijo y la camada como variable aleatoria.

Resultados y discusión

El incremento del nivel de calcio redujo linealmente, de 30 a 64 d de edad, la velocidad de crecimiento y la eficiencia alimenticia ($P \leq 0,036$. Tabla 1).

Tabla 1. Efecto lineal del nivel de calcio del pienso sobre los rendimientos productivos en gazapos.

	Niveles del calcio en el pienso, %				EEM				
	0,450	0,525	0,600	1,000					
N inicial	59	59	59	59					
Periodo 30-43 d									
Velocidad de crecimiento, g/d	52,8	50,6	51,9	50,7	1,209	<0,001	0,002	0,17	0,32
Consumo, g/d	101	101	101	102	2,349	<0,001	0,13	0,35	0,82
Eficiencia alimenticia, g/g	0,528	0,509	0,524	0,501	0,008	0,022	0,025	0,39	0,016
Mortalidad, %	0,0	3,5	5,1	0,0	-	-	0,52	0,82	0,50
Periodo 43-64 d									
Peso vivo 43 d, g	1250	1221	1238	1222	15,7	<0,001	0,002	0,17	0,32
Velocidad de crecimiento, g/d	46,1	45,0	44,2	41,5	1,146	0,79	0,72	0,12	0,004
Consumo, g/d	138	135	135	128	3,267	0,002	0,32	0,23	0,029
Eficiencia alimenticia, g/g	0,337	0,334	0,328	0,323	0,006	<0,001	0,079	0,43	0,084
Mortalidad, %	10,3	12,3	13,6	17,0	-	-	0,79	0,63	0,29
Periodo 30-64 d									
Peso vivo 64 d, g	2220	2169	2169	2096	29,9	<0,001	0,077	0,62	0,005
Velocidad de crecimiento, g/d	48,7	47,2	47,2	45,1	0,880	0,008	0,080	0,62	0,005
Consumo, g/d	124	122	122	118	2,439	<0,001	0,16	0,53	0,086
Eficiencia alimenticia, g/g	0,397	0,387	0,389	0,383	0,004	<0,001	0,40	0,78	0,036
Mortalidad, %	10,3	15,8	18,6	17,0	-	-	0,61	0,72	0,51
Mortalidad + morbilidad, %	19,1	15,7	30,7	30,7	-	-	0,11	0,55	0,095

Número de réplicas: nave (1: 108; 2: 128), BIA (sí: 100; no: 136). EEM: error estándar de la media. Covariable: peso inicial.

Además, el aumento del calcio tendió a reducir la ingestión ($P = 0,086$) y a aumentar la suma de la mortalidad y la morbilidad ($P = 0,095$), sin afectar al valor de mortalidad. La mayor parte de los gazapos enfermos o muertos tuvieron síntomas compatibles con la enteropatía epizoótica. Estos efectos fueron más pronunciados en la segunda fase del cebo (43-64 d edad). El hecho de determinar la bioimpedancia no afectó a los rendimientos productivos durante el cebo ($P \leq 0,12$).

El incremento del nivel de calcio en el pienso no modificó la digestibilidad fecal de la materia seca ni de las cenizas, ni la cantidad de minerales retenidos en el cuerpo y la canal (**Tabla 2**). Sin embargo, al incrementarse la ingestión mineral, en términos totales y digestibles, se redujo la eficiencia de retención de los minerales digestibles tanto a nivel corporal como de la canal ($P < 0,001$). La excreción mineral en las heces tendió a aumentar ligeramente con el nivel de calcio ($P = 0,090$). La ausencia de un efecto mayor a nivel fecal y el aumento de un 32% de la excreción de minerales en orina con el nivel de calcio ($P < 0,001$) concordaría con la gran capacidad de absorción de calcio que tiene el conejo y su particular metabolismo (Cheeke, 1987).

Tabla 2. Efecto lineal del nivel de calcio del pienso sobre la digestibilidad fecal (44-47 d) y el balance mineral de 30 a 64 d.

	Niveles del calcio en el pienso, %				EEM	P _{cov}	P _{nave}	P _{Calcio}
	0,450	0,525	0,600	1,000				
Digestibilidad fecal, % (n = 10)								
Materia seca	57,5	58,8	57,2	57,6	0,77	---	---	0,65
Minerales	49,9	54,7	51,6	53,5	1,40	---	---	0,35
Balance mineral (n)	20	22	16	17				
Consumo mineral, g/kg^{0,75} d								
Total	6,175	6,435	6,493	6,817	0,153	0,085	0,75	0,006
Digestible	3,079	3,521	3,35	3,644	0,081	0,06	0,90	0,001
Mineral retenido, g/kg^{0,75} d								
Cuerpo (Rcu)	1,189	1,184	1,212	1,15	0,02	<0,001	0,002	0,10
Canal (Rca)	0,902	0,882	0,909	0,873	0,014	<0,001	0,75	0,28
Eficiencia mineral								
Rcu/Ingerido	0,193	0,185	0,188	0,17	0,004	<0,001	0,001	<0,001
Rcu/Ingerido digestible	0,387	0,338	0,364	0,318	0,007	<0,001	0,003	<0,001
Rca/Ingerido digestible	0,294	0,252	0,273	0,241	0,005	0,13	0,90	<0,001
Pérdidas minerales, g/kg^{0,75} d								
Piel y vísceras	0,291	0,304	0,305	0,281	0,016	<0,001	< 0,001	0,37
Heces	3,10	2,91	3,14	3,17	0,073	0,19	0,62	0,090
Orina	1,89	2,34	2,13	2,49	0,072	0,80	0,41	< 0,001

Número de réplicas: nave (1: 34; 2: 41). EMM: error estándar de la media. Covariable: peso inicial.

El incremento del nivel de calcio no modificó el rendimiento a la canal ni las características de resistencia de la tibia, así como su contenido en cenizas ($P \leq 0,15$, **Tabla 3**). Estos resultados, junto con el similar contenido mineral retenido en el cuerpo y la canal observado en los diferentes tratamientos, sugerirían que los gazapos cubren sus necesidades de calcio con el nivel más bajo estudiado. No hay una explicación clara de por qué una reducción de calcio en el pienso aumenta los rendimientos productivos y tiende a mejorar la salud de los gazapos. Las principales hipótesis al respecto estarían relacionadas con un incremento de la permeabilidad de la mucosa y/o una reducción de la producción de toxinas de *C. perfringens*, lo que habría que confirmar más adelante.

Tabla 3. Efecto lineal del nivel de calcio del pienso sobre el rendimiento a la canal y las características de la tibia al final del cebo.

	Niveles de calcio, %				EEM	P _{cov}	P _{Calcio}
	0,45	0,525	0,600	1,000			
Peso previo al sacrificio (PV), g	2264	2244	2220	2176	45,0	<0,001	0,15
Rendimiento canal, %	58,6	59,8	59,7	58,2	0,78	0,82	0,35
Tibia, % PV	0,211	0,220	0,216	0,215	0,0072	0,38	0,99
Resistencia a la rotura (pico máximo), g	26531	26352	26577	25799	1238	0,069	0,64
Elasticidad, mm	2,24	2,52	2,43	2,67	0,28	0,16	0,35
Cenizas, % MS	55,1	55,1	55,3	55,1	0,86	0,093	0,99

EMM: error estándar de la media (n = 12). Covariable: peso inicial.

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 €. Agradecemos al equipo del Dr. Enrique Blas de la Universidad Politécnica de Valencia la fabricación de los piensos.

Bibliografía

Cheeke, P. R. 1987. *Mineral nutrition of rabbits. In Rabbit feeding and nutrition. A Series of Monographs and Treatises. Academic Press Publication Inc., London, 106-118.*

Furlan, A. C., Scapinello, C., Murakami, A. E., Moreira, I., Martins, E. N., Cavalieri, F. L. B. 1997. *Calcium nutritional requirements of growing rabbits. Rev. Soc. Bras. Zootec., 26(2), 294-298.*

Mateos, G. G., García-Rebollar, P., De Blas, J. C. 2020. *Minerals, Vitamins and Additives. Nutrition of the Rabbit, 3rd edition, De Blas, J. C., Wiseman, J. CAB international, Madrid, 126-167.*

Metzler-Zebeli, B. U., Mann, E., Ertl, R., Schmitz-Esser, S., Wagner, M., Klein, D., Ritzmann, M., Zebeli, Q. 2015. *Dietary calcium concentration and cereals differentially affect mineral balance and tight junction proteins expression in jejunum of weaned pigs. Br. J. Nutr., 113(7), 1019-1031.*

NRC. 1977. *Nutrient Requirements of Rabbits. National Academy of Science, National Research Council, Washington, DC, USA.*

Paiva, D. M., Walk, C. L., McElroy, A. P. 2013. *Influence of dietary calcium level, calcium source, and phytase on bird performance and mineral digestibility during a natural necrotic enteritis episode. Poult. Sci., 92(12), 3125-3133.*

Paiva, D. M., Walk, C. L., McElroy, A. P. 2014. *Dietary calcium, phosphorus, and phytase effects on bird performance, intestinal morphology, mineral digestibility, and bone ash during a natural necrotic enteritis episode. Poult. Sci., 93(11), 2752-2762.*

Saiz, A., García-Ruiz, A. I., 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(1), 2782-2793.*

Saiz, A., García-Ruiz, A. I., Fuentes-Pila, J. Nicodemus, N. 2022. *Application of bioelectrical impedance analysis to assess carcass composition and nutrient retention in rabbits from 25 to 77 days of age. Animals, 12, 2926.*

Zanu, H. K., Kheravii, S. K., Morgan, N. K., Bedford, M. R., Swick, R. A. 2020a. *Interactive effect of dietary calcium and phytase on broilers challenged with subclinical necrotic enteritis: part 1- broiler performance, gut lesions and pH, bacterial counts, and apparent ileal digestibility. Poult. Sci., 99, 4861-4873.*

Zanu, H. K., Kheravii, S. K., Morgan, N. K., Bedford, M. R., Swick, R. A. 2020b. *Interactive effect of dietary calcium and phytase on broilers challenged with subclinical necrotic enteritis: part 2. Gut permeability, phytate ester concentrations, jejunal gene expression, and intestinal morphology. Poult. Sci., 99, 4914-4928.*

Efecto de la inclusión de productos de algas sobre la digestibilidad fecal y otros parámetros digestivos en gazapos en crecimiento

Effect of the inclusion of seaweed products on faecal digestibility and other digestive traits in growing rabbits

Alfonzo R¹, Pérez E¹, Al-Soufi S², de la Cruz P¹, Silva V¹, Martín L¹, del Pozo R¹, Rybicka A¹, Buján M³, Domínguez H⁴, Torres MD⁴, López-Alonso M⁵, Nicodemus N¹, García J¹.

1Dpto. Producción Agraria. ETS Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. Madrid.

2Dpto. Anatomía, Producción Animal y Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo.

3PORTO-MUIÑOS, S.L., Cerceda, A Coruña.

4Dpto. Ingeniería Química, Universidade de Vigo, Ourense.

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

*javier.garcia@upm.es

Resumen

Se formuló un pienso control y otros cuatro donde se añadió al pienso control un 1,025% de *Saccharina latissima* deshidratada, ó los extractos acuosos de *Saccharina latissima*, *Himanthalia elongata* y *Ulva* spp., respectivamente. Se realizaron dos experimentos (100 gazapos/exp) donde se determinó la digestibilidad fecal, la concentración de ácidos grasos volátiles y otros parámetros digestivos. El grupo control mostró unos valores de digestibilidad de la materia seca/energía y de la proteína inferiores a la media de los cuatro grupos alimentados con productos de algas o los dos alimentados con *S. latissima* ($0,015 \leq P \leq 0,12$). La proporción de butirato en el íleon de los grupos alimentados con extracto de *S. latissima* y *H. elongata* tendió a ser mayor respecto al grupo alimentado con *Ulva* spp. ($P = 0,094$).

Palabras clave: *Saccharina latissima*, *Himanthalia elongata*, *Ulva* spp., conejo.

Abstract

A control diet was formulated and another four diets obtained adding to control diet 1.025% of dehydrated *Saccharina latissima*, or aqueous extracts of *Saccharina latissima*, *Himanthalia elongata* and *Ulva* spp., respectively. Two experiments (100 rabbits/exp) were carried out to determine faecal digestibility, volatile fatty acid concentration and other digestive parameters. Rabbits from control group showed a lower dry matter/energy and protein digestibility values than the mean of the groups fed with seaweed or the two groups fed with *S. latissima* ($0.015 \leq P \leq 0.12$). The ileal proportion of butyrate of the groups fed *S. latissima* extract and *H. elongata* tended to be higher than that of the group fed *Ulva* spp. ($P = 0.094$).

Keywords: *Saccharina latissima*, *Himanthalia elongata*, *Ulva* spp., rabbit.

Introducción

Las algas marinas pueden ser una fuente de fibra interesante para los conejos. Su composición química se caracteriza por tener un contenido elevado en fibra dietética, en especial fibra soluble, cenizas y contenidos variables de proteína (Buján et al., 2022). La riqueza en fibra y cenizas hace que su valor energético sea limitado y hayan sido utilizadas como alimento para rumiantes. Sin embargo, la fracción fibrosa de algunas algas marinas como *S. latissima* ha mostrado *in vitro* ser bastante fermentable, y promover la producción de butirato, casi tanto como el extracto de *H. elongata* (Buján et al., 2022), por lo que algunas algas/extractos de algas podrían tener un efecto probiótico interesante en gazapos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inclusión de distintos productos de algas sobre la digestibilidad fecal y la concentración intestinal de ácidos grasos volátiles.

Material y métodos

Se formuló un pienso control con un 17% de proteína bruta y un 44,5% de fibra neutro detergente (Tabla 1). Se formularon otros cuatro piensos añadiendo sobre el pienso control 1,025% de cuatro productos de algas respectivamente: *Saccharina latissima* deshidratada, extracto acuoso de *Saccharina latissima*, extracto acuoso de *Himanthalia elongata* y extracto acuoso de *Ulva* spp. Se fijó este nivel de inclusión para evitar un exceso de iodo en los piensos que incluyeron *S. latissima*. Los productos de algas se seleccionaron en función de los resultados previos obtenidos *in vitro* por Buján *et al.* (2022). Se realizaron dos experimentos. En el Experimento 1 se utilizaron 100 gazapos híbridos (línea V x R de la Universidad Politécnica de Valencia) destetados a los 32 d de edad con un peso medio y desviación estándar de 651 ± 122 g. Los gazapos se bloquearon por camada y se asignaron al azar entre los 5 tratamientos (20 gazapos/tratamiento), 12 de ellos fueron sacrificados a los 44 d de vida (para evaluar el peso de los órganos, el pH intestinal y la concentración de ácidos grasos volátiles, AGV, del íleon y del ciego) y en los otros 8 se determinó la digestibilidad fecal de 51 a 55 d de edad. Solo se sacrificaron los gazapos aparentemente sanos. En el experimento 2 se utilizaron otros 100 gazapos destetados a los 30 d de edad con un peso medio y desviación estándar de 678 ± 97 g. Los gazapos se bloquearon por camada y se asignaron al azar entre los 5 tratamientos (20 gazapos/tratamiento) para determinar el peso de los órganos digestivos y el pH intestinal a los 43 d de edad y la digestibilidad fecal de 56 a 60 d de edad. Los gazapos dispusieron de pienso y agua a voluntad. Se realizó un análisis de varianza donde el tratamiento fue el único efecto considerado, y cuando se detectó un efecto significativo se realizó un test de Tukey para comparar las medias. Además, se realizaron dos contrastes: control vs. resto de tratamientos, y control vs. *S. latissima* y extracto de *S. latissima*.

Tabla 1. Composición química (% MS) y digestibilidad fecal *in vitro* de los productos de algas y piensos experimentales.

	Control	<i>S. latissima</i>	Extr. <i>S. latissima</i>	Extr. <i>H.</i> <i>elongata</i>	Extr. <i>Ulva</i> spp.
Algas					
Materia seca		93,4	95,1	92,3	80,4
Cenizas	---	37,8	55,1	50,3	38,5
Proteína bruta (PB)	---	19,9	15,9	6,4	6,3
Fibra dietética total (FDT)	---	32,0	4,2	20,5	40,5
Fibra neutro detergente	---	13,1	0,00	2,6	0,00
Fibra soluble	---	18,9	4,20	17,9	40,5
100 - PB -FDT - cenizas	---	10,3	24,8	22,9	14,7
Digestibilidad fecal <i>in vitro</i> , %					
Materia orgánica	---	59,1	99,8	97,3	99,7
Proteína bruta	---	67,0	100	94,2	100
Piensos					
Cenizas	8,38	8,81	8,79	8,53	8,64
Proteína bruta	17,0	16,9	17,0	16,4	16,6
Fibra neutro detergente	44,5	43,4	42,6	45,2	45,2
Fibra ácido detergente	20,1	20,0	19,7	20,5	20,4
Energía bruta, kcal/kg MS	18,1	18,1	18,1	18,2	18,2
Digestibilidad fecal <i>in vitro</i> , %					
Materia seca	65,0	65,9	66,2	65,5	66,5

Resultados y discusión

La digestibilidad fecal de la materia seca fue mayor en el grupo alimentado con *S. latissima* deshidratada respecto al control en el Exp.1 ($P = 0,003$. **Tabla 2**), mostrando este último un valor más bajo que la media del resto de grupos o que los dos que tomaron *S. latissima* ($P \leq 0,010$). Este efecto no se observó en el Exp. 2 con la materia seca, si bien la digestibilidad de la energía fue superior en los grupos suplementados con algas respecto al control ($P = 0,032$. **Tabla 3**), y tendió a ser mayor en los dos grupos alimentados con *S. latissima* frente al grupo control ($P = 0,090$). En la misma línea, el grupo control tendió a mostrar una digestibilidad de la proteína inferior a los grupos alimentados con algas, o específicamente con los dos que tomaron *S. latissima* en el Exp. 1 ($P = 0,10$ y $0,12$) y en el Exp. 2 ($P = 0,032$ y $0,090$). Estos resultados podrían estar asociados al contenido en laminarina de los productos de algas (menos en *Ulva* spp., donde predominan los ulvanos), que es un β -glucano que ha demostrado mejorar la digestibilidad en lechones. La suplementación con 300 ppm de laminarina mejoró la digestibilidad fecal de la energía y la proteína en lechones tras el destete, así como la expresión de los transportadores de la glucosa en la mucosa ileal (Heim *et al.*, 2014), lo que podría estar también relacionado con la mejora de la morfología de la mucosa del duodeno (Walsh *et al.*, 2013).

Tabla 2. Efecto de la inclusión de productos de algas en el pienso sobre la digestibilidad fecal aparente en gazapos de 51 a 55 d de edad (Exp. 1).

	Control	<i>S. latissima</i>	Extr. <i>S. latissima</i>	Extr. <i>H. elongata</i>	Extracto <i>Ulva</i> spp.	EEM	P_{trat}	$P_{\text{control vs. resto}}$	$P_{\text{control vs. S. latissima}}$
N	4	6	6	7	5				
Peso inicial, g	1484	1608	1472	1435	1377	6,27	0,12	0,90	0,52
Consumo, g MS/d	139	138	126	124	119	6,70	0,20	0,15	0,42
Digestibilidad fecal, %									
Materia seca	57,2b	61,5a	60,4ab	58,9ab	60,9ab	0,92	0,030	0,010	0,005
Proteína bruta	69,9	74,0	72,6	74,1	72,5	1,55	0,420	0,10	0,12

EEM: error estándar de la media.

Tabla 3. Efecto de la inclusión de productos de algas en el pienso sobre la digestibilidad fecal en gazapos de 56 a 60 d de edad (Exp. 2).

	Control	<i>S. latissima</i>	Extr. <i>S. latissima</i>	Extr. <i>H. elongata</i>	Extracto <i>Ulva</i> spp.	EEM	P_{trat}	$P_{\text{control vs. resto}}$	$P_{\text{control vs. S. latissima}}$
N	7	9	8	9	8				
Peso inicial, g	2012	1880	1871	1870	1778	78,9	0,38	0,077	0,18
Consumo, g MS/d	167	155	167	158	165	7,13	0,64	0,47	0,49
Digestibilidad fecal, %									
Materia seca	57,4	57,8	58,5	58,4	58,7	0,50	0,40	0,12	0,23
Materia orgánica	58,1	58,5	59,1	59,0	59,5	0,49	0,38	0,13	0,28
Cenizas	49,6	50,8	53,0	51,7	50,2	1,16	0,31	0,19	0,13
Proteína bruta	66,7	69,5	70,1	70,1	68,7	0,95	0,11	0,015	0,016
Energía bruta	57,7	58,5	59,1	59,0	59,5	0,50	0,16	0,032	0,090
Energía digestible, MJ/kg MS	10,4	10,6	10,7	10,7	10,8	0,091	0,073	0,021	0,091
Proteína digestible, g/kg MS	114	118	119	115	114	1,60	0,091	0,17	0,031
PBd/ED	10,9ab	11,1a	11,1a	10,8ab	10,5b	0,13	0,023	0,98	0,20

EEM: error estándar de la media.

Los tratamientos no tuvieron efecto sobre el peso del aparato digestivo y del hígado (datos no mostrados), pero sí sobre el peso relativo del estómago que se redujo en los grupos alimentados con *H. elongata* y *Ulva* spp. frente a los dos grupos alimentados con *S. latissima* ($P < 0,001$. Exp. 1) o frente al grupo de *S. latissima* deshidra-

tada (P = 0,069. Exp. 2). En el Exp. 1 no se observaron efectos relevantes en el pH cecal o en la concentración de AGV, salvo la tendencia a aumentar la proporción de butirato en el íleon de los grupos alimentados con extracto de *S. latissima* y *H. elongata* respecto al grupo alimentado con *Ulva* spp. (P = 0,094. **Tabla 4**), lo que coincide con lo observado in vitro previamente (Buján *et al.*, 2022). Sí se observó que el pH ileal en el Exp. 2 fue menor en los grupos alimentados con algas (P = 0,016), especialmente los alimentados con el extracto de *S. latissima*.

Tabla 4. Efecto de la inclusión de productos de algas en el pienso sobre el pH y la concentración ileal y cecal de ácidos grasos volátiles en gazapos de 44 d de edad (Exp. 1).

	Control	<i>S.latissima</i>	Extr. <i>S.latissima</i>	Extr. <i>H.elongata</i>	Extracto <i>Ulva</i> spp.	EEM	P _{trat}	P _{control vs. resto}	P _{control vs. <i>S.latissima</i>}
Peso vivo, g	1201	1214	1203	1133	1066	68.9	0,51	0,54	0,73
Íleon									
N	7	5	10	5	6				
pH	7,17	7,15	7,14	6,72	7,29	0,16	0,26	0,6	0,92
pH (Exp. 2)	7,27a	7,17ab	6,78b	7,15ab	7,03ab	0,091	0,016	0,029	0,017
AGV, mmol/g	8,17	9,98	9,67	7,43	8,71	0,85	0,24	0,40	0,11
Acetato, %	95,6	95,6	93,9	92,8	95,9	1,65	0,63	0,55	0,65
Propionato, %	1,49	1,62	2,02	2,64	1,67	0,93	0,92	0,62	0,76
Butirato, %	1,76	1,94	3,50	3,78	0,58	0,91	0,094	0,48	0,37
Isobutirato, %	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-
Valerato, %	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,063	0,36	0,58	1,00
Isovalerato, %	1,10	0,82	0,59	0,80	1,68	0,26	0,81	0,87	0,63
Caproato, %	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-
Ciego									
N	8	7	11	5	7				
pH	5,71	5,68	5,80	5,77	5,94	0,086	0,26	0,36	0,71
pH (Exp. 2)	5,81	5,89	5,82	5,88	5,90	0,10	0,95	0,57	0,69
AGV, mmol/g	130	132	118	118	113	8,24	0,41	0,29	0,60
Acetato, %	83,0	82,9	81,6	81,4	83,1	0,79	0,38	0,36	0,40
Propionato, %	4,20	3,27	4,33	3,82	5,50	0,63	0,46	0,97	0,68
Butirato, %	11,9	13,3	13,4	14,2	10,6	1,10	0,21	0,44	0,28
Isobutirato, %	0,00	0,00	0,00	0,00	0,029	0,012	0,36	0,58	1,00
Valerato, %	0,29	0,24	0,31	0,40	0,34	0,035	0,073	0,34	0,78
Isovalerato, %	0,18	0,13	0,14	0,12	0,17	0,028	0,57	0,25	0,21
Caproato, %	0,37	0,20	0,23	0,12	0,33	0,15	0,76	0,32	0,34

EEM: error estándar de la media. AGV: ácidos grasos volátiles. pH íleon Exp. 2: N = 4-7. pH ciego Exp. 2: N = 7-8.

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 €. Agradecemos al equipo del Dr. Enrique Blas de la Universidad Politécnica de Valencia la fabricación de los piensos, y al equipo de la Dra. María José Ranilla de la determinación de los ácidos grasos volátiles.

Bibliografía

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. 2022 Estudio in vitro de la digestibilidad y la fermentabilidad de 19 productos de macroalgas marinas en conejos. *Actas del 46 Symposium de Cunicultura de Pineda de Mar*, 58-63.

Heim G, Walsh AM, Sweeney T, Doyle DN, O'Shea CJ, Ryan MT, O'Doherty JV. 2014. Effect of seaweed-derived laminarin and fucoïdan and zinc oxide on gut morphology, nutrient transporters, nutrient digestibility, growth performance and selected microbial populations in weaned pigs. *Br. J. Nutr.* 111:1577-1585.

Walsh AM, Sweeney T, O'Shea CJ, Doyle DN, O'Doherty JV. 2013. Effect of dietary laminarin and fucoïdan on selected microbiota, intestinal morphology and immune status of the newly weaned pig. *Br. J. Nutr.* 110:1630-1638.

Relaciones entre el crecimiento y la eficiencia alimentaria con los caracteres de comportamiento alimentario e indicadores de posición social de gazapos

Relationships between growth and feed efficiency with feeding behaviour traits and indicators of social status of growing rabbits

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

Programa de Genética y Mejora Animal, IRTA, 08140, Caldes de Montbui, España

*miriam.piles@irta.es

Resumen

Conocer los mecanismos potenciales por los que un animal ejerce su efecto sobre el comportamiento productivo de sus compañeros de jaula es de gran interés para el manejo y bienestar como para la selección. El objetivo de este estudio fue utilizar la información de un nuevo comedero automático para conejos para: i) identificar caracteres específicos del comportamiento alimentario que pudieran servir como indicadores de la posición de un individuo dentro de la jerarquía social de la jaula; ii) evaluar la relación entre el crecimiento y la eficiencia alimentaria con los caracteres mencionados, así como con los que describen el patrón de consumo individual. A los 39 d de vida, los conejos de 15 lotes se colocaron en jaulas de 6 conejos y se alimentaron *ad libitum* para que se acostumbraran al comedero electrónico. De 42 a 60 d, un grupo de 1.086 conejos fue alimentado *ad libitum* mientras que otro grupo de 1.134 conejos fue alimentado con un horario de alimentación restringido entre las 18:00h y las 8:00h del día siguiente. Las variables que definen cómo se distribuyen los recursos entre los compañeros de jaula pueden ser buenos indicadores de la posición de dominancia/subordinación del animal dentro de la jaula, ya que están correlacionadas con la prioridad del animal para acceder a la comida. Los animales más eficientes son los que comen menos veces, menos cantidad de comida y pasan menos tiempo en el comedero. También parecen ser los subordinados, como demuestra el hecho de que no tengan acceso prioritario a la comida y dispongan de la menor parte de los recursos.

Palabras clave: eficiencia alimentaria, jerarquía social, pauta de consumo, comederos electrónicos, conejos.

Abstract

Understanding the potential mechanisms by which an animal exerts its effect on the productive behaviour of its cage mates is of great interest for management and welfare as well as for selection. The aim of this study was to use information from a novel automated feeder for rabbits to: i) identify specific feeding behaviour traits that could serve as indicators of an individual's ranking within the social hierarchy of the cage; ii) assess the relationship between growth and feed efficiency with the above traits, as well as those describing the individual consumption pattern. At 39 d of life, rabbits from 15 batches were placed in 6-rabbit cages and fed *ad libitum* to get used to the electronic feeder. From 42 to 60 d, one group of 1,086 rabbits was fed *ad libitum* while other group of 1,134 rabbits was fed on restriction by limiting the feeding time to the period between 18:00h and 8:00h the following day. The variables defining how resources are distributed among cage mates can be good indicators of the animal's dominance/subordination position within the cage as they are correlated with the animal's priority for access to food. The most efficient animals are the ones that eat fewer times, have less amount of food and spend less time in the feeder through. They also appear to be the subordinates, as evidenced by the fact that they do not have priority access to food and have the smallest share of resources.

Keywords: feed efficiency, social hierarchy, feeding behaviour, electronic feeders, rabbits.

Introducción

El uso de comederos electrónicos en los núcleos de selección permite recoger información detallada sobre el consumo de pienso y la pauta en que se produce a lo largo de un periodo definido. Algunos autores han examinado la variación fenotípica y genética de unas pocas variables de comportamiento alimentario (el número de comidas, el consumo de pienso y el tiempo de ocupación diarios y la velocidad de ingesta) así como su relación con caracteres de interés productivo (Herrera-Cáceres *et al.*, 2020; Cavani *et al.*, 2022; Núñez *et al.*, 2023). Sin embargo, la información registrada por los comederos electrónicos puede utilizarse más ampliamente para obtener registros de nuevos caracteres que sean indicadores potenciales de la posición del animal en la jerarquía del grupo o de su grado de dominancia sobre sus compañeros de jaula. Entre estos caracteres se incluyen los que indican cómo se distribuye la cantidad de alimento consumido o el tiempo de ocupación del comedero entre los compañeros de jaula, o el orden en que los animales acceden al comedero en cada una de las visitas que realizan para completar una comida. El determinismo genético de estos caracteres y su relación fenotípica o genética con caracteres de interés productivo, como las medidas de eficiencia alimentaria, no han sido estimados en ninguna especie. Conocer la importancia de los efectos genéticos directos e indirectos (es decir, los efectos genéticos de interacción social) sobre estos caracteres, así como su correlación con los efectos directos e indirectos de los caracteres productivos y de comportamiento alimentario podría ser de gran interés para el manejo y bienestar como para la selección. Así, la correlación entre los efectos directos de los marcadores de posición jerárquica/dominancia y los efectos indirectos de los caracteres productivos permitiría identificar los mecanismos potenciales por los que un animal ejerce su efecto sobre el comportamiento productivo de sus compañeros de jaula. En caso de que los primeros caracteres sean heredables, sería factible seleccionar directamente por ellos mediante modelos sencillos para mejorar el rendimiento productivo del grupo. Como pasos previos al desarrollo de estos estudios genéticos, este trabajo tiene como objetivos: i) identificar caracteres específicos del comportamiento alimentario (FB, *feeding behaviour*) que pudieran servir como indicadores de la posición de un individuo dentro de la jerarquía social de la jaula; ii) evaluar la relación entre el crecimiento y la eficiencia alimentaria con los caracteres mencionados, así como con los que describen el patrón de consumo individual.

Material y métodos

Los datos corresponden a 15 lotes de gazapos de dos líneas de selección ADGR (1.086 animales) y RFI (1.134 animales), ambas seleccionadas para mejorar la eficiencia alimentaria durante el engorde mediante diferentes criterios de selección: Crecimiento medio diario en condiciones de restricción alimentaria (línea ADGR) y consumo residual de pienso (línea RFI). A los 39 días de edad, los animales se colocaron en jaulas de 6 animales que disponían de comedero electrónico y se alimentaron a voluntad (régimen de alimentación **AL**). A partir de los 42 d a los animales ADGR se les limitaba el periodo de alimentación a 12 h (de 18:00 a 06:00 h) hasta los 60d que terminaba el engorde de ambos grupos (régimen de alimentación **R**). Los animales se pesaban individualmente a los 42 y a los 60 d y, con esta información y la registrada por el comedero electrónico, se obtuvieron las siguientes variables entre las que se calculó la correlación de Spearman:

- i) Variables de crecimiento: peso al destete (**WW**), ganancia de peso en el engorde (**BWG**) y ganancia media diaria (ADG).
- ii) Variables de eficiencia alimentaria (**FE**): índice de conversión (**FCR**) y consumo de pienso residual (**RFI**).
- iii) Variables de comportamiento alimentario: número de comidas (**NM**), número de visitas por comida (**NVM**), intervalo entre comidas (**IBM**), tiempo en una comida (**TM**), tiempo de ocupación del comedero (**OTFE**), consumo (**FI**), velocidad de ingesta (**FRmeal**), ratio de ocupación efectiva (**REFE**).

Indicadores de la posición en la jerarquía social de la jaula: promedio del turno/posición en la que va a comer (**Position**) para completar cada una de las comidas, promedios de los valores correspondientes a los 15 días de control del porcentaje que le corresponde al animal del número de ocupaciones del comedero (**rateFE**), número de ocupaciones del comedero sin comer (**rateEM**), pienso consumido (**rateFI**) y tiempo de ocupación (**rateT**) ocurridos cada día en la jaula.

Resultados y discusión

La correlación fenotípica entre los diversos caracteres fue muy similar en ambos grupos de animales. La **figura 1** muestra los resultados correspondientes a los animales racionados. Los caracteres de crecimiento (WW, BWG y ADG) no se correlacionaron con los caracteres FB ni con los marcadores de posición jerárquica o dominancia

sobre los compañeros de jaula. Como era de esperar, estos caracteres no se correlacionaron con RFI y se correlacionaron escasamente con FCR (máximo de -0,3 en animales alimentados con R).

Las correlaciones fenotípicas entre la mayoría de los caracteres de FB fueron globalmente bajas (de 0 a 0,5 en magnitud). Sin embargo, este parámetro fue muy alto entre IBM con NM y NFE (-0,9 y -0,8, respectivamente) y entre NM y NFE (+0,9); de moderado a alto entre FI y NVM (0,7) y entre REFE y NM, NVM e IBM (0,7, 0,6 y -0,6, respectivamente). Los valores de estas correlaciones son los esperados según las propias definiciones de los caracteres.

La velocidad de ingesta se correlacionó ligeramente de forma negativa con la FE (-0,2 tanto con FCR como con RFI), siendo los animales más eficientes los que comieron mayor velocidad. El tiempo transcurrido entre el inicio de la primera y el final de la última visita dentro de una comida estuvo muy poco correlacionado con RFI (0,1) y no correlacionado con FCR. Sin embargo, REFE, FI, TM, IBM, NVM, NM y NFE se correlacionaron de forma moderada a alta con RFI y FCR. Así, los conejos más eficientes fueron los que, de media, visitaron el comedero con menos frecuencia para completar una comida, comieron menos, pasaron menos tiempo en el comedero, dejaron pasar más tiempo entre comidas y tuvieron una tasa menor de visitas al comedero en las que comían.

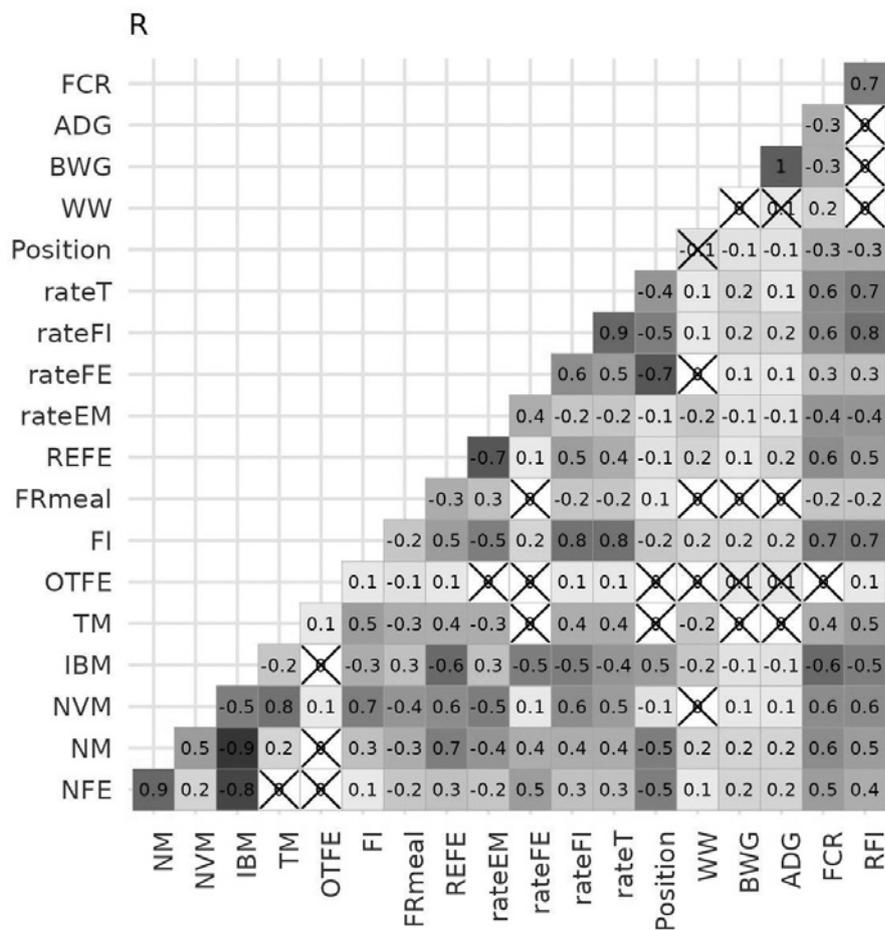
En cuanto a los marcadores de posición jerárquica o dominancia sobre los compañeros de jaula, las correlaciones entre todos ellos fueron muy variables. Fueron muy bajas entre rateEM y rateFI y rateT (-0,2), bajas entre rateEM y rateFE (0,4), moderadas entre rate FE y rateFI (0,6) y rateT (0,5) y muy altas entre rateFI y rateT (0,9). Así, el animal que comió la mayor parte del pienso consumido en un día dentro de una jaula fue el que pasó más tiempo en el comedero. Por otra parte, el animal que acudía con más frecuencia al comedero era el que tenía más visitas al comedero en las que no comía que sus compañeros de jaula. La posición se correlacionó negativa y moderadamente con todos los demás marcadores (entre -0,4 y -0,7), excepto con la rateEM (-0,1). Así, un animal que comía primero era un animal que, de media, ocupaba el comedero más veces, pasaba más tiempo en el comedero y comía una mayor cantidad del pienso suministrado cada día que sus compañeros de jaula.

La correlación entre la posición y los caracteres de eficiencia alimentaria fue de -0,3 tanto para FCR como para RFI. Así pues, los animales que comían primero eran menos eficientes a la hora de transformar el pienso en ganancia de peso corporal. La relación entre todos los demás marcadores de la dominancia sobre los compañeros de jaula y el RFI y el FCR fue muy similar. Un animal más eficiente iba al comedero con menos frecuencia, pasaba menos tiempo en él y comía menos pienso consumido en un día que sus compañeros de jaula. Esto podría corresponder a un mayor gasto energético para mantener la posición jerárquica de los dominantes. Además, teniendo en cuenta que la restricción de alimento parece estar asociada a una mejora de la eficiencia alimentaria, los conejos dominantes podrían estar produciendo un efecto sobre la eficiencia alimentaria de sus compañeros de jaula al limitar la cantidad de alimento que pueden ingerir.

La correlación de la posición y todos los demás marcadores de dominancia con los caracteres de comportamiento alimentario fue de moderada a baja. Por ejemplo, las correlaciones entre posición e IBM, NM y NFE fueron de 0,5, -0,5 y -0,5, respectivamente. Así, los animales que comían primero comían más veces y dejaban transcurrir menos tiempo entre comidas.

Por otra parte, en promedio, los animales que comían primero comían más veces (rateFE) más cantidad (rateFI) y ocupaban el comedero más tiempo (rateT) que sus compañeros de jaula.

Figura 1. Correlaciones fenotípicas en el grupo de animales racionados



Agradecimientos

Financiado por los proyectos PID2021-128173OR-C21, RTI2018-097610-R-I00 y RTA2014-00015-C02-0. Agradecemos el trabajo e implicación del personal de la granja cunícola IRTA.

Bibliografía

- Cavani L, Brown WE, Parker Gaddis KL, Tempelman RJ, VandeHaar MJ, White HM, Peñagaricano F, Weigel KA. 2022. Estimates of genetic parameters for feeding behavior traits and their associations with feed efficiency in Holstein cows. *J Dairy Sci* 105(9):7564-7574.
- Herrera-Cáceres W, Ragab M, Sánchez JP. 2020. Indirect genetic effects on the relationships between production and feeding behaviour traits in growing Duroc pigs. *Animal* 14(2):233-242.
- Núñez P, Gol S, Reixach J, Casto Rebollo C, Ibáñez-Escriche N. 2023. Incorporation of feeding behaviour traits to increase the genetic gain of feed efficiency in Pietrain pigs. *J Anim Breed Genet* doi: 10.1111/jbg.12773

Forraje verde hidropónico de maíz (*Zea mays*) como suplemento alimenticio sobre los parámetros productivos del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en la etapa de engorde

Green hydroponic maize (Zea mays) forage as a nutritional supplement on the productive parameters of rabbit (Oryctolagus cuniculus) in the fattening stage.

Durán-García M, Caridad-del Rosario J

Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, República Dominicana.

Mary.duran02@gmail.com

Resumen

El forraje verde hidropónico (FVH) es considerado como un sistema de producción que permite la obtención de biomasa vegetal de alta sanidad y calidad nutricional para los animales. Además, el FVH se caracteriza por ser un insumo alimenticio fácil y rápido de producir en cualquier época del año, condición climática y lugar geográfico. Por estas razones es una excelente alternativa para la alimentación de las diferentes especies de interés zootécnico. Por ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del FVH de maíz como suplemento alimenticio en los parámetros productivos del conejo en la etapa de engorde. El estudio fue realizado bajo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos (que incluyeron: un grupo de animales que fueron alimentados con 100% de pienso comercial (testigo) y tres grupos experimentales que recibieron dietas suplementadas con un 10, 20 y 30% de FVH de maíz) y 4 repeticiones. Tres conejos, alojados en una jaula individual, fueron considerados la unidad experimental. Las variables evaluadas fueron: consumo medio diario, ganancia media diaria y rendimiento de canal. Los resultados indican que las referidas variables no resultaron afectadas ($P>0,05$) por efecto de los tratamientos. Sin embargo, el análisis de costo beneficio favoreció al grupo testigo, permitiendo un valor de retorno por cada peso invertido de RD\$ 2,95, en contraste con los tratamientos que se les ofertó un 10, 20 y 30%, los cuales arrojaron valores de RD\$ 1,00, 0,51 y 0,15, respectivamente.

Palabras clave: conejo, alimentación, forraje verde hidropónico, maíz.

Summary

Hydroponic Green Fodder (HGF) is considered as a production system that allows obtaining plant biomass of high health and nutritional quality for animals. In addition, the HGF is characterized by being a food input that is easy and fast to produce at any time of the year, climatic condition and geographical location. For these reasons it is an excellent alternative for feeding different species of zootechnical interest. For this reason, the objective of this research was to evaluate the effect of maize HGF as a food supplement on the productive parameters of rabbits in the fattening stage. The study was carried out under a completely randomized design with four treatments (which included: a group of animals that were fed with 100% commercial feed and three experimental groups that received diets supplemented with 10, 20 and 30% of corn HGF) and 4 repetitions. Three rabbits, housed in an individual cage, were considered the experimental unit. The variables evaluated were: average daily consumption, average daily gain and channel performance. The results indicate that the aforementioned variables were not affected ($P>0.05$) by the effect of the treatments. Although, the cost benefit analysis favored the control group, allowing a return value of RD\$2.95 for each peso invested, in contrast to the treatments that were offered 10, 20 and 30%, which yielded values of RD\$ 1.00, 0.51 and 0.15, respectively.

Keywords: rabbit, feeding, hydroponic green fodder, maize.

Introducción

La técnica del Forraje Verde Hidropónico (FVH) se basa en el cultivo sin suelo, ya que el proceso de germinación y desarrollo del este cultivo es realizado mediante la utilización de riegos con agua hasta que los brotes alcancen una longitud de 3 a 4 cm; a partir de ese momento, se continúan los riegos con una solución nutritiva con el fin de proporcionarle los nutrimentos necesarios para el óptimo crecimiento del forraje. Usualmente, se utilizan semillas de maíz, avena, cebada, trigo y sorgo (Juárez-López *et al.*, 2013).

El FVH es considerado como un sistema de producción que permite la obtención de biomasa vegetal de alta sanidad y calidad nutricional para los animales. Además, el FVH se caracteriza por ser un insumo alimenticio fácil y rápido de producir en cualquier época del año, condición climática y lugar geográfico (siempre y cuando se establezcan las condiciones mínimas necesarias para ello); por lo que es una excelente alternativa de alimentación en la producción de animales de interés zootécnico (Sánchez *et al.*, 2011).

En este sentido, esta técnica agrícola permite la optimización de forraje verde fresco. De acuerdo a unas previsiones realizadas por Sánchez *et al.* (2011), su utilización genera ventajas, tales como: mejora de la conversión alimenticia animal, el costo es inferior a la alimentación en base a concentrados comercial y permite un ahorro de espacio, energía y labores culturales.

Por todo lo mencionado anteriormente, la presente investigación fue realizada con el objetivo de evaluar el efecto técnico y económico de la sustitución parcial de concentrado comercial por FVH de maíz en la alimentación de conejos en la etapa de engorde.

Material y métodos

El estudio se realizó en el módulo cunícola de la Estación Experimental Pedro Brand del Centro de Producción Animal (CPA) del IDIAF. Para esta investigación se utilizó un diseño completamente al azar evaluando cinco (5) tratamientos con 4 repeticiones cada uno. La unidad experimental estuvo compuesta por una jaula con tres (3) conejos. Los tratamientos fueron aplicados a los animales al momento del destete (32 días de edad).

Los tratamientos consistieron en: un grupo control, constituido por animales que fueron alimentados exclusivamente con alimento balanceado comercial (FVH0), y tres grupos experimentales que recibieron una dieta que incluyó alimento balanceado complementado con un 10, 20 y 30 por 100 de FVH de maíz (correspondientes a los tratamientos FVH10, FVH20 y FVH30, respectivamente).

El efecto de la utilización del FVH de maíz en los índices productivos, se evaluó tomando en consideración las siguientes variables: la Ganancia Media Diaria (GMD); el Consumo Medio de Alimento (CMA); y el Rendimiento de la canal (RC). Las mismas fueron registradas desde el inicio del experimento hasta el momento de sacrificio de los animales, que se produjo a los 60 días.

Los parámetros considerados en el estudio fueron evaluados a través de un análisis de varianza con la ayuda del software estadístico INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2008). Además, con la finalidad de determinar la factibilidad económica de la inclusión de FVH de maíz en la dieta para los conejos, fue realizado un análisis de costo marginal (CIMMYT, 1988).

Resultados y discusión

1. Consumo de alimento balanceado y FVH de maíz

Tabla 1. Consumos promedio/animal de alimento balanceado y FVH de maíz en conejos de engorde

Tratamiento	Alimento balanceado (g)	FVH (MS) (g)	CMD AB + FVH (g)
FVH0	3612,00	0	73,71
FVH10	3208,78	467	75,02
FVH20	2926,33	894	77,97
FVH30	2338,68	915	66,40

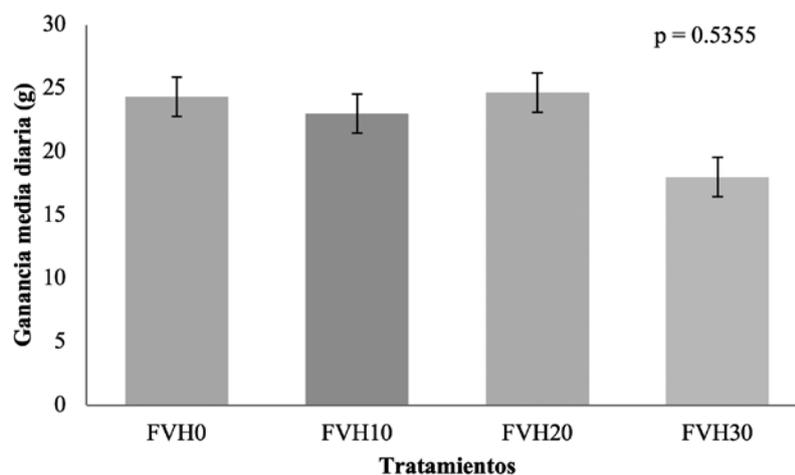
FVH= Forraje Verde Hidropónico; AB= Alimento Balanceado; CMD= Consumo Medio Diario; FVH0 = grupo control (alimentados 100% con pienso comercial); FVH10 = conejos alimentados con concentrado + un 10% de forraje verde hidropónico de maíz; FVH20= Grupo experimental que recibió alimento balanceado + un 20% de forraje verde hidropónico de maíz y FVH30= animales que se les ofreció alimento balanceado y una suplementación de un 30% de forraje verde hidropónico de maíz.

En la **tabla 1** se muestra el consumo promedio por animal de alimento balanceado y FVH de maíz durante el periodo experimental. En la misma se puede contestar que los valores relativo al CMD de alimento total no fue estadísticamente significativo ($p>0.05$).

Aunque los tratamientos fueron estadísticamente similares, se puede observar que en los animales pertenecientes al grupo experimental con un mayor suministro de FVH de maíz, la ingesta total de alimento fue menor. Ello debido a que en estos conejos se evidenció un rechazo importante del referido forraje. Este hecho, posiblemente, este relacionado con el aspecto que caracteriza el FVH (es un insumo muy voluminoso por su alto contenido de humedad). Fuentes *et al.* (2011) reportaron unos resultados similares, ya que observaron una disminución del consumo de FVH de avena al aumentar su oferta.

2. Ganancia media diaria de peso

Figura 1. Ganancia media diaria de pesos en conejos de engorde alimentados con forraje verde hidropónico de maíz como suplemento alimenticio.



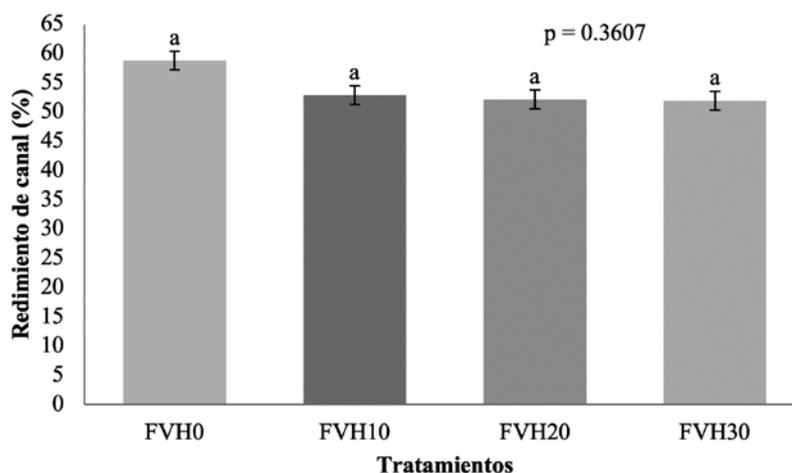
FVH0 = grupo control (alimentados 100% con pienso comercial); FVH10 = conejos alimentados con concentrado + un 10% de forraje verde hidropónico de maíz; FVH20= Grupo experimental que recibió alimento balanceado + un 20% de forraje verde hidropónico de maíz y FVH30= animales que se les ofreció alimento balanceado y una suplementación de un 30% de forraje verde hidropónico de maíz.

Cabe explicitar que los animales pertenecientes al grupo experimental FVH30 obtuvieron GMD inferior (18g/día/animal) a los tratamientos FVH0, FVH10 y FVH20, que presentaron valores relativo a este parámetro de 24, 23 y 25g, respectivamente. Posiblemente, este hecho se debió a que estos conejos ingirieron una menor cantidad de alimento durante desarrollo del experimento. Sin embargo, como se puede constatar en la **figura 1**, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

Estos resultados son diferentes a los reportados por Sanchez *et al.* (2011) al evaluar FVH de maíz deshidratado como suplemento en la alimentación de conejos de engorde; en razón de que obtuvieron ganancias medias diarias inferiores a la de este estudio (estimada en 16.22 g/día/animal).

3. Rendimiento de la canal

Figura 2. Valores correspondientes al rendimiento de canal obtenido en conejos de engorde alimentados con forraje verde hidropónico de maíz como suplemento alimenticio.



FVH0 = grupo control (alimentados 100% con pienso comercial); FVH10 = conejos alimentados con concentrado + un 10% de forraje verde hidropónico de maíz; FVH20 = Grupo experimental que recibió alimento balanceado + un 20% de forraje verde hidropónico de maíz y FVH30 = animales que se les ofreció alimento balanceado y una suplementación de un 30% de forraje verde hidropónico de maíz.

En la **figura 2** se muestran los resultados concernientes a los rendimientos en canal de los grupos experimentales. En la misma se puede contestar que los tratamientos son estadísticamente similares ($p > 0,05$). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sanchez *et al.* (2011). En razón de que reportaron que se puede incluir hasta un 60% de FVH de maíz en dietas para conejos de engorde sin afectar el referido parámetro.

4. Análisis económico

Tabla 2. Beneficio bruto en campo correspondiente a la respuesta productiva de conejos en la etapa de engorde alimentados con diferentes niveles de FVH de maíz

Tratamiento	Peso inicial	Ganancia de peso (g)	Peso final	Rendimiento canal (%)	Rendimiento carne(g)	Bb en campo \$RD*
FVH0	921	1114	2035	59	657,26	216,90
FVH10	854	1054	1908	53	558,62	184,34
FVH20	810	1147	1957	52	596,44	196,83
FVH30	766	823	1589	52	427,96	141,23

En la **tabla 2** se puede observar que el beneficio bruto generado por el grupo experimental que recibió 100% de alimento balanceado fue mayor que los grupos experimentales cuyas dietas estuvieron complementadas con FVH de maíz. Este resultado se atribuye a que la GMD en este grupo experimental fue mayor con relación a los demás tratamientos. Este hecho unido al mayor costo de la dieta complementada FVH de maíz, influyó en que el beneficio neto para el tratamiento testigo (FVH0) fuera mayor (ver **tabla 3**).

Tabla 3. Beneficios netos de las tecnologías evaluadas

Variable económica	Unidad	FVH0	FVH10	FVH20	FVH30
Rendimiento	(g) pv	657.26	558.62	596.44	427.96
Rendimiento ajustado*	(g) pv	591.53	502.76	536.80	385.16
Beneficio bruto	\$RD/periodo	216.90	184.34	196.83	141.23
Costo FVH Maíz	\$RD/periodo	-	46.81	90.26	92.37
Costo alim balanceado	\$RD/periodo	54.85	45.33	39.78	30.10
Costos totales que varían	\$RD/periodo	54.85	92.14	130.04	122.47
Beneficio neto	\$RD/periodo	162.04	92.21	66.79	18.76

*= rendimiento medio reducido en un 10 por 100

Tabla 4. Relación costo beneficio de las tecnologías en estudio

Tratamiento	CTV	BN	rel C:B
FVH0	54.85	162	2.95
FVH10	92.14	92	1.00
FVH20	130.04	67	0.51
FVH30	122.47	19	0.15

CTV: costo; BN: beneficio; rel C:B: relación entre coste y beneficio

Conclusión

El forraje verde hidropónico (FVH) de maíz es un insumo alimenticio que no afecta significativamente el rendimiento productivo de conejos en etapa de engorde. Sin embargo, su utilización en explotaciones cunícola, de acuerdo a esta experiencia, no es económicamente factible.

Los altos niveles de inclusión del referido forraje en fresco afectan de manera considerable su consumo voluntario.

Bibliografía

- CIMMYT. 1988. *La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos: un manual metodológico de evaluación económica*. CIMMYT, México.
- Di Rienzo J. A., C. F. 2008. *InfoStat, version 2008*. Córdoba: Grupo InfoStar, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Fuentes Carmona F., Poblete Pérez C., Huerta Pizarro M. 2011. *Respuesta productiva de conejos alimentados con forraje verde hidropónico de avena, como reemplazo parcial de concentrado comercial*. *Acta Agronómica* 60(2): 183-189.
- Juárez-López P., Morales-Rodríguez H., Sandoval-Villa M., Gómez Danés A., Cruz-Crespo E., Juárez-Rosete C. R., Aguirre-Ortega J., Alejo-Santiago G., Ortiz-Catón M. 2013. *Producción de forraje verde hidropónico*. CONACYT.
- Sánchez Laiño A., Meza Chica A., Álvarez Tubay A., Rizzo Zamora L., Guadalupe Puente Á., 2011. *Forraje verde hidropónico de maíz (Zea mays) deshidratado en el engorde de conejos nueva zelandia (Oryctolagus cuniculus)*. *Revista Ciencia y Tecnología* 3(2), 21-23.

REPRODUCCIÓN

Efecto del factor de crecimiento nervioso recombinante de conejo microencapsulado con quitosano en los parámetros seminales de conejo

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

Métodos de bioestimulación basados en comunicación química: implicación en la reproducción de conejos macho. Estudio preliminar

Villamayor PR, Yáñez U, Gullón J, Pampín M, Casanova A, Cavalcanti I, Zarhouti A, Quintela LA, Sánchez-Quinteiro P

Efectos de la frecuencia de recogida y de la adición de alarelina a la dosis seminal en la calidad espermática. Estudio preliminar

Yáñez U, Villamayor PR, Gullón J, Pampín M, Casanova A, Zarhouti A, Cavalcanti I, Peña AI, Quintela LA, Sánchez-Quinteiro P

Crecimiento de hembras cruzadas y su efecto sobre la reproducción

Domingues V, Sánchez C, Arias JM, Pascual JJ

Efecto del factor de crecimiento nervioso recombinante de conejo microencapsulado con quitosano en los parámetros seminales de conejo

Effect of rabbit recombinant nerve growth factor microencapsulated with chitosan on rabbit semen parameters

Gimeno-Martos S.^{1,4*}, Quiroga AC¹, Bosa L^{3,5}, Arias Álvarez M2, Lorenzo PL¹, García-García RM¹, Rebollar PG³.

¹Dpto. Fisiología, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

²Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

³Dpto Producción Agraria, E.T.S.I. A.A.B., Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España.

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

⁵Dpto Agricultura, Medio Ambiente y Alimentaria. Universidad de Perugia, Borgo XX Giugno, 06100 Perugia, Italia.

*silvigim@ucm.es

Resumen

El factor de crecimiento nervioso (β NGF) tiene su papel principal en el sistema nervioso, pero se ha estudiado también su implicación en el sistema reproductivo. β NGF y sus receptores se han detectado en diferentes partes del tracto reproductor femenino y masculino del conejo, así como en el espermatozoide. Estudios previos indican que interviene en la inducción de la ovulación y, recientemente, se realizó inseminación artificial (IA) incluyendo β NGF recombinante encapsulado con quitosano (rrbNGFch) en las dosis seminales, dando resultados similares a los obtenidos administrando hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) vía intramuscular (i.m.) a la hembra. El quitosano es una molécula inerte que se emplea comúnmente en biomedicina para la microencapsulación de moléculas. El objetivo de este trabajo ha sido investigar si las esferas de quitosano per se o rrbNGFch afectan a los parámetros de calidad seminal *in vitro* en espermatozoides de conejo. Para ello, el semen diluido con diluyente comercial se incubó a 37°C durante 2h con esferas vacías de quitosano, rrbNGFch o diluyente sólo. Se analizó la viabilidad, motilidad y el estado de capacitación en el momento y después de 2 h de la incubación. El grupo con microesferas vacías de quitosano mantuvo los parámetros de calidad seminal y la capacitación, lo que sugiere que las esferas son inocuas para los espermatozoides. Tampoco se observó ningún efecto sobre la motilidad y viabilidad cuando los espermatozoides se incubaron con rrbNGF microencapsulado, pero aumentó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica a 0 h con respecto al grupo control. En conclusión, el uso de microesferas de quitosano no provocó efectos negativos en las dosis seminales, lo que sugiere que es apto para su utilización en IA. La encapsulación de rrbNGF con quitosano mantiene los parámetros de calidad seminal, provocando cambios en el estado de capacitación del semen de conejo.

Palabras clave: quitosano, rrbNGF, espermatozoide, motilidad, capacitación, conejo.

Abstract

Nerve growth factor (β NGF) has its main role in the nervous system, but it's also involved in the reproductive system. β NGF and its receptors have been detected in the female and male rabbit reproductive tracts, as well as in rabbit sperm. Previous studies indicate that it is involved in ovulation induction and recently, artificial insemination (AI) was performed with addition of chitosan encapsulated recombinant β NGF (rrbNGFch) in the seminal doses, inducing analogous results to those obtained by GnRH intramuscular (i.m) administration to the female. The chitosan is a molecule commonly used in biomedical fields for the microencapsulation of molecules. In this work, the main objective was to investigate the effect of chitosan or rrbNGFch spheres on *in vitro* semen quality parameters in rabbit spermatozoa. For this purpose, semen diluted with commercial diluent was incubated at 37°C for 2 h with chitosan spheres, rrbNGFch or diluent alone. Viability, motility and capacitation status were

analysed at addition time and after 2 h of addition. The empty chitosan microspheres group maintained sperm quality parameters and capacitation state, suggesting that the spheres are safe for spermatozoa. When spermatozoa were incubated with rrbNGFch, no effects on motility and viability were observed, but the percentage of spermatozoa with acrosome reaction at 0 h increased compared to the control group. In conclusion, the use of chitosan spheres did not cause negative effects on semen doses, suggesting that it is suitable for use in AI. Encapsulation of rrbNGF with chitosan maintains semen quality parameters, leading to changes in the capacitation status of rabbit spermatozoa.

Keywords: chitosan, rrbNGF, spermatozoa, motility, capacitation, rabbit.

Introducción

Uno de las moléculas descubiertas en los últimos años en el ámbito de la fisiología reproductiva es el factor de crecimiento nervioso β (β NGF), el cual pertenece a la familia de las neurotrofinas. Se ha demostrado su papel en la ovulación en las especies de ovulación inducida, sobre todo los camélidos (Ratto *et al.*, 2012). Además, en el caso del macho, se sabe que el β NGF del plasma seminal interviene en la maduración de los espermatozoides (Cupp *et al.*, 2000) modulando diferentes procesos a través de sus receptores. La unión de β NGF a su receptor específico (TrkA) regula la reacción acrosómica (RA) y la unión al receptor de baja afinidad p75NTR promueve la actividad mitocondrial, la capacitación y la apoptosis en los espermatozoides (Castellini *et al.*, 2020). Por otro lado, la adición de β NGF *in vitro* promueve la motilidad de los espermatozoides (humano: Shi *et al.*, 2012, hámster dorado: Jin *et al.*, 2010), su viabilidad (toro: Li *et al.*, 2010) y facilita la RA (hámster dorado: Jin *et al.*, 2010). Estos efectos también se han observado en los parámetros espermáticos del conejo tras la incubación con NGF humano 30 min a 37°C, aunque periodos de incubación más largos (4 u 8 h), causaban efectos negativos sobre la viabilidad (Castellini *et al.*, 2020). La incubación de espermatozoides de conejo en un estudio dosis respuesta con β NGF recombinante de la próstata de conejo (rr β NGF) (Gene bank: KX528686) durante 2 h a temperatura ambiente no mostró ningún efecto negativo sobre la viabilidad ni la motilidad total y progresiva espermática *in vitro* con respecto al control, pero sí cambios en los parámetro cinéticos a todas las concentraciones ensayadas (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2022). Cuando rr β -NGF se incluyó en la dosis seminal con el fin de inducir la ovulación en las conejas, se observó una tasa de ovulación menor que la que se obtiene con el tratamiento habitual con la inyección de análogos de GnRH (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2019), lo que podría ser debido a una degradación de rr β NGF en la mucosa vaginal. Por tanto, se decidió microencapsular rr β NGF con quitosano para intentar prolongar su vida media en las dosis seminales y que se liberara de manera paulatina en la vagina, obteniéndose resultados en la tasa de ovulación más satisfactorios (Quiroga *et al.*, 2022). El objetivo de este estudio ha sido analizar *in vitro* el efecto de la adición de rr β NGF microencapsulado en la dosis seminal y si afecta a los principales parámetros de calidad espermática, así como al estado de capacitación de los espermatozoides de conejo en condiciones similares a las vaginales.

Material y métodos

La microencapsulación del rr β NGF se llevó a cabo mediante el procedimiento de gelificación iónica entre las moléculas de rr β NGF (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). Se obtuvieron microesferas de un tamaño inferior a 10 μ m y con una relación de 0,24-0,44 μ g de rr β NGF por cada 1 mg de microesferas. Las microesferas de rr β NGF liofilizadas se resuspendieron en 1XPBS filtrado y autoclavado justo antes del experimento, a una concentración final de 1 μ g/ml de rr β NGF. Además, la solución equivalente a las esferas de quitosano sin rr β NGF se resuspendió en 1XPBS filtrado y autoclavado.

Se obtuvo el semen de tres conejos New Zealand x California mediante vagina artificial y se realizó una mezcla heterospérmica para evitar diferencias individuales. La concentración espermática del pool de muestras se estimó con una cámara de Neubauer y se prepararon las dosis seminales a una concentración de 56×10^6 espermatozoides/ml con un diluyente comercial (Inserbo S.L., Lérida, España). Posteriormente, estas dosis se incubaron en una estufa a 37 °C (simulando la temperatura vaginal), estableciendo los siguientes grupos experimentales:

- Grupo control: se incubaron 500 μ l de la dosis seminal con 500 μ l del diluyente comercial.
- Grupo Ch: se incubaron 500 μ l de la dosis seminal con 500 μ l de la solución stock de 1 μ g/mL de esferas de quitosano vacías.
- Grupo rr β NGFch: se incubaron 500 μ l de la dosis seminal con 500 μ l de la solución stock de 1 μ g/ml de rr β NGF microencapsulado.

Para comprobar el efecto de rrβNGF microencapsulado o de las esferas de quitosano vacías, se estudiaron diferentes parámetros de calidad seminal a 0 y 2 horas tras la incubación. Se evaluó la viabilidad con la tinción de eosina-nigrosina y la motilidad espermática (total y progresiva) mediante un sistema de análisis computarizado (ISAS 1.04; Proiser SL, Valencia, Spain) acoplado a un microscopio de contraste de fases. Para evaluar si afecta a la capacitación, las muestras se tiñeron con clorotetraciclina (CTC), clasificando los espermatozoides según Castellini *et al.* (2019), en tres subtipos bajo el microscopio de fluorescencia: no capacitados, capacitados y reaccionados acrosómicamente. Se realizaron tres replicados del experimento y el análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPpad InStat (5.01, San Diego, CA, EEUU) con un test Chi2.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos de los parámetros de calidad seminal (motilidad y viabilidad) de los 3 grupos experimentales se muestran en la **Tabla 1**.

A 0 h, la viabilidad y la motilidad total fueron similares en todos los grupos, incluso con valores más altos, pero no estadísticamente significativos, en el grupo rrβNGFch. La motilidad disminuyó de manera drástica en todos los grupos experimentales tras 2 horas de incubación. El semen de conejo se suele conservar a una temperatura de 15-18° C en medios basados en Tris-Citrato, como el comercial utilizado en este experimento (Roca *et al.*, 2000). En este experimento, la temperatura aplicada para simular el ambiente vaginal durante 2 horas fue más elevada (37°C) a la de almacenamiento, lo que sugiere que, se pudo alterar el metabolismo celular con el medio comercial, afectó negativamente, disminuyendo drásticamente la motilidad en todos los grupos. Sin embargo, otros medios como Tyrode/FERT/TALP o PBS en esas mismas condiciones no causan valores tan bajos en los parámetros de calidad de los espermatozoides de conejo (Castellini *et al.*, 2019), debido posiblemente a que contienen moléculas necesarias (como piruvato, bicarbonato, lactato, BSA) para su mantenimiento fisiológico óptimo.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que el uso de microcápsulas vacías de quitosano puede dar lugar a la formación de agregados y afectar a la viabilidad celular (Piotrowska-Kirschling *et al.*, 2020). Las muestras incubadas con las esferas de quitosano *per se* o *conteniendo rrβNGF* presentaron *parámetros cinéticos y de viabilidad similares al grupo control a tiempo 0 h y tras la incubación de 2 horas. Este hecho es importante, porque indicaría que la utilización de este compuesto en las dosis seminales durante la IA en conejas no produce efectos negativos en los espermatozoides. Esto podría explicar los buenos resultados de fertilidad obtenidos en estudios previos utilizando rrbNGF microencapsulado (Quiroga et al., 2022).*

Tabla 1. Viabilidad (V), motilidad total (MT) y progresiva (MP) en muestras espermáticas antes (0h) y después (2h) de incubar a 37 °C con diluyente (Control), con esferas de quitosano vacías (Ch), con rrβNGF microencapsulado (rrβNGFch).

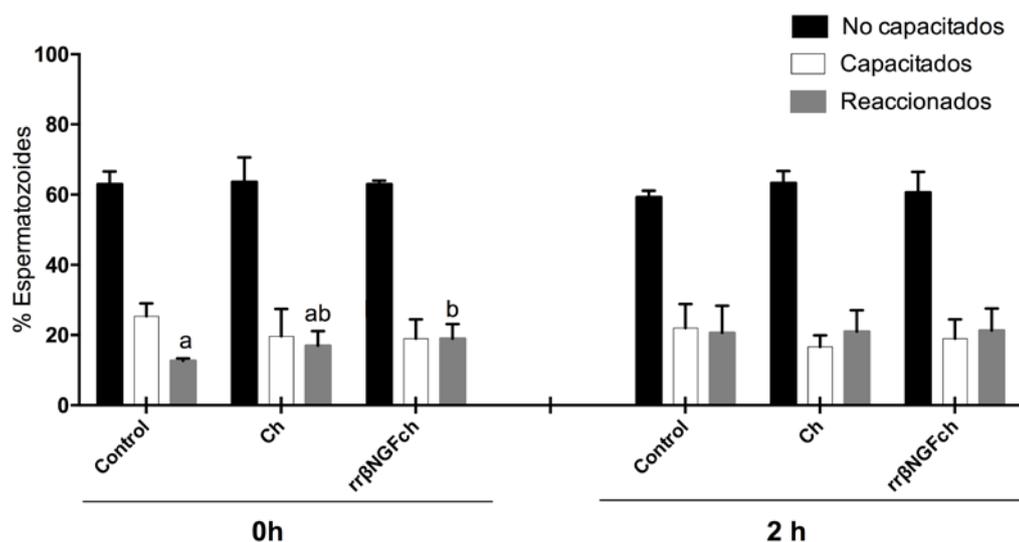
	0 horas			2 horas		
	Control	Ch	rrβNGFch	Control	Ch	rrβNGFch
V (%)	67,67 ± 5,78	66,0 ± 6,66	75,0 ± 1,53 ^x	56,0 ± 4,58	57,67 ± 6,67	58,33 ± 0,88 ^y
MT (%)	92,40 ± 2,25 ^x	92,50 ± 2,30 ^x	92,83 ± 0,97 ^x	12,37 ± 2,40 ^y	13,43 ± 4,02 ^y	14,17 ± 1,58 ^y
MP (%)	55,60 ± 6,93 ^x	60,83 ± 4,44 ^x	58,27 ± 7,43 ^x	4,87 ± 1,30 ^y	5,57 ± 2,20 ^y	6,13 ± 0,22 ^y

Los resultados se muestran como media ± SEM de n=3. Las letras (x, y) indican diferencias significativas (p<0,05) entre tiempos de los mismos grupos experimentales

El estudio del estado de capacitación con CTC se muestra en la **figura 1**. El porcentaje de espermatozoides no capacitados y capacitados en todos los grupos experimentales antes (0 h) y después de la incubación (2 h) fue similar y estuvo alrededor del 60% y del 20% respectivamente en todos ellos. Este resultado sería normal, teniendo en cuenta que los tiempos de incubación para que el semen de conejo capacite son mínimo de 6 horas (Zeng *et al.*, 1999). Además, se observó un ligero aumento del porcentaje de espermatozoides reaccionados a tiempo 0h en el grupo rrβNGFch respecto al grupo control, que no se vio reflejado tras finalizar el periodo de incubación. La inducción de la reacción acrosómica gracias al uso de β-NGF exógeno en los espermatozoides

ya había sido descrito en espermatozoides de hámster a 0,5 µg/ml (Jin et al., 2010) y en conejo al utilizar β-NGF humano a 0,1 µg/ml (Castellini et al., 2019) en las mismas condiciones.

Figura 1. Porcentaje de las subpoblaciones de espermatozoides de conejo según el estado de capacitación evaluado por la tinción con clorotetraciclina (CTC); No capacitados; Capacitados; Acrosoma reaccionado) de muestras control, incubadas con esferas de quitosano (Ch) o con rrβNGF microencapsulado (rrβNGFch) a 0 y 2 horas. Los resultados se muestran como media ± SEM de n=3. Las letras (a, b) indican diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos experimentales en el mismo tiempo.



En conclusión, el uso de las esferas de quitosano no afecta negativamente en las dosis seminales. La utilización de rrβNGF microencapsulado mantiene los parámetros de calidad seminal, pero se necesitan más estudios con otros medios más específicos de capacitación y temperaturas no tan elevadas para conocer si tendría efectos beneficiosos en las dosis seminales que pudieran ser aplicables en técnicas de capacitación in vitro, IA y fecundación in vitro (FIV).

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 Universidades y la Unión Europea-NextGenerationEU.

Bibliografía

- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, et al. 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology* 3:203-230.
- Castellini C, Mattioli S, Dal Bosco A, Collodel G, Pistilli A, Stabile AM, Macchioni L, Mancuso F, Luca G, Rende M. 2019. In vitro effect of nerve growth factor on the main traits of rabbit sperm. *Reprod Biol Endocrinol* 12;17(1):93.
- Castellini C, Mattioli S, Bosco AD, Cotozzolo E, Cartoni Mancinelli A, Rende M, Stabile AM, Pistilli A. 2020. Nerve growth factor receptor role on rabbit sperm storage. *Theriogenology* 1;153:54-61.
- Castellini C, Mattioli S, Dal Bosco A, Mancinelli AC, Rende M, Stabile AM, Pistilli A. 2020. Role of NGF on sperm traits: A review. *Theriogenology* 1;150:210-214.
- Cupp AS, Kim GH, Skinner MK. 2000. Expression and action of neurotrophin-3 and nerve growth factor in embryonic and early postnatal rat testis development. *Biol Reprod* 63(6):1617-28.

- Jin W, Tanaka A, Watanabe G, Matsuda H, Taya K. 2010. Effect of NGF on the motility and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa in vitro. *J Reprod Dev* 56(4):437-43.
- Li C, Sun Y, Yi K, Ma Y, Sun Y, Zhang W, Zhou X. 2010. Detection of nerve growth factor (NGF) and its specific receptor (TrkA) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function. *Theriogenology* 74(9):1615-22.
- Piotrowska-Kirschling A, Brzeska J. 2020. The Effect of Chitosan on the Chemical Structure, Morphology, and Selected Properties of Polyurethane Chitosan Composites. *Polymers (Basel)* 25;12(5):1205.
- Quiroga AC, García- García RM, Arias-Alvarez M, Gimeno-Martos S, Lorenzo PL, Rebollar PG. 2022. Inducción de ovulación de conejas con rrBNGF microencapsulado. En: 11th World Rabbit Congress. Pineda del Mar, España, pp. 289-292.
- Ratto MH, Leduc YA, Valderrama XP, van Straaten KE, Delbaere LT, Pierson RA, Adams GP. 2012. The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 11;109(37):15042-7.
- Roca J, Martínez S, Vázquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martínez EA. 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 °C. *Animal Reproduction Science* 64: 103-112.
- Sánchez-Rodríguez A, Abad P, Arias-Alvarez M, Rebollar PG, Baitista JM, Lorenzo PL, García- García RM. 2019. Recombinant rabbit beta nerve growth factor production and its biological effects on sperm and ovulation in rabbits. *PLoS ONE* 14(7): e0219780.
- Sánchez-Rodríguez A, Arias-Alvarez M, Lorenzo PL, Rebollar PG, , García- García RM. 2022. Effect of recombinant rabbit B-NGF on viability and motility of raw rabbit semen over time. En: 19th International Congress on Animal Reproduction. Bologna, Italia. Póster.
- Shi C, Lin K, Xu X, Zhang S, Wang N, Fan M. 2012. Evidence for the involvement of NGF in human sperm motility. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 5, 534-541.
- Zeng SM, Zhu SE, Wang YS, Chen XJ, Zhang ZC, Chen YF. 1999. An efficient method for in vitro fertilization in rabbits. *Anim Biotechnol* 10(1-2):15-23.

Métodos de bioestimulación basados en comunicación química: implicación en la reproducción de conejos macho. Estudio preliminar

Assessment of biostimulation methods based on chemical communication in buck reproduction. Preliminary study.

Villamayor PR^{1,2a}, Yáñez U^{3*a}, Gullón J⁴, Pampín M², Casanova A², Cavalcanti I³, Zarhouti A⁵, Quintela LA³, Sánchez-Quinteiro P¹

¹Dept. Anatomía, Producción Animal y Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidade de Santiago de Compostela (USC), 27002, Lugo, España.

²Dept. Patología Animal, USC.

³Cogal SA, 36530, Rodeiro, España.

⁴Dept. Zoología, Genética y Antropología Física, USC.

⁵Laboratorio de Fisiopatología, Genética Molecular y Biotecnología, Universidad Hassan II de Casablanca, Casablanca, Marruecos.

*uxia.yanez.ramil@usc.es

^aAmbas autoras han contribuido por igual

Resumen

La bioestimulación es una práctica de manejo animal que ayuda a mejorar los parámetros reproductivos modulando los sistemas sensoriales de los animales. Las señales químicas, conocidas principalmente como feromonas, tienen un gran potencial en este sentido. Este estudio se llevó a cabo para determinar la influencia de la exposición a corto plazo de conejos machos a diferentes secreciones biológicas, potencialmente mediadas por feromonas, sobre los parámetros reproductivos de los machos. Se expusieron grupos de 18 machos cada uno a 1) orina de hembra, 2) fluido vaginal y 3) fenoxietanol como potencial feromona reproductiva, justo antes de la recogida de semen. Un grupo control fue expuesto a agua destilada. Se realizaron los siguientes análisis de semen para cada grupo: volumen, concentración espermática, y caracterización de espermatozoides móviles, progresivos, progresivos rápidos, progresivos medios, no progresivos, inmóviles y vivos. Encontramos mayor volumen de semen en el grupo control que en el grupo expuesto a orina de hembra. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides móviles, progresivos, rápidos progresivos y medios progresivos fue mayor en cualquiera de los grupos experimentales que en el grupo control, y el porcentaje de espermatozoides inmóviles y no progresivos fue en general mayor en el grupo control que en el resto de los grupos experimentales. Esto indica que la motilidad espermática aumenta cuando los animales son expuestos a fluidos biológicos específicos que contienen feromonas. En conclusión, nuestros resultados respaldan la importancia de las feromonas en la reproducción, en particular en conejos, y animan a realizar futuros estudios que busquen implementar el uso de feromonas en cunicultura para mejorar determinados parámetros reproductivos y productivos en conejos de granja.

Palabras clave: bioestimulación, comunicación química, feromonas, comportamiento reproductivo en machos, semen.

Abstract

Biostimulation is an animal management practice that helps improving reproductive parameters by modulating animal sensory systems. Chemical signals, mostly known as pheromones, have a great potential on this regard. This study was conducted to determine the influence of short-term male rabbit exposure to different biological secretions, potentially pheromone-mediated, on reproductive parameters of males. Groups of 18 males/each were exposed to 1) female urine, 2) vaginal fluid, and 3) fenoxietanol as a source of pheromones, just before semen collection. A control group was exposed to distilled water. The following semen analysis were performed for each

group: semen volume, spermatozoa concentration, and characterization of motile, progressive, fast progressive, medium progressive, non-progressive, immotile, and alive. We found higher semen volume in the control group than in the group exposed to female urine. However, the percentage of motile, progressive, fast progressive and mid-progressive spermatozoa was higher in any of the experimental groups than in the control group, and the percentage of immotile and non-progressive spermatozoa was generally higher in the control group than in the rest of the experimental groups. This indicates that sperm motility increases when animals are exposed to specific biological fluids containing pheromones. In conclusion, our results support the importance of pheromones in reproduction, particularly in rabbits, and encourage future studies that seek to implement the use of pheromones in rabbit husbandry to improve certain reproductive and productive parameters in farmed rabbits.

Keywords: biostimulation, chemical communication, pheromones, reproductive behaviour in males, semen.

Introducción

La mayoría de los mamíferos emplean señales químicas para intercambiar información entre ellos y con el ambiente (Wyatt, 2014). Estas señales sensoriales, principalmente conocidas como feromonas, están directamente implicadas en comportamientos reproductivos, y por lo tanto resultan esenciales para la supervivencia de los individuos y de la especie. Las feromonas son liberadas al medio mediante secreciones biológicas (p.ej. orina, fluido vaginal, etc.) o glándulas exocrinas (p.ej. glándula mentoniana, lacrimal, etc.), desencadenando una reacción específica en otro individuo de la misma especie.

Debido a la condición especie-específica y a la amplia naturaleza molecular de las feromonas, los estudios sobre su composición química han sido escasos en la bibliografía –sólo 63 feromonas han sido caracterizadas en mamíferos (Apps *et al.*, 2015)–. Un ejemplo es el fenoxietanol, un compuesto químico característico de las glándulas mentonianas de los conejos machos que es sintetizado en mayor concentración cuanto mayor es el grado de dominancia del macho. Dado que olfativamente es inerte para los conejos su potencial como semioquímico es muy elevado (Hayes *et al.*, 2003). Sin embargo, la mayor parte de trabajos científicos hasta la fecha han sido basados en análisis comportamentales. Por ejemplo, algunos autores han especulado que la estimulación de conejos machos mediante su exposición a hembras justo antes de la recogida del semen podría incrementar la concentración de espermatozoides (Castellini, 2008). Un estudio posterior confirmó que la exposición de machos a hembras incrementa la libido y también la calidad y cantidad de eyaculado (Rodríguez de Lara *et al.*, 2010). Sin embargo, no se conoce qué secreciones biológicas (p. ej. orina de hembra, fluido vaginal) podrían ser responsables de dichas mejoras. *La hipótesis de nuestro estudio es que la orina de hembra, el fluido vaginal, y el fenoxietanol como potencial feromona reproductiva, podrían ser responsables de una mejora en la calidad y volumen de semen en conejos macho. De manera específica, en este estudio se ha caracterizado el efecto que tiene 1) la orina de hembra, 2) el fluido vaginal y 3) el fenoxietanol, sobre el volumen de semen, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos, inmóviles, móviles, no progresivos, progresivos, medios progresivos y rápidos progresivos.*

Material y métodos

Animales: 72 conejos macho de raza Hyplus PS40, de entre 5 – 7 kg de peso vivo y 45 – 163 semanas de edad, pertenecientes a la granja Cogal SA (Rodeiro, España) fueron incluidos en este estudio. Asimismo, 45 hembras > 180 d, raza Hyplus PS19 y 3,5 – 5 kg de peso vivo fueron empleadas para la recogida de secreciones biológicas necesarias para el experimento. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en instalaciones propias de la empresa, aunque hembras y machos estuvieron localizados en granjas diferentes separadas por al menos 4 km. Todas las naves contaron con sistema de ventilación forzada, temperatura entre 18 – 22°C e intensidad lumínica de 70 lux. De acuerdo a los estándares de la granja, se establecieron ciclos de iluminación artificial con 12 h de luz y 12 h de oscuridad, y la alimentación y bebida fueron proporcionadas *ad libitum*.

Obtención de secreciones biológicas: La orina de hembra (A) se obtuvo 24 h antes del procedimiento experimental mediante cistocentesis en conejas y se conservó a 4 °C hasta el momento de la exposición. Los hisopos vaginales (C) se obtuvieron el mismo día de la exposición; para ello, hisopos estériles se introdujeron en la vagina de hembras múltiparas, no lactantes y con color de la vulva distinto de blanco (Villamayor *et al.*, 2022), durante 15 segundos y sin realizar movimientos internos para garantizar la impregnación de fluido vaginal y evitar contaminación con sangre u orina, respectivamente. De cada hembra se obtuvieron dos muestras de fluido vaginal. Hisopos con orina o sangre fueron descartados.

El fenoxietanol (Sigma) se aplicó a una concentración de 1% en etanol al 20%. Para la recogida de semen se siguió el protocolo habitual de la granja.

Diseño experimental: El número total de individuos (72 conejos macho) fue dividido en cuatro grupos (18 animales/grupo) de acuerdo a su exposición a diferentes compuestos: grupo A (orina hembra), grupo B (fenoxietanol), grupo C (hisopo vaginal) y grupo D (agua destilada, grupo control). Estos cuatro grupos se distribuyeron de manera estratégica dentro de una misma nave para garantizar las mismas condiciones ambientales y al mismo tiempo evitar cruzamientos entre los diferentes compuestos gracias a los sistemas de ventilación forzada. El procedimiento experimental consistió en la aplicación de la sustancia correspondiente en forma de aerosol (spray nasal directamente en las fosas nasales) en los grupos A,B,D; o aproximando el hisopo directamente en la zona nasal en el grupo C. En el grupo C se permitió la interacción del animal con el hisopo (oler, morder) durante 10 segundos. Las sustancias se aplicaron tres veces (1 ml/exposición/animal (A,B,D); un hisopo/exposición/animal (C)) en un período de 2,5 h (2,5, 1,5 y 1 h antes de la recogida del semen).

Análisis de datos: Inmediatamente después de la recogida de semen, se midió el volumen total/individuo de semen sin gel y se diluyeron 100 μ l de semen en diluyente comercial a una dilución 1:40 (mra-bit® standard, Kubus Lab SA, Las Rozas de Madrid, España). Las muestras se almacenaron a 16 °C durante un máximo de 24 h hasta ser procesadas. La motilidad y concentración espermática fueron evaluadas a las 10 h y 24 h, respectivamente, mediante el sistema CASA (Sperm Class Analyzer 6.1.0; Microptic, Barcelona, España). La configuración del equipo fue la siguiente: área mínima = 25 μ m, área máxima = 100 μ m, inmóviles < 17 μ m/s, medios = 25 μ m/s, rápidos > 50 μ m/s, progresivos SRT > 70 μ m/s. Las muestras de semen se precalentaron en un baño termostático a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se colocaron 5 μ L de muestra en una cámara de Makler (Israel Electrooptical Industry, Rehovot, Israel) y se guardaron entre 3 – 8 campos microscópicos por muestra (recuento total de espermatozoides > 500). Para el análisis se utilizó un microscopio (Eclipse E200, Nikon, Tokyo, Japan) con una platina precalentada a 37 °C y un objetivo de contraste de fases negativo a 100x aumentos. Las imágenes fueron corregidas manualmente tras su obtención para minimizar los artefactos identificados incorrectamente como espermatozoides. Asimismo, se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos (24 h tras recogida) mediante una tinción de rutina eosina-nigrosina. Para el análisis estadístico, se realizó un ANOVA de un factor (grupo) y una prueba de análisis post hoc de Dunnett para comparar todos los grupos con el grupo control (grupo D). Se incluyeron como variables el volumen total de semen obtenido (mL), y la concentración (M/mL) y el porcentaje de espermatozoides vivos, inmóviles, móviles, no progresivos, progresivos, medios progresivos y rápidos progresivos. Todos los análisis se realizaron en SPSS versión 28.0.1.1 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, EEUU). Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados y discusión

De los 72 conejos macho incluidos inicialmente en el estudio, 10 fueron eliminados por incidencias durante el experimento (p. ej. contaminación con orina, anomalías en la monta, etc.). De los 62 individuos finalmente analizados, 15, 14, 17 y 16 individuos pertenecieron a los grupos A, B, C y D, respectivamente. Los resultados obtenidos mediante el ANOVA de un factor se encuentran resumidos en la **Tabla 1**. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo D (control) y el resto de los grupos (A,B,C). El volumen de semen total fue mayor en el grupo control que en el grupo expuesto a orina de hembra. Sin embargo, el porcentaje (%) de espermatozoides móviles, progresivos, rápidos progresivos, medios progresivos y no progresivos (este último no significativo) fue mayor en cualquiera de los grupos experimentales que en el grupo control, mientras que el % de espermatozoides inmóviles fue en general mayor en el grupo control que en el resto de los grupos experimentales. Además, no se encontraron diferencias entre grupos en cuanto a concentración y porcentaje de espermatozoides vivos ($p > 0,05$). En conjunto, estos resultados indican que aunque el volumen de semen fue mayor en el grupo control que en el grupo expuesto a orina de hembra, la motilidad de los espermatozoides aumentó cuando los animales fueron expuestos a diferentes compuestos feromonales. Nuestro trabajo supone un siguiente paso al estudio comportamental de Rodríguez de Lara *et al.* (2010), quienes observaron mejoras en la calidad del eyaculado en machos tras su exposición directa a hembras.

Tabla 1. Resultados obtenidos mediante ANOVA de un factor para la comparación de 62 muestras de semen de conejos expuestos a orina de hembra (Grupo A), fenoxietanol (Grupo B), hisopo vaginal (Grupo C) y agua destilada (Grupo D).

	Grupo	Media±ES
Volumen (mL)	A	0,94±0,15*
	B	1,08±0,06
	C	1,22±0,10
	D	1,34±0,15
Concentración (M/mL)	A	1111±102
	B	984±82
	C	1098±93
	D	939±96
Móviles (%)	A	70,15±6,07**
	B	53,70±8,93*
	C	54,29±7,59*
	D	21,76±6,07
Progresivos (%)	A	55,06±5,72**
	B	42,98±8,11*
	C	41,37±6,57*
	D	15,40±4,85
Rápidos progresivos (%)	A	21,86±2,91*
	B	21,16±4,73*
	C	18,34±2,84*
	D	6,94±2,29
Medios progresivos (%)	A	33,20±3,65**
	B	21,82±3,70*
	C	23,02±3,65*
	D	8,46±2,68
No progresivos (%)	A	15,09±1,10**
	B	10,71±1,10
	C	12,92±1,66*
	D	6,35±1,51
Inmóviles (%)	A	29,85±6,07**
	B	46,31±8,93*
	C	45,71±7,59*
	D	78,25±6,07
Vivos (%)	A	73,75±4,64
	B	56,67±11,20
	C	66,20±1,99
	D	74,25±3,64

ES: error estándar; *: p < 0,05; **: p < 0,001. Las diferencias estadísticamente significativas (*) se refieren a la comparación de los grupos A,B,C con respecto al grupo D (control).

Por lo tanto, la exposición de machos a orina de hembra, fluido vaginal y fenoxietanol como fuentes de feromonas antes de la recogida de semen parece no aumentar el volumen, concentración o porcentaje de espermatozoides vivos, pero si la motilidad espermática. Posteriores estudios moleculares son necesarios para determinar la composición química de las sustancias contenidas en orina de hembra y fluido vaginal, y así determinar los

compuestos feromonales implicados en la reproducción de conejos macho. Asimismo, estudios que empleen el fenoxietanol como estimulante en granjas que tengan valores de calidad y volumen de eyaculado por debajo de lo óptimo, quizás arrojen luz sobre su posible aplicación práctica como feromona reproductiva en granjas de conejos.

En conclusión, nuestros resultados indican que la exposición a determinados compuestos que contienen feromonas podría aumentar la motilidad espermática en conejos. Estos datos respaldan la importancia de las feromonas en reproducción, en particular en conejos, y animan a realizar futuros estudios que busquen implementar el uso de feromonas en cunicultura para mejorar determinados parámetros reproductivos y productivos en conejos.

Agradecimientos

Esta publicación es parte del proyecto de I+D+i PID2021-127814OB-100, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/. Los autores agradecen a COGAL SA (Rodeiro, España) la disposición de las instalaciones y animales utilizados en este estudio, así como el apoyo técnico de sus operarios, necesario para el desarrollo del experimento.

Bibliografía

- Apps PJ, Weldon PJ, Kramer M. 2015. Chemical signals in terrestrial vertebrates: search for design features. Nat Prod Rep, 32(7): 1131-53.*
- Castellini C. 2008. Semen production and management of rabbit bucks. En: 9th World Rabbit Congress, Verona, Italia, pp. 265-278.*
- Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG. 2003. To fix or not to fix: the role of 2-phenoxyethanol in rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, chin gland secretion. J Chem Ecol 29(5): 1051-64.*
- Rodríguez De-Lara R, Noguez-Estrada J, Rangel-Santos R, García-Muñiz JG, et al., 2010. Controlled doe exposure as biostimulation of buck rabbits. Anim Reprod Sci 122: 270-275.*
- Villamayor PR, Gullón J, Yáñez U, Sánchez M, et al., 2022. Assessment of Biostimulation Methods Based on Chemical Communication in Female Doe Reproduction. Animals 12(3):308.*
- Wyatt TD. 2014. Pheromones & Anim Behav: Chemical Signals and Signatures. CUP 2nd edition.*

Efectos de la frecuencia de recogida y de la adición de alarelina a la dosis seminal en la calidad espermática. Estudio preliminar

Effects of collection frequency and addition of alarenine to the seminal dose on sperm quality. Preliminary study.

Yáñez U^{1*}, Villamayor PR^{2,3a}, Gullón J⁴, Pampín M³, Casanova A³, Zarhouti A⁵, Cavalcanti I¹, Peña AI¹, Quintela LA¹, Sánchez-Quintero P²

¹Dept. Patología Animal, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002, Lugo, España.

²Dept. Anatomía, Producción Animal y Ciencias Clínicas Veterinarias, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002, Lugo, España.

³Dept. Zooloxía, Genética y Antropología Física, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, 27002, Lugo, España.

⁴Cogal SA, 36530, Rodeiro, España.

⁵Laboratorio de Fisiopatología, Genética Molecular y Biotecnología, Universidad Hassan II de Casablanca, Casablanca, Marruecos
*uxia.yanez.ramil@usc.es

^aAmbos autores han contribuido por igual

Resumen

La inseminación artificial (IA) en cunicultura ha experimentado una gran evolución en las últimas décadas y se ha transformado en una práctica común en estas explotaciones. Debido a que la frecuencia de recogida es uno de los principales factores que afectan a la calidad del semen y, puesto que es necesario emplear un método de inducción de ovulación al realizar la IA, el objetivo de este estudio ha sido determinar si existen diferencias respecto a la vitalidad, formas y acrosomas anormales, y motilidad espermática de dosis seminales en función de la frecuencia de recogida y la adición o no de alarelina al diluyente. Se incluyeron 40 conejos macho de raza Hyplus PS39. Cada jueves, durante 10 semanas, se obtenían 4 muestras herospérmicas clasificadas según el diluyente (con o sin hormona) y la frecuencia de recogida (una o dos veces a la semana). Las muestras fueron evaluadas a las 0, 12, 24 y 30 h. Se evaluó la motilidad subjetiva, el porcentaje de espermatozoides vivos, de formas anormales y de espermatozoides con acrosomas anormales. Los datos se analizaron mediante un modelo lineal general de medidas repetidas. Se encontraron diferencias significativas en la motilidad espermática, porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de acrosomas anormales para la frecuencia de recogida. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados para el diluyente, ni tampoco interacciones significativas entre el diluyente y la frecuencia de recogida. En conclusión, la frecuencia de recogida influye en la calidad de la dosis seminal. Sin embargo, el empleo de la alarelina para inducir la ovulación en conejas, mediante su administración vía vaginal incluida en la dosis seminal, no tendría ningún efecto.

Palabras clave: conejo, extracción semen, ovulación, análogo GnRH, inseminación artificial.

Abstract

Artificial insemination (AI) in rabbits has evolved significantly over the last decades and has become a common practice in rabbit breeding. Since collection frequency is one of the main factors affecting semen quality, and since it is necessary to induce ovulation when performing AI, the aim of this study was to determine whether there are differences in vitality, abnormal acrosomes and shapes, and sperm motility of semen doses depending on collection frequency and addition of alarelin to the diluent. Forty male Hyplus PS39 rabbits were included. Every Thursday, for 10 weeks, 4 heterospermic samples were obtained, and classified according to the diluent (with or without hormone) and the frequency of collection (once or twice a week). Samples were assessed at 0, 12, 24, and 30 h. Subjective motility, percentage of live sperm, abnormal sperm, and sperm with abnormal acrosomes

were assessed. Data were analysed using a general linear repeated measures model. Significant differences were found in sperm motility, percentage of live sperm, and percentage of abnormal acrosomes for the frequency of collection. No statistically significant differences were found in any of the parameters analysed for the extender, nor were significant interactions between the extender and collection frequency. In conclusion, collection frequency influences the quality of the semen dose. However, the use of alarelin to induce ovulation in rabbits, by vaginal administration included in the seminal dose, would have no effect.

Keywords: rabbit, semen collection, ovulation, GnRH analogue, artificial insemination.

Introducción

La implantación de la inseminación artificial (IA) en cunicultura es relativamente reciente en comparación con otras especies como el ganado bovino, porcino u ovino. No obstante, no solo ha experimentado una gran evolución en las últimas décadas, sino que también se ha convertido en una práctica común en las explotaciones cunícolas (Quintela *et al.*, 2009). Una ventaja principal de esta técnica es que permite reducir el número de conejos empleados para cría. Por este motivo, no solo deben seleccionarse aquellos ejemplares con mejores características genéticas, sino que también es imprescindible un manejo adecuado de estos, puesto que la frecuencia de recogida es uno de los principales factores que afectan a la calidad del semen y al rendimiento reproductivo del macho. Hoy en día no hay lugar a duda de que la intensificación de los ritmos de recogida reduce el volumen y la concentración del semen. No obstante, existen diferentes opiniones sobre su efecto en las características de los espermatozoides (Nizza *et al.*, 2003).

Otro punto importante a tener en cuenta a la hora de realizar la IA en la coneja es que estas son hembras de ovulación inducida, es decir, es necesaria la monta para que se libere el ovocito (Boussit, 1989). Por este motivo, al emplear la IA, es necesario utilizar un método alternativo para inducir la ovulación.

Entre los procedimientos usados a lo largo del tiempo se encuentran el empleo de machos vasectomizados (Khalifa *et al.*, 2000), la inyección de sales de cobre (Kishk *et al.*, 2000), y la administración de hormonas, por vía intramuscular o intravaginal, entre las que se encuentran la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la GnRH o sus análogos sintéticos (Quintela *et al.*, 2004; Viudes de Castro *et al.*, 2007; Ondruska *et al.*, 2008; Quintela *et al.*, 2009; Gogol *et al.*, 2016). Entre todos ellos, la administración intravaginal en la dosis seminal de diferentes análogos de GnRH parece ser el método que mayores ventajas aporta, manteniendo una buena fertilidad y prolificidad. Algunas de esas ventajas son la reducción de tiempo a la hora de realizar la IA, menores riesgos sanitarios y minimización de errores en la administración. No obstante, es necesario incrementar la dosis administrada para conseguir el efecto deseado, lo que se traduce en un mayor coste económico.

En este sentido, en el año 2020, la Agencia Europea del Medicamento ha autorizado la comercialización de MRAbit® (Kubus Lab SA, Las Rozas de Madrid, España), un diluyente para semen de conejo con alarelina, un análogo de la GnRH. Se ha demostrado que esta molécula puede ser añadida al semen hasta 24h antes de la IA, obteniendo resultados en fertilidad y prolificidad iguales o incluso superiores que con el empleo de diluyente sin alarelina (Quintela *et al.*, 2009). Sin embargo, se desconoce el efecto que esta molécula tiene sobre los propios espermatozoides.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente descrito, el objetivo de este estudio ha sido determinar si existen diferencias en cuanto a la vitalidad, formas anormales y motilidad espermática de dosis seminales en función de la frecuencia de recogida y la dilución con y sin alarelina.

Material y métodos

Se incluyeron 40 conejos macho de raza Hyplus PS39 (Grimaud Frères, France), pertenecientes a la granja Co-gal SA (Rodeiro, España). Todos los procedimientos se llevaron a cabo en las propias instalaciones, con sistema de ventilación forzada, temperatura entre 18 – 21°C e intensidad lumínica de 70 lux. Los animales contaban con alimentación y agua a libre disposición y se mantuvieron bajo un programa de iluminación artificial con 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Los animales fueron asignados de manera aleatoria en 2 grupos según la frecuencia de recogida: grupo 1) 20 machos con una frecuencia de recogida de una vez a la semana (de acuerdo con las prácticas normales del centro) durante 10 semanas; grupo 2) 20 machos con una frecuencia de recogida de dos veces a la semana durante

10 semanas. En cuanto a los machos incluidos en el grupo dos, la recogida de semen se realizó también dos veces por semana durante las 3 semanas anteriores al inicio del estudio.

Las recogidas de semen se realizaron los jueves en el grupo 1 y los lunes y jueves en el grupo 2. Solo los eyaculados recogidos los jueves fueron usados en el estudio. Se evaluó el volumen y la motilidad en masa. Si el volumen era mayor de 0,2 mL y la motilidad en masa mayor de 3 (escala de 1 – 5), el eyaculado era dividido en dos partes con el mismo volumen y diluido en dos diluyentes comerciales: con hormona (MRA-bit®, Kubus Lab SA, Las Rozas de Madrid, España), que incluye el análogo de GnRH alarenila ([des Gly-10, D Ala6] LHRH ethylamide); y sin hormona (MRA®, Kubus Lab SA, Las Rozas de Madrid, España). A continuación, los eyaculados se combinaban para formar una muestra heterospérmica con una concentración final de 60 M/mL.

Cada jueves, se obtenían 4 muestras heterospérmicas, divididas de la siguiente manera: 1) MRA-bit-4: muestras de conejos con frecuencia de recogida de 2 veces por semana y diluida con hormona; 2) MRA-4: muestras de conejos con frecuencia de recogida de 2 veces por semana y diluida sin hormona; 3) MRA-bit-7: muestra de conejos con frecuencia de recogida de 1 vez por semana y diluida con hormona; 4) MRA-7: muestra de conejos con frecuencia de recogida de 1 vez por semana y diluida sin hormona. Las muestras heterospérmicas se almacenaron a 16°C durante su transporte al laboratorio para su análisis.

Las muestras fueron evaluadas a las 0 (inmediatamente después de su llegada al laboratorio, 2 – 3 h después de su recogida), 12, 24 y 30 h. Para evitar fluctuaciones de temperatura, las 4 alícuotas de las dosis heterospérmicas fueron divididas en 4 muestras (una por cada tiempo de evaluación) y empaquetadas en cajas de espuma de poliestireno de manera separada, de forma que cada caja sólo fuese abierta una vez, en el momento correspondiente de evaluación. Las muestras de semen se precalentaron en un baño termostático a 37°C durante 10 minutos. Se evaluó la motilidad subjetiva usando un microscopio (Eclipse E200, Nikon, Tokyo, Japan) provisto de una platina precalentada a 37°C y con un objetivo de contraste de fases negativo a x200 aumentos. Además, se realizó una tinción eosina nigrosina para evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de formas anormales y el porcentaje de espermatozoides con acrosomas anormales, mediante el recuento microscópico a x1250 aumentos con un objetivo de inmersión.

Para el análisis estadístico, se realizó un modelo lineal general (GLM) de medidas repetidas incluyendo como factores la frecuencia de recogida y el diluyente. Se incluyeron como variables la motilidad, el porcentaje de espermatozoides vivos, formas anormales y acrosomas anormales. Todos los análisis se realizaron en SPSS versión 28.0.1.1 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU.). Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Resultados y discusión

De los 40 conejos incluidos inicialmente en el estudio, 6 fueron eliminados por incidencias durante el experimento. La concentración espermática fue de 322 – 537 M/mL y 590 – 930 M/mL para las muestras recogidas dos o una vez por semana, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas en la motilidad espermática ($p < 0,001$), porcentaje de espermatozoides vivos ($p < 0,05$) y porcentaje de acrosomas anormales ($p < 0,05$) para la frecuencia de recogida y el tiempo, pero no en el porcentaje de formas anormales (**Tabla 1**). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados para el diluyente, ni tampoco interacciones significativas entre el diluyente y la frecuencia de recogida.

Tabla 1. Resultados obtenidos mediante GLM de medidas repetidas (media±DE) para la comparación de 34 muestras de semen de conejos de acuerdo a su frecuencia de recogida (una (1) o dos (2) veces a la semana)

Parámetros	Frecuencia recogida (d)	0 h	12 h	24 h	30 h
Motilidad (%)**	1	61,5±20,5	68,5±6,7	60,2±8,9	51,7±8,6
	2	47,9±23,4	56,7±9,2	50,2±8,3	42,5±7,0
Vivos (%)*	1	76,1±0,4	72,5±8,5	66,7±10,7	59,6±11,2
	2	66,3±11,9	64,3±11,6	58,9±11,9	51,2±12,3
Formas anormales (%)	1	29,6±6,1	26,7±5,0	27,2±6,5	27,3±5,1
	2	27,6±6,6	26,7±6,9	25,7±4,8	26,1±4,9
Acrosomas anormales (%)*	1	1,5±1,3	0,8±0,9	0,7±1,2	0,5±0,7
	2	0,85±0,9	1,0±1,3	0,6±0,7	0,8±1,2

d: días. h: horas. *: p<0,05. **: p<0,001. Las diferencias estadísticamente significativas se refieren a la frecuencia de recogida.

Nuestros resultados indican que la frecuencia de recogida influye significativamente en la calidad del semen, de manera que, a mayor frecuencia, disminuye la motilidad y la vitalidad de los espermatozoides y aumenta el porcentaje de acrosomas anormales. Estos datos contrastan con los reportados por Nizaa *et al.* (2003), quienes no observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de espermatozoides móviles y vivos entre frecuencias de recogida de una o dos veces por semana.

Por otra parte, no se han encontrado diferencias en cuanto al diluyente, por lo que la adición de alarelina a la dosis seminal no parece tener ningún efecto sobre la calidad espermática. Resultados similares han sido documentados previamente (Quintela *et al.*, 2004) con buserelina, donde se observó que la adición de este análogo tampoco tenía efectos perjudiciales sobre la motilidad subjetiva y la vitalidad.

En conclusión, la frecuencia de recogida influye en la calidad de la dosis seminal. Sin embargo, el empleo de la alarelina para inducir la ovulación en conejas, mediante su administración vía vaginal incluida en la dosis seminal, no tendría ningún efecto. No obstante, serían interesante investigar de manera más profunda los efectos de estos dos factores.

Agradecimientos

Los autores agradecen a COGAL SA (Rodeiro, España) la disposición de las instalaciones y animales utilizados en este estudio, así como el apoyo de sus operarios, necesario para el desarrollo del experimento.

Bibliografía

- Boussit D. 1989. *Reproduction et insemination artificielle en cuniculture*. Association Française de Cuniculture, Lempdes, Francia.
- Gogol P. 2016. *Effect of goserelin and leuprolide added to the semen on reproductive performance in rabbits - Short communication*. *Acta Vet Hung*: 64: 116-9.
- Khalifa RM, El-Alamy MA, Beshir MA. 2000. *Vasectomized buck gave better reproductive results in artificial insemination techniques in rabbits than GnRH or HCG*. En: *7th World Rabbit Congress*. Valencia. España. A: 147-153.
- Kishk W, Awad M, Ayoub M. 2000. *Non-hormonal substances for the induction of ovulation in rabbit does*. En: *7th World Rabbit Congress*. Valencia. España. A: 155-160
- Nizza A, Di Meo C, Taranto S. 2003. *Effect of collection rhythms and season on rabbit semen production*. *Reprod Dom Anim*: 38: 436 -439.
- Ondruska L, Parkanyi V, Rafay J, Chlebec I. 2008. *Effect of LHRH analogue included in seminal dose on kindling rate and prolificacy of rabbits artificially inseminated*. En: *9th World Rabbit Congress*. Verona. Italy. A: 423-426.

Quintela LA, Peña AI, Vega M^aD, Gullón J, Prieto M^aC, Barrio M, Becerra JJ, Maseda F, Herradón PG. 2004. Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose. *Reprod Nutr Dev*: 44: 79-88.

Quintela LA Peña AI, Vega MD, Gullón J, Prieto C, Barrio M, Becerra JJ, Herradón PG. 2009. Reproductive Performance of Rabbit Does Artificially Inseminated via Intravaginal Administration of [des-Gly 10, D-Ala6]-LHRH Ethylamide as Ovulation Inductor. *Reprod Dom Anim*: 44: 829 -833.

Viudes-de-Castro MP, Lavara R, Marco-Jimenez F, Cortell C, Vicente JS. 2007. Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit. *Theriogenology*: 68: 1031-1036.

Crecimiento de hembras cruzadas y su efecto sobre la reproducción

Growth of crossbred females and its effect on reproduction

Domingues V^{1,2*}, Sánchez C³, Arias JM^{1,2}, Pascual JJ⁴

¹El Adil- Núcleo de Mejora Genética, 24270 León, España.

²Centro de Inseminación Zapiños, 15318 A Coruña, España.

³Cunícola Redondas SL., 15318. A Coruña, España.

⁴Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València, 46022, Valencia, España.

*vania@eladil.es

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de crecimiento de las hembras cruzadas, descendientes de abuelo LP con abuela V de la estirpe valenciana, en función de la época del año en que nacen, y cómo el peso al nacimiento o el crecimiento durante la lactancia afectan a la curva de crecimiento y al número de nacidos en el primer parto. Un total de 692 conejas cruzadas fueron controladas hasta sus 226 días de vida. Verificamos que las conejas que nacen en la época del año cálida pesan significativamente más cuando llegan a edad adulta que las que nacen en época fría (4,660 y 4,463 kg, respectivamente; $P < 0,05$). Esta diferencia puede deberse más a la época en que se desarrolla su crecimiento cuando nacen en la época cálida. Se observó que las hembras cruzadas que nacieron en una camada de mayor tamaño y con mayor peso al destete llegan a un peso adulto significativamente antes. En cuanto al tamaño de camada del primer parto de una hembra cruzada, se observó con significancia que cuanto mayor es el tamaño de camada al nacimiento de dicha hembra, menor es el tamaño de camada en su primer parto. Por cada gazapo más que haya nacido en la camada de la futura reproductora, esta tendrá 0,103 gazapos menos en su primer parto ($P < 0,05$). Sin embargo, observamos que, con valores cercanos a la significancia, cuanto más pesa la coneja a su nacimiento mayor es el tamaño de camada en su primer parto (por cada 22 g más al nacimiento medio gazapo más en su primera camada; $P = 0,06$).

Palabras clave: estirpe valenciana, hembra cruzada, curva de crecimiento, tamaño de camada.

Abstract

The objective of this work was to determine the growth pattern of the crossbred females, descendant of grandfather LP with grandmother V of the Valencian lineage, depending on the season in which they are born, and how their own birth weight or lactating growth affect to the growth curve and the litter size in their first parturition. A total of 692 crossbred rabbits were controlled until their 226 days of life. We verified that rabbit does born in the warm season weigh significantly more when they reach adulthood than those born in the cold season (4.660 and 4.463 kg, respectively; $P < 0.05$). This difference may be due more to the session when they were reared when they were born in the warm season. It was observed that crossbred females that were born in a larger litter and with a higher weaning weight reached an adult weight significantly earlier. Regarding the litter size of crossbred females at the first parturition, it was significantly observed that the larger the litter size at the female birth, the smaller the litter size at their first parturition (-0.103 kits at their first parturition per each kit more in the litter when the female was born). However, with values close to significance, the more the rabbit doe weighs at birth, the greater the litter size at its first parturition (for every 22 g more at birth, half a kit more in its first parturition; $P = 0.06$).

Keywords: valencian lineage, crossbred female, growth curve, litter size.

Introducción

La fase de maternidad es un pilar fundamental ya que su éxito marca los resultados técnico-económicos de una granja cunícola (Tavares, 2013). El éxito reproductivo está definido por el potencial genético heredado y también, no menos importante, por los efectos ambientales y maternos que las hembras encuentran durante

su desarrollo. Gran parte del potencial reproductivo de una hembra es definido durante su desarrollo uterino, mientras son lactantes y durante las etapas de crecimiento y recría. De este modo, es esencial un adecuado manejo de los futuros reproductores durante los momentos cruciales de la vida temprana (Martínez-Paredes et al., 2016). La condición corporal de una hembra se debe tener muy en cuenta a la hora de iniciar su vida reproductiva y en cada ciclo. Diferentes variables afectan la buena condición corporal de una hembra reproductora: el alojamiento, la alimentación, la edad o número de partos, el ritmo reproductivo, la salud, la edad al destete y el bienestar (Rosell, 2008).

Las líneas de genética valenciana utilizadas para realizar el presente estudio (V y LP) son animales seleccionados por diferentes criterios que pueden afectar a sus patrones de crecimiento. La Línea V ha sido seleccionada por tamaño de camada al destete y es muy conocida por su productividad numérica. La Línea LP fue originada a partir de hembras que en diversas granjas superaron los 30 partos teniendo una productividad media mínima de 7 destetados. Es una línea que se caracteriza por una mayor robustez y esperanza de vida. Así, el objetivo de este estudio fue determinar el perfil de crecimiento de las hembras cruzadas, descendientes de abuelo LP con abuela V, en función de la época del año en que nacen, y cómo el peso al nacimiento o el crecimiento durante la lactancia afectan a la curva de crecimiento y al número de nacidos en el primer parto.

Material y métodos

El estudio se realizó en una granja cunícola, localizada en Abegondo, A Coruña. Es una granja con conejas reproductoras de estirpe Valenciana, con núcleo de abuelas de línea V, para producción de su propia reposición. Estas abuelas son inseminadas con dosis de abuelo LP, adquiridas al Centro de Inseminación- Zapiños. Fueron analizados los datos de pesajes de 692 futuras hembras, resultantes de 395 partos de abuelas de la Línea Verde, de la estirpe Valenciana, durante 8 ciclos consecutivos. Se identificaron y pesaron dos hembras cruzadas de cada parto y de cada abuela de Línea V, cada 15 días, con una balanza digital (Spider SW, Mettler-Toledo GmbH, Albstadt, Alemania) durante sus primeros 226 días de vida.

Esta granja insemina a los 18 días post parto y el destete se realiza a los 40 días de vida. Hasta los 20 días de vida, aproximadamente, los gazapos son exclusivamente lactantes, alimentándose después de esta edad y hasta el destete también del pienso de la madre. En el momento del destete cambian de nave, donde son colocados en grupos con alimentación *ad libitum*, con un pienso de cebo (PB 15,0% y FB 18,5%). A los 65 días son cambiados a la nave de reposición, aún en grupo hasta los 3 meses, edad en la que son individualizadas y empiezan a ser racionadas. A 7 días de la primera inseminación vuelven a una alimentación *ad libitum* hasta 7 días después de esta, con pienso de cebo, volviendo después a ser racionadas. Una semana antes del parto, las hembras con palpación positiva cambian para una nave de jaulas con nido, alimentadas *ad libitum* con un pienso de madres (PB 17,3% y FB 15,0%). Las hembras con palpación negativa vuelven a ser racionadas hasta 7 días antes de la inseminación.

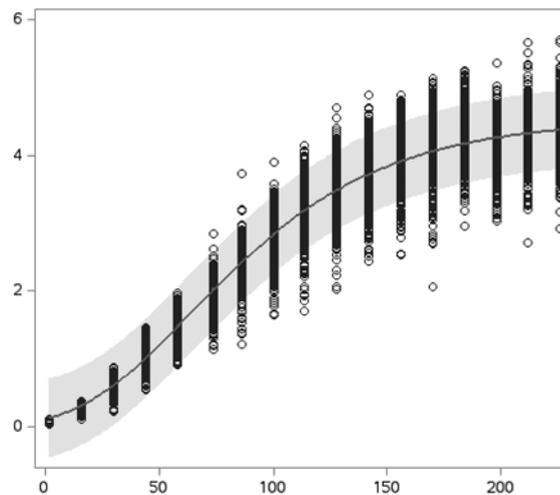
A partir de los 17 datos de peso de cada coneja, se realizó una modelización de su patrón de crecimiento mediante ajuste a la función de Gompertz), para estimar los coeficientes A, B y C mediante el procedimiento NLIN de SAS (2015). El efecto de la época del año, tamaño de camada y peso al nacimiento y del peso al destete de la coneja sobre las estimas de dichos coeficientes (ponderado en función de su error de estimación), y de todos ellos sobre el tamaño de camada al primer parto, fue evaluado con un procedimiento GLM de SAS.

Resultados y discusión

En la **Figura 1** vemos la evolución del peso de todas las conejas. Se puede observar que a medida que las hembras van creciendo las diferencias en peso vivo van siendo cada vez más notorias, posiblemente debido a factores genéticos, pero también a varios de los factores ambientales controlados en este estudio, como la temperatura, el tamaño de camada y su peso en el momento del nacimiento y al destete. El peso estimado en edad adulta de una coneja V\LP fue de $4,517 \pm 0,011$ kg.

Figura 1. Curva de crecimiento de la coneja cruzada VxLP en granja comercial, ajustada a la función de crecimiento de Gompertz mediante un procedimiento no lineal de SAS:

$$\text{Peso (kg)} = 4,517e^{-3,771 e^{-0,021 \text{ día}}} \quad R^2 = 0,99 (P < 0,0001).$$



Estos posibles efectos ambientales se muestran en la **Tabla 1**. Observamos que las conejas que nacen en la época del año cálida presentarían un mayor peso adulto (valor A) que las nacidas en época fría (+197 g; $P < 0,001$). Esta diferencia puede deberse más a la época en que se desarrolla su crecimiento cuando nacen en la época cálida. Las hembras nacidas en periodo frío suelen tener la cría en periodos cálidos, que reduce la ingestión y suele reducir el desarrollo de los animales.

También se observó que cuanto mayor era el peso al nacimiento, y sobre todo al destete, mayor era el peso adulto alcanzado (+91 g más por cada 100 g más de peso al destete; $P < 0,001$), indicando la importancia de un buen desarrollo temprano para alcanzar un mayor peso adulto, ya que las diferencias ya se definen casi al inicio. Por otra parte, la precocidad del desarrollo (valor B) fue mayor, como era de esperar, cuanto mayor fue el peso al destete (desarrollo temprano), pero también cuanto mayor fue el tamaño de camada al nacimiento. Diversos estudios concluyen que un mayor tamaño de camada lleva a animales con menos peso al nacimiento y al destete (Argente *et al.*, 1999, 2008; Drummond *et al.*, 2000; Poigner *et al.*, 2000), porque tienen que repartir la leche entre más gazapos. Sin embargo, el análisis conjunto, teniendo en cuenta todos los factores de forma independiente, muestra que una coneja que pese lo mismo al nacimiento y destete, y nazca en una misma época, cuanto mayor es su tamaño de camada, mayor será su precocidad. Este factor podría deberse a que nazcan en camadas más sanas o con madres que las cuiden mejor.

Tabla 1. Efecto de la temperatura ambiental de la granja al nacimiento, tamaño de camada y peso al nacimiento y peso al destete de la coneja sobre los parámetros de la función de crecimiento de Gompertz

	Parámetros de la curva		
	A (asíntota)	B (precocidad)	C (tasa crecimiento)
Temperatura ambiental:			
Cálida	4,660 ^b	3,903	0,0211
Fría	4,463 ^a	3,894	0,0215
ES	0,027	0,034	0,0002
P-valor	0,0001	0,8516	0,3325
Tamaño camada al nacimiento:			
Efecto lineal	+0,017	-0,024	-0,0001
SE	0,009	0,011	0,0001
P-valor	0,0548	0,0279	0,0697
Peso al nacimiento:			
Efecto lineal	+4,296	-0,571	-0,0082
SE	2,311	2,890	0,0184
P-valor	0,0638	0,8434	0,6569
Peso al destete:			
Efecto lineal	+0,913	-2,437	0,0009
SE	0,251	0,314	0,0020
P-valor	0,0003	0,0001	0,6534

Por otra parte, la **Tabla 2** muestra el efecto del tamaño de camada, el peso al nacimiento y al destete, y los parámetros de desarrollo de las conejas cruzadas sobre el tamaño de camada que tuvieron en su primer parto. Se observó de forma significativa que el tamaño de camada al nacimiento afecta el tamaño de camada en su primer parto. Cuanto mayor es el tamaño de camada al nacimiento menor es el tamaño de camada en su primer parto. Por cada gazapo más que haya nacido en la camada de la futura reproductora, esta tendrá 0,103 gazapos menos en su primer parto. Un adecuado desarrollo fetal es clave para definir el futuro reproductor de los animales. Las conejas que nacen en camadas menos numerosas pueden haber sufrido una menor desnutrición fetal, por menor competencia por el espacio uterino, más número de vasos sanguíneos y menor competencia posterior por la leche materna con sus hermanos, afectando positivamente a su futura productividad. Por otra parte, también observamos que, con valores cercanos a la significancia, cuanto mayor es el peso de la coneja al nacimiento mayor es el tamaño de camada de su primer parto (aproximadamente 0,5 gazapos más por cada 22 g más de peso al nacimiento; $P=0,06$). Durante la fase de gestación y al inicio del periodo de lactación es cuando gran parte del potencial reproductivo se define (Martínez-Paredes, 2016). De hecho, varios trabajos ya han mostrado que una adecuada nutrición durante las primeras fases del desarrollo (gestación, lactación, engorde y recría) son fundamentales para optimizar la reproducción de las futuras reproductoras (Martínez-Paredes, 2018).

Tabla 2. Efecto del tamaño de la camada al nacimiento, el peso al nacimiento y destete y los parámetros de la función de crecimiento de la coneja sobre el tamaño de camada obtenido en el primer parto.

	Tamaño de camada al primer parto	
	Media \pm error estándar	P-valor
Tamaño de camada al nacimiento	-0,103 \pm 0,047	0,0307
Peso al nacimiento (kg)	+23,02 \pm 12,40	0,0642
Peso al destete (kg)	+0,298 \pm 1,665	0,8582
Parámetros función Gompertz:		
A	-0,115 \pm 0,391	0,7687
B	+0,187 \pm 0,419	0,6551
C	+115,35 \pm 79,09	0,1455

En conclusión, la época del año afecta la curva de crecimiento de una futura reproductora, alcanzando un menor peso adulto las conejas cuando se cria en una fase más cálida. El tamaño de la camada en la que nace una reproductora no es obstáculo para que esta pueda tener más peso en la edad adulta si su madre está en buenas condiciones. Sin embargo, puede afectar a su prolificidad durante el inicio de su actividad reproductiva. Este trabajo también pone de manifiesto la importancia del buen manejo de las abuelas, para luego tener buenas futuras reproductoras. Se recomienda que tengan buena salud, ya que la transferencia inmunitaria ya empieza en el útero, eliminar los gazapos de menor tamaño ya que podrían ser peores reproductoras, y no dejarles camadas numerosas para no perjudicar su desarrollo durante la lactación. Gracias a los continuos trabajos de investigación llevados a cabo por centros de reproducción hay un mayor conocimiento de las medidas a tomar para obtener buenos animales, y así distribuir reproductoras de calidad a las granjas, para que puedan obtener la mayor rentabilidad posible.

Bibliografía

- Argente M, Santacreu MA, Climent A, Blasco A. 1999. Phenotypic and genetic parameters of birth weight and weaning weight of rabbits born from unilateral ovariectomized and intact does. *Livestock Production Science* 57:159-167.
- Argente M, Santacreu MA, Climent A, Blasco A. 2008. Effects of intrauterine crowding on available uterine space per fetus in rabbits. *Livestock Production Science* 114:211-219.
- Drummond H, Vazquez E, Sanchez-Colon S. 2000. Competition of milk in the domestic rabbits: Survivors benefit from litter-mate deaths. *Ethology* 106: 511-526.
- Martínez-Paredes E, Saviotto D, Santacreu MA, Cervera C, Pascual JJ. 2016. La preparación de los futuros reproductores en cunicultura. En: *XLI Symposium de Cunicultura*. Hondarribia, España, pp. 28-45.
- Martínez-Paredes E, Ródenas L, Pascual JJ, Saviotto D. 2018. Early development and reproductive lifespan of rabbit females: implications of growth rate, rearing diet and body condition at first mating. *Animal* 12: 2347-2355.
- Poigner J, Szendrő Zs, Lévai A, Biró-Németh E. 2000. Weight of new-born rabbits in relation to their number and position within the uterus in unilaterally ovariectomized does. En: *7th World Rabbit Congress*. Valencia, España. pp 231-237.
- Rosell JM, De la Fuente LF. 2008. Health and body condition of rabbit does on commercial farms. En: *9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, pp 1065-1069.
- SAS. 2015. *SAS/STAT 9.3 User's Guide*. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Tavares T. 2013. Maternidade- O pilar da produção. En: *V Jornadas ASPOC*, Ponte de Lima, Portugal, pp15-21.



PATOLOGÍA

Distribución actual de los principales clones de *Staphylococcus aureus* en cunicultura en España

Martínez-Seijas C, Mascarós P, Díaz-Méndez JF, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM

Estudio genotípico y fenotípico de la sensibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* en conejos

Mascarós P, Martínez-Seijas C, Díaz-Méndez JF, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM

Análisis de comparativa genómica de clones de *Staphylococcus aureus* en cunicultura: CC121 versus CC96

Díaz-Méndez JF, Martínez-Seijas C, Mascarós P, Arnau A, Selva L, Viana D, Corpa JM

Desarrollo de un ELISA indirecto basado en proteínas virales recombinantes para la detección de anticuerpos frente al virus mixoma.

Calonge-Sanz I, Menéndez A, Álvarez AL, Alonso JM, Dalton KP, Parra F

Estudio de factores de virulencia de *Escherichia coli* asociados a procesos digestivos en cunicultura

Sanz C, Arnal JL, Chacón G, Fernández AB

Diagnóstico ante-mortem y no invasivo de RHDV en conejos asintomáticos mediante el uso de qPCR y FTA cards

Sánchez A, Aluart A, Gascón S, Mora FX, Valls L

Distribución actual de los principales clones de *Staphylococcus aureus* en cunicultura en España

Current distribution of the main clones of S. aureus in commercial rabbitries in Spain

Martínez-Seijas C*, Mascarós P, Díaz-Méndez JF, 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 n° 2, 46115 Alfara del Patriarca, Valencia, Spain.

*carmen.martinezseijas@uchceu.es

Resumen

En el ámbito de la cunicultura comercial *Staphylococcus aureus* es una bacteria con notable interés sanitario debido a que afecta a conejos de todas las edades y produce diferentes tipos de lesiones. El grupo de Patología y Sanidad Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera está desarrollando un proyecto que tiene como principal objetivo identificar los nuevos clones de *S. aureus* involucrados en brotes de estafilococias y definir sus elementos genéticos que potencialmente les permiten aumentar su virulencia. Por el momento se han muestreado 316 granjas en España y se han obtenido 878 muestras, de las cuales el 74,4% han resultado positivas para *S. aureus*. Se han encontrado 93 genotipos diferentes de *S. aureus*, de los cuales 75 no habían sido aislados previamente. Esto podría reforzar la hipótesis de que las cepas de *S. aureus* están cambiando y ciertos genotipos dejan de estar presentes en las granjas mientras que otros comienzan a asentarse. Sin embargo, a nivel de complejo clonal, un 76% de ellos se engloban en el CC121 y el CC96, que son los linajes tradicionalmente descritos en cunicultura en España.

Palabras clave: *S. aureus*, complejo clonal, epidemiología, distribución, conejos.

Abstract

In commercial rabbit farming *Staphylococcus aureus* is a health challenge due to the wide range of pathologies it produces in rabbits of all ages. For this reason, the Animal Pathology and Health group of the CEU Cardenal Herrera University has started a project whose main objective is to identify the new *S. aureus* clones responsible for the current outbreaks and to define the genetic elements that have potentially allowed them to increase their virulence. So far, 316 farms in Spain have been sampled and 878 samples have been obtained, of which 74.4% were positive for *S. aureus*. Ninety-three different *S. aureus* genotypes have been found in the samples, of which 75 had not been previously isolated. This could reinforce the hypothesis that strains are changing and certain genotypes are no longer present on farms while others are beginning to settle. However, at the clonal complex level, 76% of them belong to CC121 and CC96, which are the lineages traditionally described in rabbit breeding in Spain.

Keywords: *S. aureus*, clonal complex, epidemiology, distribution, rabbits.

Introducción

Staphylococcus aureus es un patógeno comensal y oportunista que coloniza la piel y las mucosas humanas y animales (Haag et al., 2019). Las presentaciones clínicas incluyen un amplio panel de infecciones que van desde enfermedades dérmicas a infecciones profundas y septicemia (Peton et al., 2014). En el ámbito de la cunicultura comercial es especialmente relevante dado que afecta a todos los estratos de producción dando lugar, principalmente a mastitis y pododermatitis en hembras reproductoras y piodermas en gazapos (Corpa et al., 2009).

El éxito de *S. aureus* como patógeno se debe a su excepcional plasticidad genética, que le permite adquirir nuevos mecanismos de resistencia y virulencia (Chambers y DeLeo, 2009). El extendido uso de la secuenciación

del genoma ha permitido dilucidar la organización genética de *S. aureus*, que se clasifica en secuencias tipo (ST) que a su vez se agrupan en complejos clonales (CC). Algunos de ellos están asociados a un hospedador muy específico, mientras que otros tienen un rango más amplio y son capaces de saltar entre especies (Mrochen et al., 2020).

Durante los últimos 5 años se ha registrado un aumento en el número y gravedad de los casos de estafilococias en cunicultura. Veterinarios y ganaderos han alertado sobre la virulencia de estas cepas, que no responden a los tratamientos antibióticos tradicionales y persisten en las granjas, amenazando su viabilidad económica. Por lo tanto, se plantea la necesidad de abordar este problema, que podría estar relacionado con la aparición de nuevas cepas de *S. aureus* en las granjas de conejos o con la evolución de cepas ya presentes en las explotaciones. Dicha evolución podría darse a través del desarrollo de nuevos mecanismos de virulencia y resistencia a los antibióticos por parte del microorganismo. Previamente, ya hemos observado un cambio en la tendencia del diagnóstico de las cepas clásicas más frecuentes y hemos identificado nuevas cepas de *S. aureus* que, en algunos casos, son resistentes a múltiples tipos de antibióticos (Pérez-Fuentes et al., 2017; Moreno-Grúa et al., 2018).

Se ha iniciado un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-117897RB-I00) con el propósito de profundizar en el estudio de las estafilococias en granja y entender cómo han evolucionado desde las cepas tradicionales hasta la actualidad. En este trabajo se expondrán los hallazgos acerca de uno de los pilares fundamentales del proyecto que trata sobre la detección y distribución de las cepas en las granjas de España.

Material y métodos

Muestreo: en colaboración con veterinarios y ganaderos de diferentes explotaciones, se muestrearon 50 granjas en cada comunidad autónoma, siempre que fue posible. En cada granja, se tomaron dos muestras de animales que presentaban lesiones compatibles con una infección por *S. aureus* (*pododermatitis*, *mastitis*, *abscesos*, etc.) mediante una torunda estéril.

Identificación: las muestras se inocularon en agar sangre con ácido colistínico-nalidíxico (CNA) y se incubaron a 37°C durante 24h. Las colonias que cumplían los criterios de compatibilidad con *S. aureus* en referencia a su morfología y características hemolíticas en CNA se incubaron en CHROMagar™ *Staph aureus* y CHROMagar™ Orientation para un segundo testaje. La confirmación definitiva se llevó a cabo mediante la amplificación del gen coagulasa (*coa*).

Caracterización de cepas: en primer lugar, se analizaron las regiones polimórficas de tres genes (*coa*, *spa* y *clfB*) que generaron un genotipo para cada cepa (Viana et al., 2007). Esta metodología nos permitió discriminar de manera ágil y rápida las cepas presentes en las granjas. Tras este tipado inicial, las cepas de interés se sometieron a la tipificación multilocus de secuencias (MLST). Para realizar una selección preliminar de las cepas y obtener una imagen inicial sobre su distribución se tuvieron en cuenta diversos criterios: (1) genotipos no caracterizados previamente en conejos, (2) cepas con mismo genotipo para poder analizar características comunes y diferenciadoras a otros tipos de MLST; (3) un genotipo diferente por comunidad autónoma.

Tipado MLST: se obtuvo la secuencia de los 7 genes conservados del esquema de tipificación de secuencias multilocus (MLST) para *S. aureus*, tanto mediante la secuenciación Sanger de cada gen individual como la secuenciación del genoma completo. Cada secuencia se identificó con un alelo y la combinación de los 7 alelos se identificó con una secuencia tipo (ST). Las STs se agruparon en complejos clonales cuando compartían los alelos de 4 de los genes; en caso contrario, no se agruparon y se denominaron "singletons".

Resultados y discusión

Durante los 2 años del proyecto han sido muestreadas 316 granjas de las 433 granjas totales a muestrear (73%). Se han tomado muestras de granjas con diversos casos clínicos de estafilococias, que van desde problemas graves y agudos hasta cuadros crónicos, obteniéndose un total de 878 muestras. El 74,4% (654/878) han resultado positivas a *S. aureus*, confirmando las sospechas de los veterinarios. Los animales muestreados han sido mayoritariamente reproductoras (54%), aunque también se han incluido gazapos (13,5%), machos reproductores (2%) y engorde (4,1%). Entre las reproductoras, las principales lesiones donde se ha aislado *S. aureus* son las mastitis (60,9%) y las pododermatitis (17,6%). En cuanto a los gazapos, las lesiones predominantes han sido los abscesos cutáneos (23,9%), las neumonías (20,5%) y las dermatitis (15,9%). En engorde, se han observado una variedad de

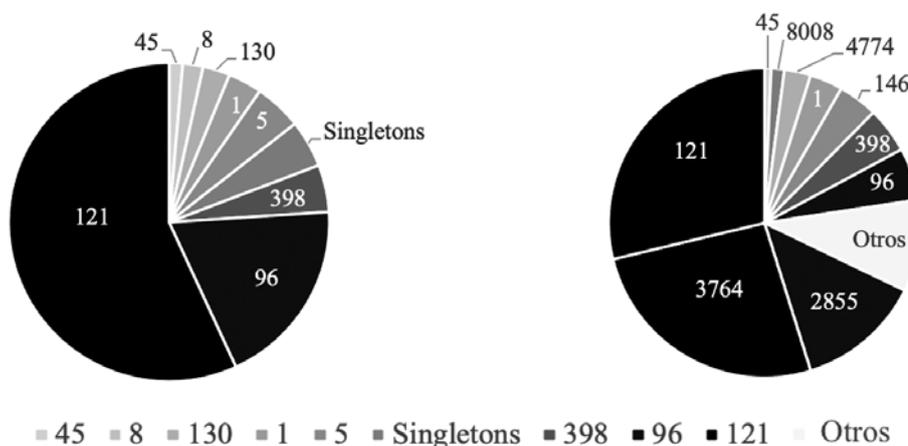
cuadros clínicos, pero el 48% de las muestras procedieron de problemas respiratorios. En machos reproductores, el 53,8% de las muestras obtenidas correspondieron a pododermatitis, mientras que las restantes procedieron de abscesos o dermatitis.

En cuanto a la caracterización genética basada en los genes *coa*, *spa* y *clfB* hemos encontrado 93 genotipos diferentes, presentes en diferentes proporciones. Concretamente, el A1 II1 η ha sido el más aislado con un 21,9% de aislamientos en las muestras positivas. Con un 9% de aislamientos positivos encontramos los genotipos A1 II1 σ , A1 II1 λ y A1 II1 δ . En menor porcentaje se encuentran el resto de genotipos: solo 15 de ellos se encontraron en valores entre el 1-4%, mientras que los 76 restantes se hallaron en porcentajes inferiores al 1%. Estos datos reflejan gran diversidad genética entre los aislados de *S. aureus* en las granjas y que es consecuencia del alto dinamismo y variabilidad del propio microorganismo. Durante anteriores proyectos, este grupo llevó a cabo diversos estudios en granjas cunícolas y atesoró una gran colección de cepas y genotipos diferentes. Al comparar los genotipos previamente aislados (108) con los de este proyecto (93), hemos observado una sorprendente discordancia: solo 18 genotipos estaban compartidos entre ambas colecciones. Esto reforzaría la idea de que las cepas están cambiando y que hay ciertos genotipos que dejan de estar presentes en las granjas mientras que otros comienzan a asentarse. No es la primera vez que se observan cambios en las cepas circulantes. En 2007, se describía el genotipo A1 II1 δ como el principal responsable del 70% de las lesiones en conejos, con un reducido número de genotipos causantes de las estafilocias en conejos (Viana et al., 2007). Sin embargo, diez años más tarde, la prevalencia del genotipo A1 II1 δ se había reducido hasta representar un 18,5% de los aislados (Pérez-Fuentes et al., 2017) y actualmente, se encuentra únicamente en un 9%.

Este genotipado permite una discriminación rápida de las cepas que nos ayudó en la selección para su posterior análisis mediante el tipado MLST. Teniendo en cuenta los criterios mencionados anteriormente, se obtuvo la ST de 146 que presentaban 53 de los 93 genotipos diferentes. El 56,9% de las cepas pertenecieron al CC121, un 19,2% al CC96 y un 4,8% al CC5 y CC398, respectivamente. De manera minoritaria se encontraron cepas pertenecientes a los CC1, CC8, CC45 y CC130, además de varios "singletons" (Figura 1A). Diversos autores coinciden en que el CC121 y, en menor medida, el CC96 son los linajes predominantes en cunicultura (Vancaeynest et al., 2006; Penadés et al., 2020). Nuestros resultados respaldan dicha afirmación: el 76,1% de los aislados pertenecieron al CC121 y al CC96.

A nivel de ST, destacaron el ST121 (28,8%) y el ST3764 (26,02%), ambos pertenecientes al CC121. Respecto al CC96, se encontraron dos STs: ST2855 (13%) y ST96 (5,8%) (Figura 1B). En el resto de complejos clonales, solo se halló un ST. El estudio de Pérez-Fuentes et al. (2017) también describen el ST121, ST3764, ST2855 y ST96 como las cuatro STs principales en cunicultura. Sin embargo, en dicho trabajo la frecuencia de aparición del ST121 es el doble al ST3764, mientras que en nuestra investigación sus valores son similares. Esto podría deberse a diferencias metodológicas o a una evolución de las cepas.

Figura 1. Resultados del tipado MLST. A) Proporción de los complejos clonales (CC) en las explotaciones cunícolas españolas. B) Proporción de STs en las explotaciones cunícolas españolas.



De acuerdo con los hallazgos preliminares del proyecto, los complejos clonales 121 y 96, siguen siendo los más prevalentes en la actualidad. No obstante, se ha constatado que las cepas relacionadas con estos linajes están experimentando cambios notables, lo que está afectando el equilibrio entre los diferentes genotipos e impulsando la emergencia de nuevas variantes. Para comprender cómo la dinámica de las cepas está contribuyendo al aumento de casos de estafilococias en las explotaciones cunícolas es crucial llevar a cabo el tipado MLST de los 40 genotipos restantes y posteriormente, realizar un estudio exhaustivo de los genomas de las cepas. Este análisis tendrá como objetivo comprender cómo están evolucionando las cepas y cómo se están adaptando a los diferentes entornos a los que se enfrentan. Con esta información, se pretende desarrollar estrategias de control y prevención más efectivas para mitigar el impacto de las estafilococias en las explotaciones cunícolas.

Agradecimientos

Este proyecto está financiado por la Universidad CEU Cardenal Herrera (INDI22/11) y el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-117897RB-I00). Los contratos predoctorales de Carmen Martínez Seijas, Patricia Mascarós Núñez y José Francisco Díaz Méndez están financiados por la Universidad CEU Cardenal Herrera. Asimismo, nos gustaría expresar gratitud a los ganaderos y veterinarios que están colaborando activamente en la toma de muestras y proporcionando información sobre los casos, ya que su ayuda es fundamental el desarrollo del proyecto. En particular, nos gustaría destacar la colaboración del laboratorio Exopol S.L., que ha compartido generosamente parte de sus cepas con nosotros.

Bibliografía

- Chambers HF, DeLeo FR. 2009. "Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era." *Nat Rev Microbiol* 7 (9): 629-41.
- Corpa JM, Hermans K, Haesebrouck F. 2009. "Main pathologies associated with *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review." *World Rabbit Sci.* 17(3): 115 - 125.
- Haag AF, Fitzgerald JR, Penadés JR. 2019. "Staphylococcus aureus in Animals." *Microbiol Spectr* 7 (3): GPP3-2019.
- 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.
- Mrochen DM, Liliane M, Oliveira F, Raafat D, Holtfreter S. 2020. "Staphylococcus aureus Host Tropism and Its Implications for Murine Infection Models." *Int J Mol Sci* 21 (19): 1-35.
- Penadés M, Viana D, García-Quirós A, Muñoz-Silvestre A, Moreno-Grúa 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, Spain.
- Peton V, Le Loir Y. 2014. "Staphylococcus aureus in Veterinary Medicine." *Infect Genet Evol* 21: 602-15.
- Vancaeynest D, Haesebrouck F, Deplano A, Denis O, Godard C, Wildemauwe C, Hermans K. 2006. "International Dissemination of a High Virulence Rabbit *Staphylococcus aureus* Clone." *J Vet Med* B53 (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): 288-98.

Estudio genotípico y fenotípico de la sensibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* en conejos

Genotypic and phenotypic study on the antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus in rabbits

Mascarós P*, Martínez-Seijas C, Díaz-Mendez JF, 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 n° 2, 46115 Alfara del Patriarca, Valencia, Spain.

*patricia.mascarosnunez@uchceu.es

Resumen

Staphylococcus aureus es una bacteria que puede desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, lo que la convierte en un importante problema de salud pública. Se seleccionó una amplia batería de fármacos antimicrobianos para realizar estudios de susceptibilidad antibiótica, con el objetivo de mejorar el conocimiento sobre el nivel de resistencia a estos fármacos con interés en cunicultura y salud pública. Se obtuvieron diferentes fenotipos, según las familias de antibióticos estudiadas, partiendo de un total de 86 cepas. Las familias con el mayor porcentaje de resistencia fueron las fluoroquinolonas y las tetraciclinas, mientras que las sulfonamidas tuvieron el menor porcentaje de resistencia. Además, a partir de un estudio genético, se identificó un conjunto de 29 genes de resistencia que afectaban no solo a los antibióticos, sino también a metales pesados y compuestos desinfectantes como los amonios cuaternarios. Estos genes se clasificaron en familias, lo que resultó en un total de 10 familias de antibióticos. Las tetraciclinas, los fosfonatos y los macrólidos mostraron el mayor porcentaje de resistencia entre las diferentes familias de antibióticos estudiados, mientras que los glicopéptidos, las lincosamidas y las sulfonamidas tuvieron el menor. Ciertas cepas presentaron genes de resistencia, pero no los manifestaron. Sin embargo, los estudios fenotípicos y genotípicos de resistencia a los antibióticos se encontraron correlacionados positivamente para la mayoría de los grupos de antibióticos, excepto para las lincosamidas. Los resultados mostraron que la presencia de genes de resistencia estaba fuertemente asociada con su manifestación fenotípica. Estos resultados enfatizan la importancia de considerar tanto la presencia de genes de resistencia como su manifestación fenotípica al evaluar la resistencia a los antibióticos en muestras clínicas.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, antibióticos, susceptibilidad antimicrobiana, fenotipo, genotipo.

Abstract

Staphylococcus aureus is a bacteria that can develop resistance to multiple antibiotics, making it a significant public health problem. Antimicrobial drugs were selected for antibiotic susceptibility studies with the objective of broadening our knowledge on the level of resistances of these molecules in rabbitries and for public health concerns. Different phenotypes were obtained, depending on the families of antibiotics studied, from a total of 86 strains. The families with the highest percentage of resistances were fluoroquinolones and tetracyclines, while sulfonamides had the lowest percentage. In addition, the genetic study identified a set of 29 resistance genes that have an effect not only on antibiotics but also on heavy metals and disinfectant compounds such as quaternary ammoniums. These genes were classified into families, resulting in a total of 10 antibiotic families. Tetracyclines, phosphonates, and macrolides showed the highest percentage of resistance among the families, while glycopeptides, lincosamides, and sulfonamides had the lowest. Phenotypic and genotypic studies of antibiotic resistance were found to be positively correlated for most antibiotic groups, except for lincosamides. The results showed that the presence of resistance genes was strongly associated with their phenotypic manifestation. However, certain strains presented resistance genes but did not manifest them, which may be related to the elimination of the plasmid that harbors these genes. These results emphasize the importance of considering both the presence of resistance genes and their phenotypic manifestation when evaluating antibiotic resistance in clinical samples.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antibiotics, antimicrobial susceptibility, phenotype, genotype.

Introducción

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena oportunista, responsable de diversas patologías en cunicultura como mastitis, pododermatitis y abscesos. La resistencia a los antibióticos es uno de los mayores desafíos en la lucha contra las bacterias y *S. aureus* se considera un microorganismo multiresistente con opciones terapéuticas limitadas (Aires-de-Sousa, 2017). Es capaz de adquirir y diseminar genes de resistencia a los antibióticos mediante diferentes mecanismos, incluyendo la transferencia horizontal de genes y la selección natural de mutantes resistentes. La habilidad de *S. aureus* para adquirir rápidamente resistencia a los antibióticos es una preocupación importante para la salud pública, ya que puede limitar la eficacia de los tratamientos antimicrobianos. Hasta un 20% del genoma de *S. aureus* está compuesto por elementos genéticos móviles capaces de portar resistencias (Alibayov et al., 2014). Los plásmidos, en particular, desempeñan un papel importante como portadores de resistencias a antibióticos, siendo los de mayor tamaño responsables de resistencias como a aminoglucósidos o metales pesados, mientras que los plásmidos más pequeños pueden portar resistencias a otras moléculas como el trimetoprim o las tetraciclinas (Lindsay, 2013).

Estos hallazgos subrayan la importancia de esfuerzos continuos de vigilancia e investigación dirigidos a entender los mecanismos que subyacen a la resistencia a los antibióticos en *S. aureus*. Igualmente, se destaca la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias para combatir esta creciente amenaza para la salud pública.

La secuenciación completa del genoma posibilita la identificación de segmentos genéticos que codifican proteínas con capacidad de conferir protección a las bacterias ante la acción de los antibióticos. De esta forma, se puede aumentar el conocimiento sobre cómo se expresan y se regulan. En el caso de las herramientas más clásicas como los estudios fenotípicos (como por ejemplo el método de difusión por disco), permiten obtener información clínica relevante, pero con escasez de información para análisis posteriores.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es explorar la correlación entre los métodos de análisis de resistencias utilizando enfoques fenotípicos y métodos avanzados de análisis genómico, además de comprobar la eficacia de cada técnica.

Material y métodos

Aislado de cepas: En el presente estudio se han utilizado 86 muestras de *S. aureus*, distribuidas de forma homogénea a lo largo de la Península Ibérica, que fueron obtenidas a través del cultivo en una placa de agar sangre al 5% con colistina y ácido nalidíxico (BD Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood). Estas muestras fueron incubadas a 37°C durante 24 horas para su selección posterior en base a su morfología y hemólisis. Además, aquellas colonias sospechosas de ser *S. aureus* positivas, que no presentaban hemólisis y que además presentaban un color dorado, se cultivaron en un medio de cultivo cromogénico (CHROMagar™ *Staph aureus*) que produce colonias de diferente color en presencia de la bacteria. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis mediante técnica de PCR para asegurar la correcta identificación de las muestras, empleando los genes de coagulasa y proteína A.

Secuenciación del genoma completo: Se ha obtenido el genoma completo de todas las muestras mediante el uso de la plataforma HiSeq XTen de Illumina, utilizando una técnica de secuenciación de 150x2 pb. El resultado obtenido ha sido procesado mediante un flujo de trabajo de herramientas bioinformáticas conocido como Bactopia (Petit RA 3rd y Read TD, 2020), que incluye material diseñado específicamente para el análisis de datos genéticos.

Análisis de resistencias: Asimismo, se ha empleado el programa abritAMR (Sherry NL et al., 2023), certificado por las normas ISO, para llevar a cabo el análisis de resistencias antibióticas a nivel genético. En el caso del análisis de las resistencias a nivel fenotípico, se ha llevado a cabo un antibiograma mediante el método de difusión en placa con disco (Bernal RM y Guzmán M, 1984).

Resultados y discusión

Fenotipo: Se procedió a la selección de 14 fármacos antimicrobianos (Tabla 1) con el propósito de llevar a cabo los estudios de susceptibilidad antibiótica mediante la técnica de difusión en placa con disco. Dicha selección se fundamentó en la capacidad que brindan estas moléculas para obtener una visión global y detallada sobre las resistencias antibióticas en *S. aureus*, tanto en términos de producción cunícola, como para salud pública y de investigación científica.

Del total de las 86 cepas estudiadas, se obtuvieron diferentes fenotipos según la familia de antibióticos analizada (Tabla 1). Con especial atención a los antibióticos de interés ganadero, las familias con un mayor porcentaje de resistencias fueron las fluoroquinolonas y las tetraciclinas, y las de menor porcentaje las sulfonamidas.

Tabla 1. Porcentaje de cepas que presentaron resistencia a los antibióticos testados, desglosados a su vez en familias y según su compatibilidad con antibióticos usados en granjas cunícolas.

Antibiótico	Familia	Compatibilidad en granja	%Resistencias
Ciprofloxacino	Fluoroquinolonas	Investigación	100%
Norfloxacin*	Fluoroquinolonas	Enrofloxacin	89,5%
Tetraciclina	Tetraciclinas	Doxiciclina u oxitetraciclina	82,6%
Clindamicina	Lincosamidas	Investigación	76,7%
Kanamicina	Aminoglucósido	Apramicina, neomicina, gentamicina	66,3%
Eritromicina*	Macrólidos	Tilmicosina, tulatromicina, espiramicina, gamitromicina	64%
Penicilina G*	Penicilinas	Benzilpenicilina, amoxicilina	52,3%
Gentamicina	Aminoglucósido	Apramicina, neomicina	51,2%
Trimetoprim-sulfametoxazol	Sulfonamidas	Sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina	15,1%
Cefoxitina*	Cefalosporinas	Investigación	15,1%
Ceftarolina	Cefalosporinas	Investigación	8,1%
Cloranfenicol	Anfenicoles	Investigación	4,7%
Tigeciclina	Gliciliclinas	Investigación	4,7%
Linezolid	Oxazolidinonas	Investigación	3,5%

*Estos antibióticos sirven como control de otros de antibióticos de la misma familia.

Genotipo: En relación al estudio a nivel genético (Tabla 2), se confirmó la existencia de un conjunto de 29 genes de resistencia que afectan no solo a antibióticos, sino también a metales pesados y a compuestos desinfectantes, como los amonios cuaternarios. En lo que respecta a los genes de resistencia, se agruparon en familias, lo que dio lugar a un recuento global de 9 familias de antibióticos.

En este caso, las familias que presentaron un mayor porcentaje de resistencias fueron las tetraciclinas (100%), los fosfonatos (64%) y los macrólidos (64%). En cambio, las familias que presentaron un menor número son los glucopéptidos (3,5%), las lincosamidas (23,3%) y las sulfonamidas (24,4%).

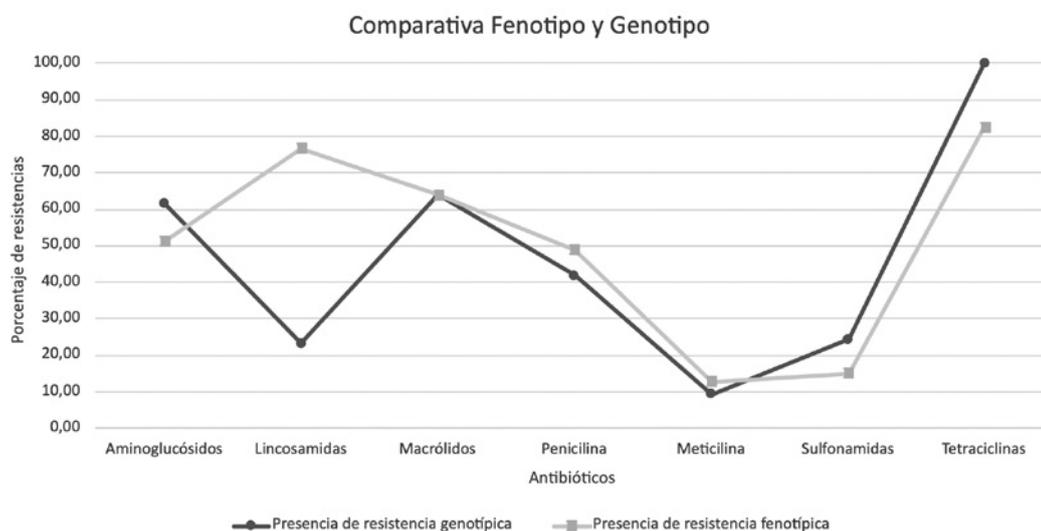
Tabla 2. Porcentaje de cepas que presentaron resistencias a nivel genético. Se representan desglosadas según las familias de antibióticos anotadas y los genes que producen resistencias.

Familia de antibióticos	Genes de resistencia	%Resistencias
Tetraciclinas	<i>tet(K)</i> <i>tet(38)</i> <i>tet(L)</i>	100,0
Fosfonatos	<i>fosB</i>	64,0
Macrólidos	<i>lmrS</i> <i>erm(C)</i>	64,0
Aminoglucósidos	<i>aac(6')-Ie/aph(2'')-Ia</i> <i>aadD1</i> <i>ant(6)-Ia</i> <i>spw</i> <i>str</i>	61,6
β -lactámicos	<i>blaZ</i> <i>mecC</i> <i>mecA</i>	51,2
Bomba de eflujo (MATE)*	<i>mepA</i>	40,7
Sulfonamidas	<i>dfrK</i> <i>dfrG</i>	24,4
Lincosamidas	<i>vga(A)</i> <i>lnu(A)</i> <i>lnu(B)</i> <i>lsa(E)</i>	23,3
Glucopéptidos	<i>bleO</i>	3,5

*Bomba de eflujo MATE (multidrug and toxic compound extrusion): Transportador de membrana que elimina moléculas tóxicas y antibióticos. Afecta varias familias, en este caso especialmente a tetraciclinas. También podría afectar a fluoroquinolonas y aminoglucósidos.

Correlación entre fenotipo y genotipo: En la siguiente gráfica (Fig. 1) se muestra la correlación entre el estudio fenotípico y genotípico de las resistencias a antibióticos. Se muestran los antibióticos clasificados por familias, excepto en el caso de la meticilina y la penicilina, ambos antibióticos pertenecientes a la familia de los β -lactámicos, que se encuentran por separado por su especial interés para la salud animal y humana.

Figura 1. Gráfica de líneas que muestra la correlación entre la presencia de resistencias genotípicas y fenotípicas diferenciado por grupos de antibióticos.



Se aprecia una asociación positiva entre la presencia de genes de resistencia y su manifestación en un modelo fenotípico en todos los grupos, a excepción de las lincosamidas, una familia de antibióticos que incluye la clindamicina. En este caso, se evidenció que todas las muestras que presentaban el gen de resistencia eran fenotípicamente resistentes. Sin embargo, existen muestras que fueron resistentes fenotípicamente, pero carecían de un gen específico de resistencia a lincosamidas. Esto podría justificarse por una interacción con los genes de resistencia a macrólidos. Estudios previos han observado este fenómeno y se ha desarrollado una técnica para distinguir fenotípicamente estas interacciones (Castellano González, 2015). En particular, los β -lactámicos presentaron una correlación perfecta. En contraste, se han detectado ciertas cepas que presentaban genes de resistencia, pero no los manifestaban, en el caso de los aminoglucósidos y las sulfonamidas.

En conclusión, se observó una asociación positiva entre la presencia de genes de resistencia y su manifestación fenotípica en la mayoría de los grupos de antibióticos, excepto en las lincosamidas. En general, estos resultados destacan la importancia de tener en cuenta tanto la presencia de genes de resistencia como su manifestación fenotípica al evaluar la resistencia a los antibióticos en las muestras clínicas.

Agradecimientos

Este proyecto está financiado por la Universidad CEU Cardenal Herrera (INDI22/11) y el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-117897RB-I00). Los contratos predoctorales de Carmen Martínez Seijas, Patricia Mascarós Núñez y José Francisco Díaz Méndez están financiados por la Universidad CEU Cardenal Herrera. Asimismo, nos gustaría expresar gratitud a los ganaderos y veterinarios que están colaborando activamente en la toma de muestras y proporcionando información sobre los casos, ya que su ayuda es fundamental el desarrollo del proyecto. En particular, nos gustaría destacar la colaboración del laboratorio Exopol S.L., que ha compartido generosamente parte de sus cepas con nosotros.

Bibliografía

- Aires-de-Sousa M. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection* 23(6): 373-380.
- Alibayov B, Baba-Moussa L, Sina H, Zdenková K, Demnerová K. 2014. *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. *Molecular Biology Reports* 41(8): 5005-5018.
- Bernal RM, Guzmán M. 1984. El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica* 4(3-4): 112-121.
- Castellano González MJ, Perozo Mena AJ, Molero Cubillán MJ, Montero Araujo SC, Primera Rodríguez FJ. 2015. Resistencia a la clindamicina inducida por eritromicina en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. *Kasmera* 43(1): 34-45.
- Lindsay JA. 2013. Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance-what have we learned from genomics? *International Journal of Medical Microbiology* 303(6-7): 318-323.
- Petit III RA, Read TD. 2020. Bactopia: a flexible pipeline for complete analysis of bacterial genomes. *mSystems* 5(4): e00190-20.
- Sherry NL, Horan KA, Ballard SA, Gonçalves da Silva A, Gorrie CL, Schultz MB, Stevens K, Valcanis M, Sait ML, Stinear TP, Howden BP, Seemann T. 2023. An ISO-certified genomics workflow for identification and surveillance of antimicrobial resistance. *Nature Communications* 14(1): 60.

Análisis de comparativa genómica de clones de *Staphylococcus aureus* en cunicultura: CC121 versus CC96

Genomic comparative analysis of *Staphylococcus aureus* clones in rabbit farming: CC121 versus CC96

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

1Grupo 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.

*jose.diazmendez@uchceu.es

Resumen

Staphylococcus aureus es una bacteria que puede causar múltiples enfermedades en los conejos y afectar negativamente a su capacidad productiva. Además, esta bacteria es importante como organismo modelo para el estudio genómico y molecular debido a su capacidad para adquirir y transferir genes de resistencia a los antibióticos y de virulencia. Dos de los complejos clonales de *S. aureus* más frecuentes y ampliamente distribuidos en cunicultura en nuestro país son CC121 y CC96. El CC121 se ha asociado a infecciones más graves *in vivo* e *in vitro*, mientras que el CC96 a infecciones menos graves. Las diferencias genómicas entre CC121 y CC96 se deben a mutaciones y a la adquisición de elementos genéticos móviles. Este estudio pretende establecer una visión preliminar *in silico* de las diferencias genómicas entre los dos complejos clonales más representativos de *S. aureus* que afectan a la cunicultura. En el estudio se analizaron 71 secuencias de *S. aureus*, de las cuales 50 estaban asociadas al CC121 y 21 al CC96. El análisis pangenómico de las cepas seleccionadas mostró que el 56,8% de los genes estaban presentes en todas las cepas, mientras que el 19,27% de los genes determinan las diferencias entre cepas, como ocurre en los perfiles de virulencia y resistencias a antibióticos. La filogenia de ambos complejos clonales no está del todo diferenciada, pues las ST96 del CC96 se encuentran evolutivamente más próximos a ciertas cepas de CC121 que del CC96. Por último, se ha observado la presencia de ciertos factores de virulencia en función del complejo clonal analizado. Por lo tanto, este estudio preliminar pone de manifiesto la importancia del análisis genómico para comprender la patogénesis bacteriana y desarrollar estrategias de tratamiento eficaces.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, CC96, CC121, genómica comparativa, conejo.

Abstract

Staphylococcus aureus is a bacterium that can cause multiple diseases in rabbits and negatively affect their productive capacity. Furthermore, this bacterium is important as a model organism for genomic and molecular studies due to its ability to acquire and transfer antibiotic resistance and virulence genes. Two of the most frequent and widely distributed *S. aureus* clonal complexes in rabbit farming in our country are CC121 and CC96. CC121 has been associated with more severe infections *in vivo* and *in vitro*, while CC96 with less severe infections. Genomic differences between CC121 and CC96 are due to mutations and the acquisition of mobile genetic elements. This study aims to establish a preliminary *in silico* view of the genomic differences between the two most representative clonal complexes of *S. aureus* that affect rabbit farming. In the study, 71 *S. aureus* sequences were analyzed, of which 50 were associated with CC121 and 21 with CC96. The pangenomic analysis of the selected strains showed that 56.8% of the genes were present in all the strains, while 19.27% of the genes determine the differences between strains, as occurs in the profiles of virulence and resistance to antibiotics. The phylogeny of both clonal complexes is not fully differentiated, since the ST96 of CC96 are evolutionarily closer to certain strains of CC121 than to CC96. Finally, the presence of certain virulence factors has been observed depending on the clonal complex analyzed. Therefore, this preliminary study highlights the importance of genomic analysis to understand bacterial pathogenesis and develop effective treatment strategies.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, CC96, CC121, comparative genomics, rabbit.

Introducción

Los conejos pueden verse afectados por la bacteria *Staphylococcus aureus*, la cual tiene la capacidad de provocar la aparición de múltiples patologías y afectar negativamente su capacidad productiva (Barthe et al., 2009). Existen diversas patologías que pueden manifestarse en los conejos, tales como infecciones cutáneas, trastornos respiratorios y graves enfermedades sistémicas. La posibilidad de infección entre el personal que está en contacto con estos animales se ve incrementada por la facilidad de diseminación de la bacteria en las granjas cunícolas (Attili et al., 2020; Rosell y de la Fuente, 2018).

Además de su importancia como patógeno en cunicultura, *S. aureus* también es un importante organismo que sirve como modelo para estudiarlo genómicamente y molecularmente, debido a su capacidad para adquirir y transferir genes de resistencia a los antibióticos. Así como también genes relacionados con la virulencia y patogenicidad de esta bacteria, lo que puede llevar a la identificación de nuevas estrategias de tratamiento (Malachowa y Deleo, 2010; Viana et al., 2007).

Los complejos clonales 121 (CC121) y 96 (CC96) de *S. aureus* son dos de los complejos clonales más frecuentes y ampliamente distribuidos en las granjas cunícolas de la Península ibérica. Se ha encontrado que existen diferencias significativas en la capacidad de producir toxinas y causar enfermedades entre estos dos complejos clonales. En particular, los ensayos de virulencia realizados *in vivo* e *in vitro* muestran una mayor virulencia de las cepas del CC121, mientras que las infecciones menos graves, se han asociado al CC96 (Penadés et al., 2020). Además, se ha demostrado que CC96 tiene una mayor frecuencia de genes de resistencia a múltiples antibióticos, incluyendo la meticilina, mientras que el CC121 es generalmente más susceptible a los antibióticos (Moreno-Grúa et al., 2018; Shen et al., 2019).

El objetivo de este trabajo es establecer una visión preliminar *in silico* de las diferencias genómicas que existen entre los dos complejos clonales de *S. aureus* más prevalentes en granjas cunícolas de la Península ibérica.

Material y métodos

Cepas. Un total de 90 muestras fueron inoculadas en Agar Columbia con 5% sangre (CNA) y se incubaron durante 24 h a 37°C. Después de 24 h, las colonias compatibles con *S. aureus* se identificaron en función de la morfología y la capacidad hemolítica y se inocularon en caldo de soja triptico (TSB) para la posterior extracción de ADN. Utilizando este ADN, se amplificaron los genes *coa*, *spa* y *clfB* para confirmar el aislamiento de *S. aureus*.

Secuenciación. Las cepas fueron enviadas a Sequencing Multiplex S.L (Paterna, Valencia) para su secuenciación mediante HiSeq XTen (Illumina).

Análisis bioinformático. Las secuencias fueron procesadas mediante Bactopia (Petit y Read, 2020). Así mismo se realizó el tipado MLST (Jolley et al., 2018) y se seleccionaron las secuencias pertenecientes a los CC96 y CC121, un total de 71 cepas. Igualmente, se realizó un análisis pangenómico con la herramienta Roary (Page et al., 2015) y se analizó su filogenia mediante el software MEGA11 (Tamura et al., 2021).

Resultados y discusión

Mediante el estudio bioinformático de 71 secuencias de *S. aureus* correspondientes a los CC121 y CC96, se han observado 50 cepas pertenecientes al CC121 (70,43%) y 21 cepas asociadas al CC96 (29,57%).

Para el análisis pangenómico de estas cepas, se analizaron un total de 3361 genes, de los cuales 1909 estaban presentes entre el 99-100% de las cepas, conformando aproximadamente el 56,8 % de los genes totales (Tabla 1). Por otro lado, 648 genes estaban presentes en un porcentaje minoritario de las cepas, permitiendo establecer diferencias entre cepas de diferente complejo clonal e incluso en el mismo complejo clonal, que pueden ser los que determinen la patogenicidad o no de la infección. Así mismo, se observó que, conforme aumentaba el número de cepas analizadas en la comparativa, descendía el número de genes conservados en todos los genomas (Figura 1a). Estos datos refuerzan los resultados publicados sobre el genoma de *S. aureus*, en los que se establece que muestran hasta un 22% de variabilidad (Baba et al., 2008).

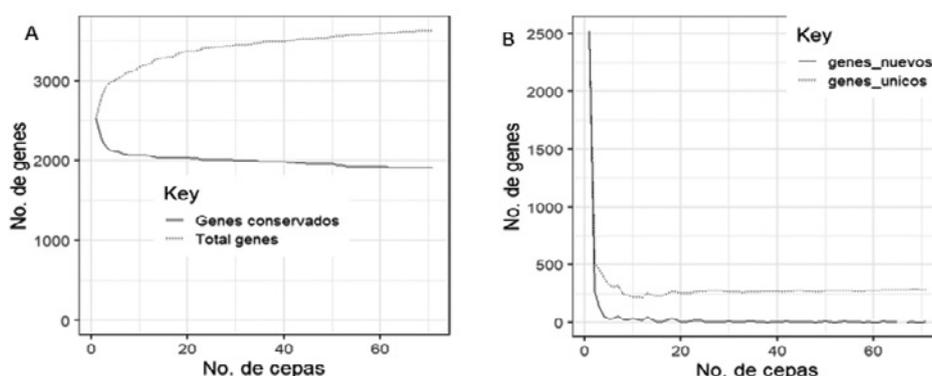
Tabla 1. Clasificación de grupos de genes en función de su presencia en las cepas estudiadas. Se muestra, a su vez, el porcentaje de cepas que los representaban y el número total de genes que incluían.

Tipos de genes	% Cepas	Nº de genes
Genes del Core	99-100	1909
Genes Soft Core	95-99	205
Genes Shell	15-95	869
Genes Cloud	0-15	648
Total	0-100	3361

Genes del Core: Genes presentes en todas las cepas. Genes Soft Core: Genes presentes en más del 95% de las cepas. Genes Shell: Genes que no están presentes en todos los genomas, pero sí en numerosos genomas. Genes Cloud: Genes que se encuentran en una cepa o muy pocas.

Desde el punto de vista de la aparición de genes únicos (genes que solo se encuentran en una cepa de nuestro análisis, pero están registrados en bases datos), a medida que se añade un nuevo genoma, existe la posibilidad de que algunos de esos genes no estén en los anteriores, por lo que podría ser un nuevo gen descrito. Sin embargo, se observó como el número de genes nuevos tenía un valor 0, por lo que no se llegó a describir ningún gen nuevo, no descrito con anterioridad (Figura 1b).

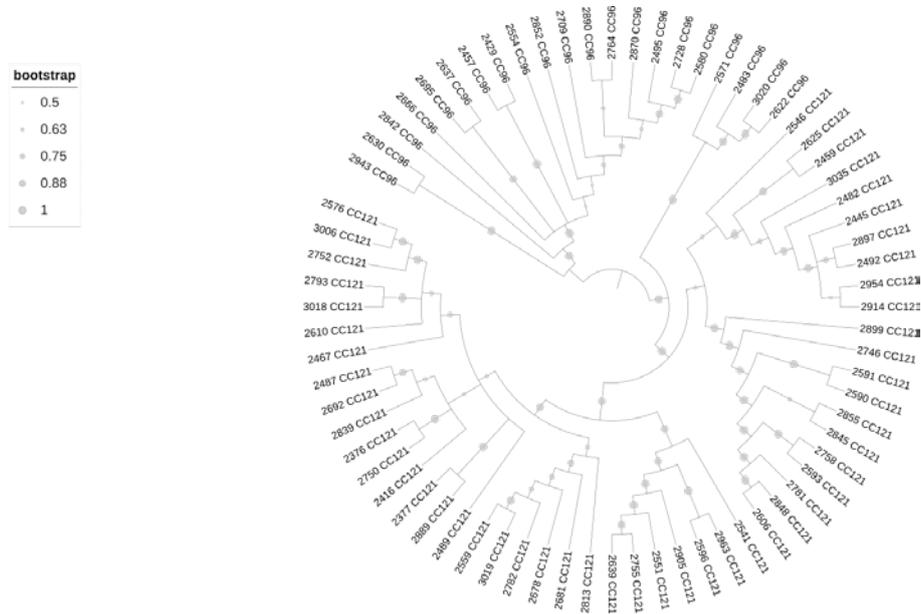
Figura 1. Relación entre el número de genes y el número de cepas secuenciadas. Curva de cepas secuenciadas frente a la de genes totales y genes conservados (A), y, genes nuevos y únicos (B).



Adicionalmente, se construyó un árbol filogenético empleando un método estadístico de máxima verosimilitud de las 71 cepas estudiadas (Figura 2), el cual se llevó a cabo utilizando las secuencias del "core genome" de cada una de las cepas. Este árbol mostró como existe una relación entre ciertas cepas del CC96 muy próximas evolutivamente a determinadas cepas del CC121, concretamente las cepas 2483, 2571, 2622 y 3020. Estos resultados reflejan como las ST96 están más emparentadas evolutivamente a ciertas STs del CC121 que a otras STs del CC96.

Por último, se determinó la presencia de factores de virulencia que fuesen diferentes en ambos complejos clonales. Los genes de virulencia *hld*, *lukd* y *scn* no se localizaron en las cepas CC121, pese a que el CC121 se clasifique como clon hipervirulento. El gen *hld* codifica para una hemolisina que ataca a la membrana y produce destrucción de las plaquetas y necrosis (Janzon y Arvidson, 1990); *lukd* codifica para una parte de una leucotoxina bicomponente que, actuando sobre la membrana de las células diana induce dermonecrosis en la piel de los conejos (Gravet et al., 1998), y *scn* participa en la inhibición de la actividad inmunológica de los neutrófilos (Van Wamel et al., 2006). En lo relativo a las enterotoxinas, en las cepas CC96 solo se detectó una enterotoxina, *selx*; mientras que en las cepas CC121 aparecieron un mayor número, como *seo*, *sem*, *sey*.

Figura 2. Árbol filogenético de 71 cepas de *S. aureus*. Análisis evolutivo realizado mediante el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Jukes-Cantor. El árbol de consenso Bootstrap (n° de repeticiones en el que ha aparecido ese taxón en esa posición concreta del árbol) inferido de 20 repeticiones se toma para representar la historia evolutiva de los taxones analizados.



En conclusión, los resultados de este estudio preliminar mostraron como existe un porcentaje elevado de genoma variable en la especie *S. aureus*, lo que provoca inmensas diferencias entre cepas dentro del mismo complejo clonal. Para estudios futuros, sería interesante realizar un estudio de los anteriormente llamados "genes cloud" y "genes shell", ya que pueden ser la base para el desarrollo de nuevas terapias frente a este patógeno, puesto que estos genes son los que determinan las diferencias entre cepas.

Agradecimientos

Este proyecto está financiado por la Universidad CEU Cardenal Herrera (INDI22/11) y el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-117897RB-I00). Los contratos predoctorales de Carmen Martínez Seijas, Patricia Mascarós Núñez y José Francisco Díaz Méndez están financiados por la Universidad CEU Cardenal Herrera. Asimismo, nos gustaría expresar gratitud a los ganaderos y veterinarios que están colaborando activamente en la toma de muestras y proporcionando información sobre los casos, ya que su ayuda es fundamental el desarrollo del proyecto. En particular, nos gustaría destacar la colaboración del laboratorio Exopol S.L., que ha compartido generosamente parte de sus cepas con nosotros.

Bibliografía

Attili AR, Bellato A, Robino P, Galosi L, Papeschi C, Rossi G, Fileni E, Linardi M, Cuteri V, Chiesa F, Nebbia P. 2020. Analysis of the Antibiotic Resistance Profiles in Methicillin-Sensitive *S. aureus* Pathotypes Isolated on a Commercial Rabbit Farm in Italy. *Antibiotics* 9(10), 1-14.

Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K. 2008. Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain Newman and Comparative Analysis of Staphylococcal Genomes: Polymorphism and Evolution of Two Major Pathogenicity Islands. *Journal of Bacteriology*, 190(1): 300.

Barthe C, Hermans K, Haesebrouck F. 2009. Main pathologies associated with *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review. *World Rabbit Science* 17(3): 115-125.

Gravet A, Colin DA, Keller D, Giradot R, Monteil H, Prévost G. 1998. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Letters* 436(2): 202-208.

- Janzon L, Arvidson S. 1990. The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *The EMBO Journal* 9(5): 1391.
- Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*: 3.
- Malachowa N, Deleo F R. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Science* 67(18): 3057.
- 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. *Frontiers in Microbiology*: 9(AUG).
- Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22): 3691-3693.
- Penadés M, Viana D, García-Quirós A, Muñoz-Silvestre A, Moreno-Grúa 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. *Veterinary Research* 51(1).
- Petit RA, Read TD. 2020. Bactopia: a Flexible Pipeline for Complete Analysis of Bacterial Genomes. *MSystems* 5(4).
- Rosell JM, de la Fuente LF. 2018. Mastitis on rabbit farms: Prevalence and risk factors. *Animals* 8(6).
- Shen P, Zhou K, Wang Y, Song J, Liu Y, Zhou Y, Xiao Y. 2019. High prevalence of a globally disseminated hypervirulent clone, *Staphylococcus aureus* CC121, with reduced vancomycin susceptibility in community settings in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(9): 2537-2543.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022.
- Van Wamel WJB, Rooijackers SHM, Ruyken M, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG. 2006. The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Are Located on β -Hemolysin-Converting Bacteriophages. *Journal of Bacteriology* 188(4): 1310.
- Viana D, Selva L, Segura P, Penadés JR, Corpa JM. 2007. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit lesions. *Veterinary Microbiology* 121(3-4): 288-298.

Desarrollo de un ELISA indirecto basado en proteínas virales recombinantes para la detección de anticuerpos frente al virus mixoma

Development of an ELISA for the detection of anti-myxoma virus antibodies based on recombinant viral proteins.

Calonge-Sanz I*, Menéndez A, Álvarez AL, Alonso JM, Dalton KP, Parra F

Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Departamento de Bioquímica y Biología, Universidad de Oviedo, Oviedo, 33006, Spain

**calongeines@uniovi.es*

Resumen

El virus mixoma (MYXV) es el agente infeccioso causante de la mixomatosis, una enfermedad que afecta al conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). Desde su introducción en Europa a mediados de los años 50, MYXV ha tenido un efecto devastador en las poblaciones de conejo silvestre. Tras años de coevolución virus-hospedador, los conejos silvestres se han convertido en un reservorio del virus, por lo que actualmente la mixomatosis está considerada como enfermedad endémica en Europa. A pesar de disponer de varias vacunas comerciales, hay brotes anuales de mixomatosis que afectan tanto a conejos silvestres como domésticos. La realización de seguimientos serológicos rutinarios es imprescindible para establecer las medidas de control más adecuadas. En este trabajo se describe el desarrollo de pruebas serológicas basadas en proteínas recombinantes que se podrían usar para la detección de anticuerpos anti-MYXV. Para ello, se seleccionaron varias proteínas candidatas para explorar sus propiedades como antígenos utilizables en ELISAs indirectos para la detección de anticuerpos específicos en los sueros de conejo. Se utilizaron varios sueros positivos de conejo para estandarizar los ELISAs indirectos basados en las proteínas recombinantes rM022L y rM115L, y su comparación con un ELISA comercial. Los resultados preliminares muestran que pueden ser una alternativa útil para la evaluación serológica de animales de granja vacunados, así como en estudios de seroepidemiología de la mixomatosis.

Palabras clave: virus mixoma (MYXV), ELISA, proteínas recombinantes, serovigilancia.

Abstract

Myxoma virus (MYXV) is the causative agent of mixomatosis, a disease that affects the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Upon its deliberate introduction in Europe in the 1950s, MYXV has had a devastating impact on native rabbit populations. Over years of coevolution with its host, wild rabbits have become a reservoir for the virus whereby myxomatosis is currently considered an endemic disease in Europe. Despite there being several vaccines currently available, there are annual myxomatosis outbreaks affecting both wild and farm rabbits. Routine serological monitoring procedures to indicate disease prevalence in wild rabbit populations and thorough surveillance of the serological status after vaccination on rabbit farms are essential to help establish suitable control measures. Here we describe the development of serological tests that could be used for the detection of anti-MYXV antibodies based on recombinant proteins. For this, several candidate proteins were selected to explore their antigenic properties in indirect ELISAs for the detection of specific antibodies in rabbit sera. Several positive and negative rabbit sera were used to standardize the indirect ELISAs based on the rM022L and rM115L recombinant proteins, and their comparison with a commercial ELISA. The preliminary results show that they can be a useful alternative for the serological evaluation of vaccinated farm animals, as well as in seroepidemiology studies of myxomatosis.

Keywords: myxoma virus (MYXV), ELISA, recombinant protein, serosurveillance

Introducción

El virus mixoma (MYXV), un miembro de la familia Poxviridae, fue identificado en Uruguay en 1898. En sus hospedadores naturales, lepóridos del continente americano (*Sylvilagus* spp.), la infección por MYXV causa fibromas cutáneos benignos y localizados. Sin embargo, este virus es el agente causal de la mixomatosis en el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), que puede cursar con dos formas diferentes: nodular o clásica, caracterizada por la aparición de lesiones nodulares cutáneas y depresión inmunológica; y amixomatosa o atípica, que cursa principalmente con signos respiratorios.

Su introducción deliberada en Europa a mediados de los años 50 tuvo un impacto devastador en la población autóctona de conejos, alcanzando tasas de mortalidad del 95-99%. La población de conejos silvestres actúa como reservorio del virus que puede transmitirse por contacto directo con animales contagiados o fómites, y por vía mecánica a través de la picadura de insectos. A pesar de disponer de varias vacunas comerciales, sigue habiendo brotes anuales de mixomatosis que afectan tanto conejos silvestres como de domésticos (Dalton et al., 2015).

La realización de seguimientos serológicos rutinarios en las poblaciones de conejos silvestres, y el monitoreo del estado serológico tras la vacunación en las granjas son procedimientos necesarios para reunir la información requerida a la hora de establecer las medidas de control más adecuadas en cada situación. En el momento actual, únicamente se dispone de una prueba de diagnóstico serológico comercial (ELISA) en la cual se usa el virus completo como antígeno. La producción de este antígeno es costosa, implica el uso de técnicas de cultivo celular y requiere disponer de instalaciones acondicionadas para ello, en condiciones de seguridad biológica adecuadas. En este trabajo se propone el uso de sistemas heterólogos para la producción de proteínas virales recombinantes con carácter antigénico con el fin de utilizarlas para la detección de anticuerpos específicos anti-MYXV en sueros de conejo.

Material y métodos

Sueros: los sueros utilizados en este trabajo proceden de conejos incluidos en un experimento de laboratorio en lo cual se realizó vacunación frente al MYXV y posteriormente algunos de los individuos fueron retados con el virus para evaluar el nivel de protección adquirida. Todos los experimentos fueron aprobados por la autoridad local de acuerdo con las directrices del Gobierno español (Real Decreto 1201/2005) y la Guía de la Comunidad Europea para el cuidado de los animales (Directiva del Consejo 86/609/EEC). Los sueros se analizaron con un kit de ELISA comercial para clasificar a los animales en seropositivos o seronegativos.

Producción y purificación de proteínas virales recombinantes: Los genes virales completos m022l, m071l, m115l se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desde el genoma de la cepa de virus mixoma Lausanne. Los productos de PCR se clonaron en el vector de expresión pTri-Ex1.1, con fusión a un marcador de cola de histidinas en el extremo C-terminal. En el caso de m022l, también se incluyó la proteína GST en el extremo N-terminal para facilitar la purificación. Los plásmidos resultantes pTri-m022l, pTri-m071l y pTri-m115l se usaron independientemente junto con el bácmido Bac10:KO1629 para la generación de baculovirus recombinantes (rBaV) en la línea celular de insecto Sf9. Cultivos de Sf9 en suspensión se infectaron con rBaV-M022L, rBaV-M071L y rBaV-M115L, y tras 48h de incubación a 100 rpm a 28°C las células se procesaron y las proteínas virales recombinantes fueron purificadas desde la fracción soluble del lisado celular mediante cromatografía de afinidad. Los eluidos finales se dializaron, se cuantificaron y se conservaron a -20°C.

Análisis de la antigenicidad de las proteínas recombinantes: Tras la purificación, las proteínas virales recombinantes se analizaron en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron frente distintos sueros de conejo, seropositivos y seronegativos al virus mixoma.

Desarrollo de un ELISA indirecto basado en virus mixoma completo (ELISA-MYXV): El cultivo, amplificación y purificación del virus MYXV (cepa Lausanne) se adaptó del protocolo Gelfi et al., 1999. El virus se adsorbe sobre la fase sólida directamente y actúa como antígeno para la detección de anticuerpos anti-MYXV en los sueros. La cantidad de antígeno, dilución de sueros, dilución del anticuerpo secundario, etc. se determinó por el método CBT (Crowther, 2009).

Desarrollo de ELISAs indirectos basados en proteínas recombinantes: Las proteínas virales recombinantes se utilizaron para tapizar una placa de 96 pocillos de fondo plano Costar® Assay Plate (Corning). Una mezcla de

nueve sueros de conejo previamente analizados por ELISA comercial, muy seropositivos a MYXV se usaron como control positivo, un suero comercial negativo para MYXV se usó como control negativo del ensayo. La concentración de proteína recombinante, así como el resto de las condiciones del ensayo (diluciones de suero, diluciones del anticuerpo secundario, solución de bloqueo, temperatura de incubación, etc.) se optimizaron para obtener el máximo valor de ratio positivo/negativo (P/N).

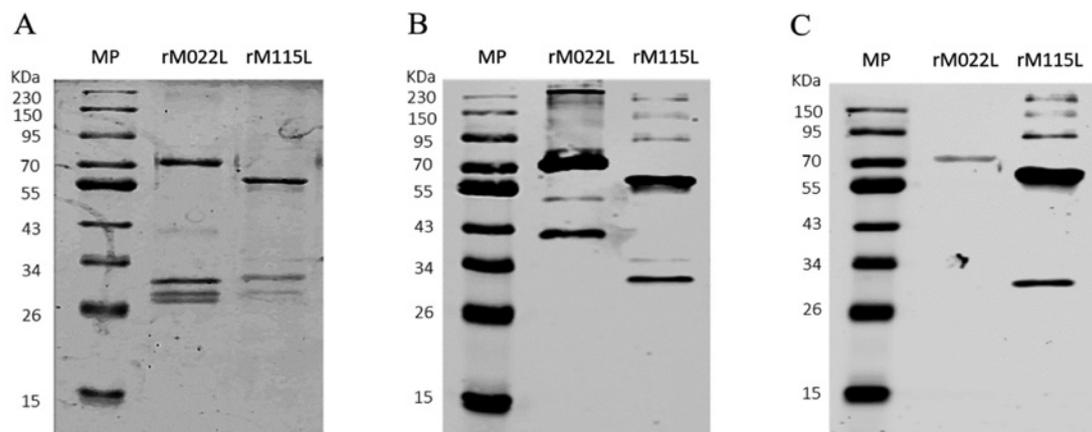
Resultados y discusión

Análisis de sueros con la prueba serológica comercial: Se analizaron 37 sueros de conejo para detectar la presencia de anticuerpos anti-MYXV utilizando el kit comercial de ELISA indirecto basado en el virus completo. Los resultados obtenidos por esta prueba fueron los siguientes: 24 sueros resultaron positivos y 17 negativos.

Expresión y purificación de las proteínas recombinantes: La producción de las proteínas recombinantes utilizando baculovirus se confirmó mediante un análisis por SDS-PAGE (Fig. 1-A) y Western blot utilizando anticuerpos frente a la cola de histidinas, fusionada a las proteínas virales en C-terminal usada como marcador (Fig. 1-B). En el carril correspondiente a rM022L se observan las bandas de la proteína recombinante fusionada con GST (~70 kDa) y a la forma libre de GST (41kDa).

Reactividad de las proteínas recombinantes frente a sueros anti-MXYV en Western blot: En el estudio de antigenicidad de las dos proteínas por Western blot (Fig. 1-C) se puede observar que, utilizando la misma cantidad de proteína recombinante, rM115L tiene determinantes antigénicos más potentes que rM022L.

Figura 1. Reactividad de antígenos contra sueros anti-MXYV.



(A) Análisis de las proteínas recombinantes en electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% acrilamida seguido de tinción con Azul Coomassie; (B) Análisis por Western blot con anticuerpos frente a la cola de histidinas y (C) Análisis Western blot utilizando una mezcla de nueve sueros positivos frente al virus mixoma.

ELISAs indirectos usando proteínas recombinantes: Después de optimizar las condiciones del ensayo para cada una de las proteínas recombinantes, se analizaron los mismos 37 sueros de conejo con el ELISA-rM022L y el ELISA-rM115L, respetando las condiciones particulares de cada ensayo. Los resultados obtenidos se comparan con la prueba serológica comercial y con el ELISA-MYXV casero (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de resultados del análisis de sueros de conejo por los distintos ELISAs desarrollados en el presente trabajo

Resultado	Prueba comercial	ELISA-MYXV	ELISA-rM022L	ELISA-rM115L
P	24	24	19	22
N	13	13	18	15

P: positivo; N: negativo

La comparación de los resultados preliminares obtenidos de las pruebas ELISA puesto a punto en nuestro laboratorio utilizando virus completo como antígeno tiene un comportamiento similar al sistema comercial. Por otro se observan algunas diferencias de especificidad y sensibilidad cuando se utilizan antígenos recombinantes purificados. Ello podría indicar que la vacuna usada, así como el tipo de inoculación de la vacuna (intradérmica o subcutánea), son factores relevantes que influyen en la proporción de anticuerpos generados frente determinadas proteínas virales, y en concreto frente a las dos proteínas rM022L y M115L. Por otro lado, los viriones de MYXV pueden llegar a tener dos envueltas lipídicas; la proteína M022L forma parte de la envuelta externa, mientras que M115L forma parte de la envuelta interna del virión. Esta diferencia de localización de las proteínas antigénicas en la estructura del virión influye en su accesibilidad y exposición, y podría estar afectando también a la respuesta inmunológica del individuo infectado.

En conclusión, se muestra que las pruebas de ELISA indirecto basado en las proteínas recombinantes rM022L y rM115L podrían servir para realizar evaluaciones del estado serológico de conejos de granja, pero es necesario incluir un mayor número de sueros para realizar estudios de sensibilidad y especificidad más exhaustivos de ambas pruebas serológicas.

Agradecimientos

ICS agradece la financiación del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (PRE2018-087157). KPD y JMMA agradecen la financiación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (REF: PID2020-120349RB-100). KPD y FP agradecen la financiación recibida por parte de INTERCUN. FP agradece la financiación recibida del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (AGL2017-83395-R).

Bibliografía

Crowther J.R. 2009. *The ELISA Guidebook*. Springer. NYC, NY, USA, Second edition.

Dalton KP, Nicieza I, de Llano D, Gullón J, Inza M, Petralanda M, Arroita Z, Parra F. 2015. Vaccine breaks: Outbreaks of myxomatosis on Spanish commercial rabbit farms. *Veterinary Microbiology* 178: 208-216.

Gelfi J, Chantal J, Phong TT, Py R, Boucraut-Baralon C. 1999. Development of an ELISA for detection of myxoma virus-specific rabbit antibodies: test evaluation for diagnostic applications on vaccinated and wild rabbit sera. *J Vet Diagn Invest* 11(3):240-5.

Estudio de factores de virulencia de *Escherichia coli* asociados a procesos digestivos en cunicultura

Study of Escherichia coli virulence factors associated with digestive disorders in rabbit rearing

Sanz C*, Arnal JL, Chacón G, Fernández AB

Exopol. Pol. Río Gállego, D-14. 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza, España.

*csanz@exopol.com

Resumen

Los problemas digestivos causan graves pérdidas económicas en las explotaciones cunícolas. Dentro de los agentes bacterianos, *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) portador del gen *eae* es uno de los más importantes en este tipo de procesos. Se conocen otros factores de virulencia codificados por los genes *afr2*, *ral*, *lifA* y *paa*, asociados a cepas EPEC en conejos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre estos factores de virulencia de *E. coli* y el antígeno somático O103 con sus posibles combinaciones. Para ello se seleccionaron 113 cepas de *E. coli* aisladas de muestras digestivas de gazapos diferenciadas en tres grupos distintos: 39 cepas de *E. coli* EPEC y 39 cepas de *E. coli* no EPEC de conejos con sintomatología digestiva y 35 cepas (27 no EPEC y 8 EPEC) aisladas de muestras de conejos sin signos evidentes de enfermedad entérica. Todos los aislamientos EPEC también fueron positivos a al menos otro factor de virulencia. El perfil positivo a *liftA*, *ral* y *paa* fue el detectado con mayor frecuencia (n=33) mientras que los aislados positivos para *afr2* fueron escasos (n=6). Respecto al serotipo O103, se encontró en 12 de las cepas estudiadas, todas ellas EPEC. Las cepas no enteropatógenas (no EPEC) de ambos grupos de animales, enfermos y sanos (n=39 y n=27) fueron negativas para el resto de los factores de virulencia investigados así como para el serotipo O103. Podemos concluir que el gen *eae* es el mejor marcador genético utilizado para definir las cepas de *E. coli* virulentas en conejo.

Palabras clave: conejo, digestivo, *Escherichia coli*, gen *eae*, virulencia.

Abstract

Digestive disorders cause serious economic losses in rabbit farms. Among the bacteria, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) which is encoded by the *eae* gene, is one of the most important agents in these processes. Other virulence factors encoded by the *afr2*, *ral*, *lifA* and *paa* genes associated with EPEC strains in rabbits are known. The aim of this study was to investigate the relationship between these *E. coli* virulence factors and the O103 somatic antigen and their possible combinations. For this purpose, 113 strains of *E. coli* isolated from digestive samples of rabbits were selected differentiated into three groups: 39 strains of EPEC *E. coli* and 39 strains of non-EPEC *E. coli* from rabbits with digestive symptoms and 35 strains (27 non-EPEC and 8 EPEC) isolated from rabbit samples without obvious signs of enteric disease. All EPEC strains were also positive for at least one other virulence factor. The positive profile for *liftA*, *ral* and *paa* was the most frequently detected (n=33) while the strains positive for *afr2* were scarce (n=6). The O103 serotype was found in 12 of the strains, all of them EPEC. The non-enteropathogenic strains (non-EPEC) from both groups of animals, with and without disease (n=39 and n=27) were negative for the rest of the virulence factors investigated as well as for the O103 serotype. We can conclude that the *eae* gene is the best genetic marker used to identify virulent *E. coli* strains in rabbits.

Keywords: rabbit, digestive, *Escherichia coli*, *eae* gene, virulence.

Introducción

Los problemas digestivos son la principal causa de pérdidas económicas en la producción cunícola industrial. Cursan con alta morbilidad y mortalidad y afectan principalmente a los animales más jóvenes (lactantes y cebo) (Marlier *et al.*, 2003; Boucher *et al.*, 2005). La sintomatología clínica que aparece en este tipo de procesos es: anorexia, apatía y diarrea y, en cuanto a la etiología, existen diferentes agentes patógenos que pueden aparecer o no de forma simultánea (Rosell, 2000). Dentro de los agentes bacterianos, *Escherichia coli* es uno de los más importantes en este tipo de procesos. *E. coli* es un microorganismo comensal que se encuentra normalmente en el intestino de mamíferos y aves, pero que en determinadas ocasiones puede ser patógeno. La capacidad de esta enterobacteria para producir enfermedad reside en la producción de ciertos factores de virulencia a través de la expresión de genes de virulencia contenidos en su genoma. *E. coli* enteropatógeno (EPEC) es uno de los más importantes en la especie cunícola, siendo en los animales más jóvenes donde más se detecta como agente único causando la colibacilosis neonatal (Blanco *et al.*, 1996). La virulencia de estas cepas EPEC no reside en la producción de toxinas, si no que se caracteriza por la adhesión bacteriana a las células epiteliales del intestino delgado, con la destrucción posterior de las microvellosidades. El mecanismo de acción de estas cepas se inicia con el receptor de la intimina, una proteína que se inserta en la membrana epitelial, y que está codificada por el gen *eae*, el cual está integrado en una isla de patogenicidad denominada locus de borramiento de enterocitos (LEE) (Franzin *et al.*, 2015). Además se conocen otros factores de virulencia codificados por los genes *afr2* (adhesive factor/rabbit 2), *ral* (rabbit EPEC adherence locus) *lifA* (rabbit EPEC adherence locus) y *paa* (porcine attaching and effacing-associated) asociados a cepas EPEC en conejos, aunque su implicación no está del todo clara, ya que se han aislado cepas EPEC que carecen de estas adhesinas fimbriales (Dow *et al.*, 2005). Además de todo ello, se ha descrito que dentro de las cepas EPEC, algunos serotipos son sobre todo patógenos para gazapos lactantes, mientras que otros lo son para destetados (Peeters *et al.*, 1984a,b). Para la clasificación de serotipos, el antígeno somático (O), relacionado con la pared celular es uno de los más estudiados. Los serogrupos de *E. coli* más importantes descritos como patógenos en conejos son: O103, O15, O109 y O26, y se consideran como secundarios: O2, O85, O132 y O128 (Blanco *et al.*, 1996). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la relación entre los diferentes factores de virulencia de *E. coli* descritos en cunicultura, así como sus posibles combinaciones, tanto en cepas EPEC y no EPEC aisladas de muestras digestivas de gazapos criados en granjas comerciales.

Material y métodos

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron 113 cepas de *E. coli* de conejos que se diferenciaron en tres grupos distintos: 39 cepas de *E. coli* EPEC y 39 cepas de *E. coli* no EPEC de conejos con sintomatología digestiva y 35 cepas (27 no EPEC y 8 EPEC) aisladas de muestras de conejos sin signos evidentes de enfermedad entérica. Los aislados se obtuvieron de muestras digestivas tanto de gazapos lactantes como de cebo, enviadas por veterinarios clínicos al laboratorio procedentes de granjas de conejos localizadas a lo largo de la Península Ibérica, entre los años 2018 y 2019. Para la obtención de cepas se realizó cultivo bacteriológico de cada muestra. Las muestras digestivas se obtuvieron raspando la mucosa con hisopos de algodón, y se sembraron en placas de agar sangre Columbia, McConkey, XLD (OXOID) y se cultivaron a 37 °C en condiciones aeróbicas durante 24-48 h. Se utilizó MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania) para identificar los aislados bacterianos. Sobre estas cepas se investigó la presencia de los genes codificantes para factores de virulencia como el gen *eae*, *afr2*, *ral*, *lifA*, *paa* y para el serotipo O103, todo ello mediante PCR a tiempo real (qPCR). El proceso se inició con la extracción de los ácidos nucleicos de las distintas cepas de *E. coli* mediante un equipo automático KingFisher Flex (Thermo) y se utilizaron kits comerciales de la serie EXOone (Exopol) para la detección de cada uno de los genes descritos siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados y discusión

Los distintos perfiles de virulencia obtenidos para las cepas EPEC y no EPEC aisladas de animales enfermos se muestran en la **Tabla 1** y en la **Tabla 2** respectivamente:

Tabla 1: perfiles de virulencia de cepas EPEC de animales enfermos (n=39).

<i>eae</i>	O103	<i>afr2</i>	<i>liftA</i>	<i>ral</i>	<i>paa</i>	n° de aislamientos
+	-	-	+	+	+	19 (49%)
+	+	-	+	+	+	7 (18%)
+	-	-	+	-	-	4 (10%)
+	+	-	+	-	-	1 (2,5%)
+	-	+	-	-	+	5 (13%)
+	-	+	-	-	-	1 (2,5%)
+	-	-	+	+	-	1 (2,5%)
+	+	-	-	+	+	1 (2,5%)

Tabla 2: perfiles de virulencia de cepas no EPEC de animales enfermos (n=39).

<i>eae</i>	O103	<i>afr2</i>	<i>liftA</i>	<i>ral</i>	<i>paa</i>	n° de aislamientos
-	-	-	-	-	-	39 (100%)

La colibacilosis está considerada como la enfermedad entérica más importante en conejos (Milon, et al., 1996; Boullier et al., 2006) y está asociada con el gen *eae* así como con otras adhesinas y fimbrias (*afr2*, *liftA*, *ral*, *paa*, etc.) (Pohl et al., 1993; Blanco et al., 1996; Boullier et al., 2006). Todos los aislamientos EPEC estudiados en este trabajo, es decir, positivos al gen *eae*, también fueron positivos a al menos otro factor de colonización, y aunque se han encontrado diferentes perfiles de virulencia, el perfil positivo a *liftA*, *ral* y *paa* fue el detectado con mayor frecuencia (n=33) mientras que los aislados positivos a *afr2* fueron escasos (n=6). Estos resultados contrastan con los descritos por Dow et al., 2005 en Europa Central, que detectó en mayor proporción el factor *afr2* en cepas patógenas EPEC, mientras que *liftA* rara vez se encontró. Respecto al serotipo O103, en nuestro estudio se encontró en 12 de las cepas estudiadas, todas ellas EPEC, pero no hubo otra correlación con otros perfiles de virulencia. Estos resultados reflejan la complejidad para definir si una cepa de *E. coli* es patógena o no patógena por sus rasgos fenotípicos (por ejemplo el antígeno somático O o el biotipo) siendo necesario un análisis genético más profundo.

En el grupo de cepas no EPEC (negativas al gen *eae*), no se ha detectado ningún otro gen codificante de otros factores fimbriales ni del serotipo O103. Aunque estas cepas se aislaron de animales enfermos, según estos resultados no hay evidencias de que cepas negativas al gen *eae* puedan tener potencial patógeno en conejos de acuerdo a los factores estudiados. Podría tratarse de cepas apatógenas presentes en animales con diarrea debido a otras causas, puesto que *E. coli* es una bacteria digestiva comensal de la mayoría de mamíferos y aves. De los 35 aislados de *E. coli* que provenían de animales sanos, 27 de ellos no presentaban ninguno de los factores de virulencia estudiados, mientras que 8 aislamientos (23%) sí presentaban al menos uno de ellos (Tabla 3). Como era de esperar, en los animales sanos se detectaron mayoritariamente cepas sin los factores de virulencia estudiados. Sin embargo 8 aislamientos resultaron EPEC (portadores del gen *eae*). Este hecho podría explicarse por la presencia de animales portadores de cepas patógenas con curso asintomático o subclínico que no manifestaban diarrea en el momento del muestreo.

Tabla 3: perfiles de virulencia de cepas de animales sanos (n=35).

<i>eae</i>	O103	<i>afr2</i>	<i>liftA</i>	<i>ral</i>	<i>paa</i>	n° de aislamientos
-	-	-	-	-	-	27 (100%)
+	-	-	+	+	+	4 (50%)
+	+	-	+	+	+	3 (37,5%)
+	-	-	+	-	-	1 (12,5%)

Las cepas no enteropatógenas (no EPEC) de ambos grupos de animales, enfermos y sanos (n=39 y n=27) fueron negativas para el resto de los factores de colonización investigados así como para el serotipo O103.

Podemos concluir tras los resultados de este estudio que el gen *eae* es el mejor marcador genético utilizado para definir la cepas de *E. coli* virulentas en conejo.

Bibliografía

- Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Mora A, Balaguer L, Mourin M, Juarez A, Wim H.J. 1996. O serogroups, biotypes and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *Journal of clinical microbiology* 34 (12): 3101-3107.
- Boucher S, Leplat A. De quoi meurent les lapins d'engraissement. In *Proceedings of the Table Ronde, 11emes Journees de la Recherche Cunicole, Paris, France, 29-30 November 2005; Association Scientifique Française de Cuniculture: Paris, France.*
- Boullier S, Milon A. 2006. Rabbit Colibacillosis. In *Recent Advances in Rabbit Sciences; Maertens L, Coudert P. Eds.; Plot-it bvba: Merelbeke, Belgium; pp. 171-180.*
- Dow MA, Tóth I, Alexa P, Davies M, Malik A, Oswal E, Nagy B. 2005. Predominance of *afr2* and *ral* fimbrial genes related to those encoding the K88 and CS31A fimbrial adhesins in enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from rabbits with postweaning diarrhea in Central Europe. *J Clin Microbiol* 43: 1366-1371.
- Franzin FM, Sircili MP. 2015. Locus of Enterocyte Adhesion: A pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *BioMed Res Int* 2015, 10.
- Marlier D, Dewree R, Delleur V, Licois D, Lassence C, Poulipoulis A, Vindevogel, H. 2003. Description des principales étiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). *Ann Méd Vét* 147: 385-392.
- Milon A, Oswald E, De Rycke J. 1999. Rabbit EPEC: A model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* 30: 203-219.
- Pohl PH, Peeters JE, Jacquemin ER, Lintermans PF, Mainil JG. 1993. Identification of eae sequences in enteropathogenic *Escherichia coli* strains from rabbits. *Infect. Immunity* 61: 2203-2206.
- Peeters JE, Charlier G.J., Halen P.H. 1984a. Pathogenicity of attaching effacing enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic suckling and weanling rabbits for newborn rabbits. *Infect Immun* 46: 690-696.
- Peeters JE, Pohl P, Okerman L, Devriese LA. 1984b. Pathogenic properties of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *J Clin Microbiol.* 20(1):34-39.
- Rosell JM. 2000. *Enfermedades del conejo. Vol. 2. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.*

Diagnóstico ante-mortem y no invasivo de RHDV en conejos asintomáticos mediante el uso de qPCR y FTA cards

Ante-mortem and non-invasive diagnosis of RHDV in asymptomatic rabbits using qPCR and FTA cards

Sánchez A1, Aluart A1, Gascón S1*, Mora FX2, Valls L1

¹ HIPRA, Amer (Girona), Spain.

² Veterinario, Granollers, Spain.

*sandra.gascon@hipra.com

Resumen

El diagnóstico de la enfermedad hemorrágica del conejo se basa en la detección del virus (RHDV) en muestras post-mortem, principalmente en hígado. El objetivo de este estudio es poder realizar la detección de RHDV ante-mortem, validando el uso de la qPCR y de las tarjetas FTA en muestras de contenido intestinal. Para ello se seleccionaron 9 conejos New Zealand White infectados experimentalmente con una cepa de RHDV2. A los 15 días post-infección se obtuvieron muestras de hígado y del contenido intestinal de todos los animales, los cuales no presentaron ningún signo clínico. Todas las muestras, tanto frescas como las inoculadas en las tarjetas FTA, se analizaron por RT-qPCR. Los resultados entre las muestras frescas y las tarjetas FTA mostraron un 100% de concordancia. La positividad fue de un 100% para la muestra del hígado y del 66,67% en las de contenido intestinal. Estos resultados refuerzan el hecho de que el hígado es la muestra diana para el diagnóstico de la enfermedad y demuestran la viabilidad de usar muestras de heces para realizar un diagnóstico ante-mortem y no invasivo. Esta práctica podría contribuir a definir la presión de infección de una explotación e, indirectamente, podría ayudar a valorar el riesgo de que animales no vacunados se infecten. En conclusión, las muestras de heces podrían contribuir a mejorar el diagnóstico y control de la enfermedad hemorrágica del conejo, sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar su uso y aplicación real en granja.

Palabras clave: RHDV2, diagnóstico, heces, FTA, ante-mortem.

Abstract

The diagnosis of rabbit haemorrhagic disease is based on the detection of the virus (RHDV) in post-mortem samples, mainly in the liver. The objective of this study was to carry out the detection of RHDV ante-mortem, validating the use of qPCR and FTA cards in faecal samples. For this reason, 9 New Zealand White rabbits infected with a strain of RHDV2 were selected. At 15 days post-infection, none of the animals showed clinical signs and samples of liver and intestinal contents were obtained from all the animals. All the samples, both fresh and those inoculated on FTA cards, were analysed by RT-qPCR. There was 100% agreement between the results for the fresh samples and the FTA cards. Positivity was 100% and 66.67% for the liver and faecal samples, respectively. These results emphasise the fact that the liver is the major target for the ante-mortem diagnosis of this disease and demonstrate the feasibility of using faecal samples for ante-mortem and non-invasive diagnosis on a collective level. This methodology could contribute to defining the infection pressure of a farm and, indirectly, it could help to assess the risk of unvaccinated animals becoming infected. In conclusion, faecal samples could contribute to improving the diagnosis and control of rabbit haemorrhagic disease. However, more studies are necessary to confirm its use and real application on the farm.

Keywords: RHDV2, diagnosis, faeces, FTA, ante-mortem

Introducción

El diagnóstico de la enfermedad hemorrágica del conejo se realiza principalmente a nivel post-mortem y se basa en la detección del virus (RHDV) en muestras obtenidas durante la necropsia del animal. El hígado es el órgano diana para métodos de diagnóstico directo, ya que es el principal sitio de replicación del virus. Sin em-

bargo, el RHDV se puede detectar también en bazo, pulmones, riñones, médula ósea, corazón y timo (Lavazza *et al.*, 2021; Abrantes y Lopez, 2021). Teniendo en cuenta que actualmente circulan cepas de RHDV menos patógenas que no llegan a causar la muerte de los animales, crece la necesidad de poder realizar diagnóstico ante-mortem de la enfermedad con muestras no invasivas. Una vez infectados, los animales excretan el virus a través de secreciones nasales, suero, orina y heces (Lavazza *et al.*, 2021; Abrantes y Lopez, 2021).

En caso de un brote de RHDV, las intervenciones veterinarias incluyen la vacunación de emergencia de todos los animales, el aislamiento de los lotes afectados y el establecimiento de medidas excepcionales de contención. Sin embargo, no incluyen la determinación del momento en que el RHDV no está siendo excretado por ningún animal en la granja.

La tarjeta FTA (Flinders Technology Associates), es un papel de celulosa tratado químicamente. Cuando la muestra entra en contacto con ella, rehidrata los reactivos y estos actúan lizando las membranas celulares y los orgánulos de los microorganismos presentes, incluyendo a los patógenos. Los ácidos nucleicos son liberados e inmovilizados en el papel de manera estable, protegidos de la degradación por periodos largos de tiempo en condiciones de temperatura ambiente, baja humedad y protegidos de la luz ultravioleta. Por lo tanto, estas tarjetas son un sistema alternativo de transporte de muestras biológicas que simplifica el envío de las muestras al laboratorio garantizando la conservación del material genético a temperatura ambiente.

El objetivo de este estudio es poder realizar la detección de RHDV ante-mortem a través de RT-qPCR, utilizando tarjetas FTA en muestras del contenido intestinal.

Material y métodos

En una primera prueba de concepto para verificar la detección de RHDV mediante PCR en muestras de contenido intestinal, se seleccionaron 9 conejos libres de patógenos específicos de raza New Zealand White infectados experimentalmente con una cepa de RHDV2. Ninguno de los animales presentó signos clínicos y fueron sacrificados a los 15 días post-infección. Durante la necropsia se recogieron individualmente muestras de hígado como control positivo del experimento, ya que está descrito como órgano diana para diagnóstico directo de esta enfermedad. Por otro lado, se recogieron también de forma individual muestras del contenido intestinal de todos los animales. Ambas muestras fueron fijadas en tarjetas FTA.

Todas las muestras de hígado se dividieron en dos fragmentos. La cara interna de un fragmento de cada una de las muestras se puso en contacto, mediante presión suave, con el área de inoculación de la FTA correspondiente, y se dejaron secar a temperatura ambiente un mínimo de 3h. Con los fragmentos de las muestras restantes se preparó una suspensión al 10% p/v en PBS que se conservó en condiciones de refrigeración (+4°C) hasta su posterior análisis.

En las muestras del contenido intestinal, también se realizó esta suspensión al 10% p/v en PBS y se mantuvieron 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una homogenización (vortex) durante 20s de todas las muestras. A continuación, se inoculó un volumen de 250µl de cada muestra completamente homogeneizada en las respectivas tarjetas FTA y se dejaron secar del mismo modo que con las muestras de hígado. El contenido restante se conservó a +4°C. Pasadas las 24h se realizó simultáneamente la extracción del ARN y la RT-qPCR de las muestras frescas (líquidas) y de las desecadas (fijadas en FTA), cada una mediante el protocolo correspondiente. La extracción del ARN se realizó a partir de 100µl (muestras frescas) y 1/6 parte del círculo inoculado (desecadas en FTA) utilizando el kit de extracción RNeasy minikit (Qiagen, Alemania). Finalmente, todas las muestras de ARN extraído se sometieron a amplificación utilizando primers publicados (Duarte *et al.*, 2015) con el kit Quantitect probe RT-PCR Master mix, (Qiagen, Alemania) y los resultados fueron comparados entre ellos en cuanto al valor CT (cycle threshold).

Resultados y discusión

En la **tabla 1** se muestran los resultados de los 9 animales para cada tipo de muestras. Se observó un 100% de concordancia entre los resultados obtenidos a partir de un mismo tipo de muestra, independientemente de si la muestra es fresca o desecada en tarjeta FTA. La positividad fue del 100% para las muestras del hígado y del 66,67% en la del contenido intestinal.

Tabla 1. Resultados Ct (positivo Ct ≤ 38,5) de la RT-qPCR de las muestras del contenido intestinal y hígado, incluyendo las inoculadas en las tarjetas FTA, de los 9 conejos. *Positividad del uso de cada tipo de muestra (n de muestras positivas/total de muestras).

	CONTENIDO INTESTINAL		HÍGADO	
	Muestras frescas (Ct)	Muestras desecadas en FTA (Ct)	Muestras frescas (Ct)	Muestras desecadas en FTA (Ct)
Conejo 1	Negativo	Negativo	33,4	34
Conejo 2	29	28,5	29,1	30
Conejo 3	34,9	34,1	31,2	32,1
Conejo 4	Negativo	Negativo	28,2	29,3
Conejo 5	Negativo	Negativo	30,1	30,3
Conejo 6	34	34,3	31,8	32
Conejo 7	33,5	34,5	26,6	29
Conejo 8	32,1	30,4	29,3	29,6
Conejo 9	33,5	31,6	27,8	28,5
Positividad*	66,67%	66,67%	100%	100%

Los resultados obtenidos demuestran una buena optimización de la metodología FTA para la RT-qPCR de RHDV2. Por lo que se puede considerar como una alternativa al uso de muestras frescas, tanto de hígado como del contenido intestinal.

Respecto a las muestras del contenido intestinal, la interpretación de los resultados se puede realizar desde 2 puntos de vista: individual o colectivo. En el primer caso, una sensibilidad inferior al 70% nos sugiere que este tipo de muestra no se debería considerar para detectar RHDV2. Sin embargo, desde un punto de vista colectivo, podría ayudarnos a definir en qué momento los animales que sobreviven a un brote de RHDV2 dejan de excretar virus al ambiente. Por lo tanto, podría contribuir a definir la presión de infección de una explotación y, indirectamente, podría ayudar a valorar el momento en el que el riesgo de que animales no vacunados se infecten es bajo.

En conclusión, aunque los resultados de este estudio son prometedores y sugieren que desde un punto de vista colectivo, las muestras de heces podrían contribuir a mejorar el diagnóstico y control de la enfermedad hemorrágica del conejo, son necesarios más estudios para confirmar su uso y aplicación real en granja.

Agradecimientos

A CEYC por la cesión de muestras y al staff técnico de DIAGNOS (Laboratorio de diagnóstico de HIPRA) por la realización de las analíticas.

Bibliografía

- Abrantes J, Lopes A.M. 2021. A Review on the Methods Used for the Detection and Diagnosis of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). *Microorganisms*, 9, 972.
- Lavazza A.; Capucci, L. Chapter 3.6.2.—Rabbit haemorrhagic disease. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021*; OIE: Paris, France, 2021; pp. 1389-1406.
- Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, Henriques AM, Ramos F, Fagulha T, Luis T, Duarte EL, Fevereiro M. 2015. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J Virol Methods* 219: 90-95.

BIENESTAR

Evaluación del estrés con termografía de infrarrojos tras la extracción espermática en conejos

Serrano-Jara D, Baeza M, Agea I, Argente MJ, García ML

Enriquecimiento de jaulas de gazapos en cebo con rama de árbol: resultados productivos y de interacción humano-animal

Resconi VC, López M, Olleta JL, Romero JV, Campo MM

Evaluación del estrés con termografía de infrarrojos tras la extracción espermática en conejos

Stress assessment by infrared thermography after sperm extraction in rabbits

Serrano-Jara D, Baeza M, Agea I, Argente MJ, García ML*

¹Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández de Elche, 03312 Orihuela, España.

*mariluz.garcia@umh.es

Resumen:

El presente trabajo estudió la evolución de la temperatura corporal medida TIR de 20 conejos machos, tras la exposición a un estímulo de estrés agudo basado en un proceso rutinario de manejo como la extracción espermática. La temperatura fue medida en el globo ocular y la nariz en 15 momentos por animal y región anatómica distribuidos en 90 minutos. La primera extracción se realizó tras medir la temperatura basal en el minuto 0 y la segunda extracción después del minuto 30. La duración del experimento fue de 6 semanas. La temperatura basal en el globo ocular y nariz fue de $36,20 \pm 0,15^\circ\text{C}$ y $32,85 \pm 0,30^\circ\text{C}$, respectivamente. Tras la primera extracción, la temperatura experimentó un incremento en el minuto 1 tanto en el globo ocular ($36,49 \pm 0,15^\circ\text{C}$) como en la nariz ($34,20 \pm 0,28^\circ\text{C}$); tras la segunda, el valor máximo se localizó en el minuto 35 ($36,46 \pm 0,15^\circ\text{C}$) en el globo ocular y 31 ($34,95 \pm 0,27^\circ\text{C}$) en la nariz. En ambos casos la estabilización se produjo en el minuto 50. En conclusión, la TIR mostró ser un método adecuado para valorar la evolución térmica de la superficie corporal en animales expuestos a un estímulo de estrés agudo. Asimismo, ambas regiones anatómicas fueron localizaciones propicias para realizar la valoración.

Palabras clave: conejo, estrés, temperatura, termografía.

Abstract:

The present research learned the evolution of the body temperature measured by IRT of 20 male rabbits, after exposure to an acute stress stimulus based on a routine management process such as sperm extraction. Temperature was measured in the eyeball and nose at 15 moments per animal and anatomical region distributed over 90 minutes. The first extraction was performed after measured basal temperature at minute 0 and the second extraction was after minute 30. The experiment lasted 6 weeks. Basal temperature in the eyeball and nose was $36.20 \pm 0.15^\circ\text{C}$ and $32.85 \pm 0.30^\circ\text{C}$, respectively. After the first extraction, the temperature increased at minute 1 both in the eyeball ($36.49 \pm 0.15^\circ\text{C}$) and in the nose ($34.20 \pm 0.28^\circ\text{C}$); after the second extraction, the maximum value was at minute 35 ($36.46 \pm 0.15^\circ\text{C}$) in the eyeball and 31 ($34.95 \pm 0.27^\circ\text{C}$) in the nose. In both cases, stabilization took place at minute 50. In conclusion, the IRT could be an adequate method to evaluate the thermal evolution of the body surface in animals exposed to an acute stress stimulus. Likewise, both anatomical regions were propitious locations to carry out the assessment.

Keywords: rabbit, stress, temperature, thermography.

Introducción

El avance científico-técnico en la producción animal ha permitido ampliar el concepto de bienestar animal durante las últimas décadas. Palumbo *et al.* (2020) definieron el estrés como cualquier situación capaz de perturbar la homeostasis fisiológica o psicológica. Por su parte, Luthar *et al.* (2000) definieron la resiliencia como un proceso de desarrollo dinámico que abarca la capacidad de un individuo para adaptarse positivamente después de una adversidad significativa. Sin embargo, esta aptitud no es similar en todos los animales (Broom, 2011) y una respuesta inadecuada ante un estímulo estresante puede desembocar en el empeoramiento de las condiciones de bienestar y, consecuentemente, en la disminución del rendimiento productivo (Kowalska *et al.*, 2011).

La temperatura corporal es utilizada como un parámetro de gran interés para valorar la respuesta al estrés en un animal (Stewart *et al.*, 2005). La termografía infrarroja (TIR) constituye un método no invasivo capaz de detectar satisfactoriamente la temperatura de la superficie corporal (Ludwig *et al.*, 2007; McCafferty, 2013). En el conejo, la TIR ha sido utilizada para la medición de la temperatura corporal tras la exposición a situaciones de estrés agudo relacionadas con el manejo en gazapos de engorde (Jaén-Téllez *et al.*, 2020) y en hembras (Agea *et al.*, 2022).

El objetivo del presente estudio ha consistido en analizar la variación de temperatura corporal en el conejo tras un procedimiento rutinario de estrés agudo como la extracción espermática.

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 2022/VSC/PEA/0226.

1. Desarrollo experimental

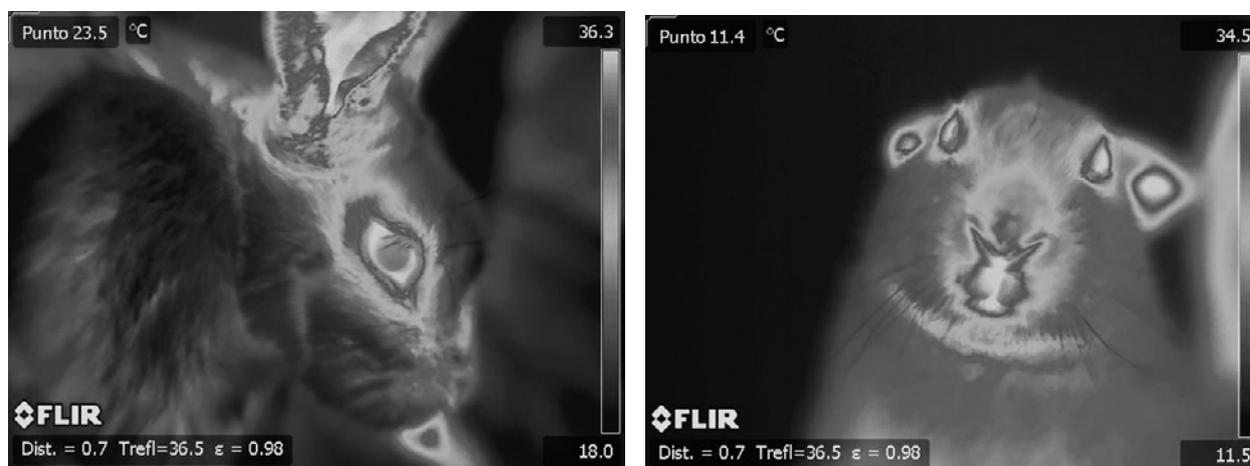
El estudio se desarrolló en la granja de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela de la Universidad Miguel Hernández. Las instalaciones utilizadas fueron de ambiente controlado, fotoperiodo de 16:8 y alimentación ad libitum con un pienso comercial.

Se utilizaron un total de 20 machos pertenecientes a la 17ª generación de un experimento de selección divergente por variabilidad de tamaño de camada (Blasco *et al.*, 2017). El rango de edad de los animales se encontró entre 4,5 y 6 meses. El peso medio durante el desarrollo experimental fue de 3,09 Kg.

Se midió la emisividad de la temperatura corporal mediante la TIR en el globo ocular y la nariz. Las imágenes fueron obtenidas mediante una cámara termográfica @FLIR SC660 y se procesaron con el software @Therma-CAM Researcher Pro 2.10 para obtener el registro de temperatura (**Figura 1**). La cámara fue calibrada según la temperatura, la humedad relativa, la emisividad y la distancia con respecto al sujeto.

La toma de datos se realizó durante 6 semanas y las mediciones se llevaron a cabo en 15 momentos distribuidos a lo largo de 90 minutos (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 50, 60, 70, 90 minutos) en cada región anatómica. Durante la toma de muestras los conejos fueron sujetados durante aproximadamente 1 minuto. La extracción espermática se realizó en dos ocasiones: la primera tuvo lugar tras medir la temperatura basal en el minuto 0 y la segunda después del minuto 30.

Figura 1. Imágenes del globo ocular y nariz tomadas con la cámara termográfica @FLIR SC660.



2. Análisis estadístico

El modelo utilizado para analizar la temperatura en el globo ocular y la nariz incluyó los efectos de línea con dos niveles y de semana con seis niveles, junto con el animal como efecto aleatorio y su peso como covariable. Se utilizó el programa Rabbit desarrollado por la Universidad Politécnica de Valencia.

Resultados y discusión

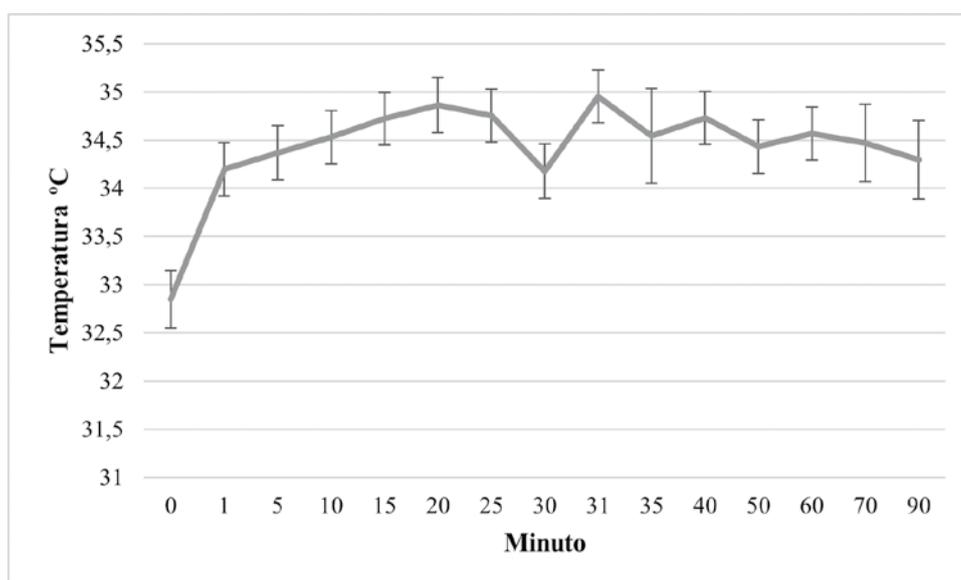
En el globo ocular (**Figura 2**), la temperatura basal fue de $36,20 \pm 0,15^\circ\text{C}$. Tras la primera y segunda extracción espermática se observó un aumento brusco de temperatura, siendo la probabilidad (P) de que la diferencia entre estos momentos menor de 0 de 0,99. En el minuto 1 la temperatura alcanzó los $36,49 \pm 0,15^\circ\text{C}$, correspondiéndose con la temperatura máxima observada en esta región anatómica. En el minuto 31 la temperatura alcanzó los $36,31 \pm 0,15^\circ\text{C}$. Este efecto coincide con el aumento de temperatura corporal que tiene lugar por una mayor presencia glóbulos rojos en el torrente sanguíneo debido a la acción indirecta de la liberación de adrenalina y noradrenalina (catecolaminas) por parte de la corteza suprarrenal, ante la presencia de un estímulo estresante (Axelrod y Reisine, 1984; Cunningham, 1999).

En el caso de la segunda extracción, el aumento de temperatura se sostuvo hasta el minuto 35 ($36,46 \pm 0,15^\circ\text{C}$), aunque no se observó una diferencia relevante con respecto al minuto 31 ($P = 0,70$). Este resultado concuerda con el brusco incremento de la temperatura a los 5 minutos después de un estímulo estresante producido por la monta, en las hembras de la línea seleccionada por homogeneidad en tamaño de camada encontrado por Agea *et al.* (2022).

Entre el minuto 1 y 5 ($36,13 \pm 0,15^\circ\text{C}$) se produjo un descenso brusco de temperatura ($P = 0,99$). Este suceso puede deberse a que las catecolaminas tienen una vida media en el torrente sanguíneo de unos pocos minutos (Peaston y Weinkove, 2004). Además, a partir del minuto se produce un aumento progresivo de corticoesterona (Gascón y Arribas, 1987) dando lugar a un descenso de la temperatura.

Finalmente, en el minuto 50 ($36,20 \pm 0,14^\circ\text{C}$) se produjo un descenso ($P = 0,91$) hasta valores similares a los de la temperatura basal. Mientras que tras la primera extracción la estabilización frente al estímulo de estrés agudo se produjo rápidamente, en la segunda se prolongó hasta los 20 minutos. Esta evolución podría indicar que la fase de estrés agudo tras un segundo estímulo estresante se prolonga cuando tiene lugar en un periodo de tiempo reducido.

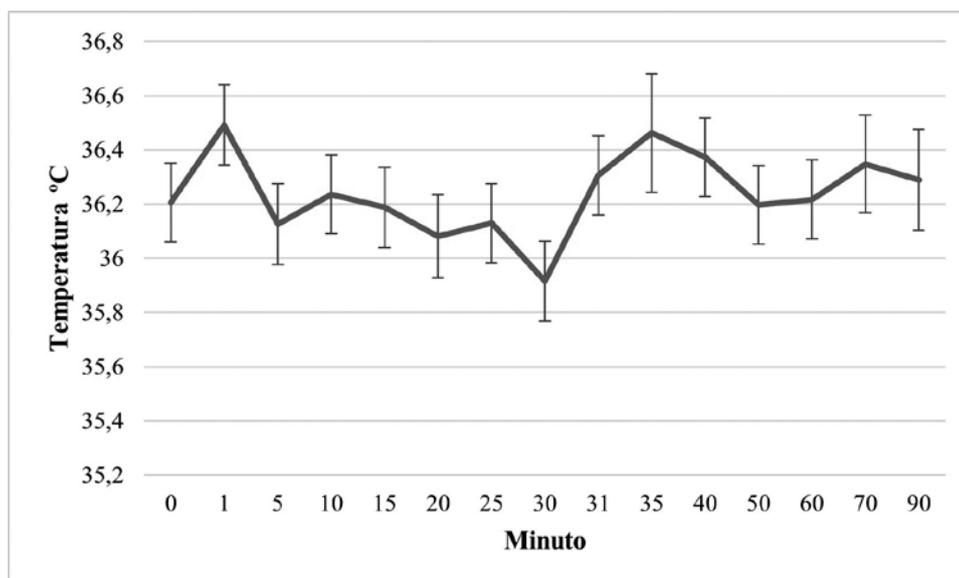
Figura 2. Evolución de la temperatura del globo ocular. Las barras verticales indican el valor de la desviación estándar.



En la nariz (**Figura 3**), la temperatura basal fue de $32,85 \pm 0,30^\circ\text{C}$. En consonancia con lo descrito anteriormente, en el minuto 1 se produjo un aumento brusco de temperatura ($34,20 \pm 0,28^\circ\text{C}$; $P = 1$). Sin embargo, en la pre-

sente región anatómica se observó un nuevo ascenso relevante en el minuto 20 ($34,86 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$) con respecto al minuto 1 ($P = 0,98$). En el minuto 30, al igual que en el globo ocular, tuvo lugar un marcado descenso de la temperatura ($34,17 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$, $P = 0,98$), para posteriormente volver a ascender en el minuto 31 ($34,95 \pm 0,27$; $P = 0,99$), tras haber realizado la segunda extracción espermática. Por último, de forma similar a lo observado anteriormente, el descenso de la temperatura se localizó en el minuto 50 ($34,43 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$; $P = 0,94$).

Figura 3. Evolución de la temperatura nasal. Las barras verticales indican el valor de la desviación estándar.



En términos generales se observa un patrón similar al descrito en el globo ocular. Sin embargo, la menor temperatura registrada, así como la diferencia descrita en el primer periodo tras la primera extracción, podría deberse, tal y como señalaron (Luzi et al., 2007), a la influencia que ejerce la temperatura ambiente sobre la TIR en la región nasal.

En conclusión, tanto la TIR realizada sobre el globo ocular y la nariz se muestra como herramienta adecuada para la valoración de los cambios de temperatura promovidos por la exposición a un estímulo de estrés agudo. Asimismo, ambas regiones anatómicas fueron localizaciones propicias para realizar la valoración.

Agradecimientos:

Este estudio forma parte del programa AGROALNEXT y ha sido financiado por MCIN con fondos de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y por la Generalitat Valenciana.

Bibliografía

- Agea I, Hadjadj I, García ML, Argente MJ. 2002. Selección por variabilidad ambiental del tamaño de camada. II: Emisividad de la temperatura corporal. En: 46th Symposium de Cunicultura: Asociación Española de Cunicultura. Barcelona, España, pp. 27-31.
- Axelrod J, Reisine TD. 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224(4648): 452-459.
- Blasco A, Martínez-Álvaro M, García ML, Ibáñez-Escriche N, Argente MJ. 2017. Selection for environmental variance of litter size in rabbits. *Genet Sel* 49(1): 1-8.
- Broom DM. 2011. Animal welfare: concepts, study methods and indicators. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 24(3): 306-321.
- Cunningham J. 1999. *Fisiología veterinaria*. Interamericana, Ciudad de Mexico, Mexico.

- Gascón FM, Arribas MTV. 1987. Efecto estresante de la manipulación en el conejo En: 12th Symposium de Cunicultura: Asociación Española de Cunicultura. Guadalajara, España, pp. 125-132.
- Jaén-Téllez JA, Sánchez-Guerrero MJ, López-Campos JI, Valera M, González-Redondo P. 2020. Acute stress assessment using infrared thermography in fattening rabbits reacting to handling under winter and summer conditions. *Spanish Journal of Agricultural Research* 18(2): e0502-e0502.
- Kowalska D, Gugolek A, Bielanski P. 2011. Effect of stress on rabbit meat quality. *Ann Anim Sci* 11(3): 465-475.
- Ludwig N, Gargano M, Luzi F, Carezzi C, Verga M. 2007. Technical note: applicability of infrared thermography as a non invasive measurement of stress in rabbit. *World Rabbit Sci* 15(4): 199-206.
- Luthar SS, Cicchetti D, Becker B. 2000. The construct of resilience: A critical evaluation and guidelines for future work. *Child Dev* 71(3), 543-562.
- Luzi F, Ludwig N, Monzani M, Gargano M, Ricci C, Redaelli V, Verga M. 2007. Procedures for analyses of sequence of thermal images in welfare study of rabbit. En: 4th. International Workshop on the Assessment of Animal Welfare at Farm and Group Level (WAFL). Ghent, Bélgica, pp. 10-13.
- McCafferty DJ. 2013. Applications of thermal imaging in avian science. *Ibis*, 155(1): 4-15.
- Palumbo ML, Prochnik A, Wald MR, Genaro AM. 2020. Chronic stress and glucocorticoid receptor resistance in asthma. *Clin Ther* 42(6): 993-1006.
- Peaston RT, Weinkove C. 2004. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem* 41(1): 17-38.
- Stewart M, Webster JR, Schaefer AL, Cook NJ, Scott SL. 2005. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. *Anim Welf* 14(4): 319-325.

Enriquecimiento de jaulas de gazapos en cebo con rama de árbol: resultados productivos y de interacción humano-animal

Enrichment of fattening rabbit cages with tree branch: productive and human-animal interaction results

Resconi VC*, López M, Olleta JL, Romero JV, Campo MM

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, c/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España. *resconi@unizar.es

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto del enriquecimiento de jaulas, con una rama de árbol fijada a la pared lateral, sobre la mortalidad, la productividad y el comportamiento de gazapos de cebo. El estudio se realizó en una granja comercial en dos épocas del año, utilizando un total de 448 gazapos destetados a los 35 días, alojados en grupos mixtos de ocho animales compañeros de camada desde la lactación. No se observaron diferencias significativas en la mortalidad, el peso vivo, el consumo de pienso ni en la eficiencia de conversión entre los dos tipos de jaulas, aunque sí se apreció una menor ganancia de peso diario en el periodo 56 a 63 días en las jaulas enriquecidas en comparación con las convencionales (37,1 g/d vs. 40,2 g/d, respectivamente). En la prueba de aproximación humana no se observó una mejora con la inclusión de la rama de árbol en las jaulas, aunque sí con el avance de la edad de los gazapos, ya que fue aumentando el porcentaje de animales dentro de la jaula que se acercaban a la mano, siendo en promedio 51% a los 63 d y 35% a los 42 d. En verano, tanto los parámetros productivos como la prueba de comportamiento mostraron resultados más desfavorables, que se asociaron a las condiciones ambientales y sanitarias. Por otro lado, el sexo no afectó a los parámetros productivos estudiados. De modo general, los resultados de este trabajo no muestran un beneficio por incluir una rama de árbol en las jaulas de cebo, si bien tampoco se detectaron efectos perjudiciales significativos. Se requiere de estudios a mayor escala antes de recomendar la inclusión de material para roer en España, principalmente ante escenarios futuros donde la edad de sacrificio, el número de animales por grupo y el riesgo sanitario pudiesen incrementarse.

Palabras clave: bienestar animal, jaula enriquecida, comportamiento, roer, madera

Abstract

This study evaluated the effect of enriching cages with a tree branch attached to the side wall on mortality, productivity and behaviour of fattening rabbits. The study was conducted on a commercial farm at two times of the year, using a total of 448 rabbits weaned at 35 days of age, housed in mixed groups of eight littermates since lactation. No significant differences were observed in mortality, liveweight, feed intake and feed conversion efficiency between the two types of cages, although there was a lower daily weight gain in the period 56 to 63 days in the enriched cages compared to the conventional ones (37.1 g/d vs. 40.2 g/d, respectively). In the human-approach test, no improvement was observed with the inclusion of tree branch in the cages, although it was observed with the advancement of the age of the fattening rabbits, since the percentage of animals inside the cage that approached the hand increased, being on average 51% at 63 d and 35% at 42 d. In summer, both productive parameters and the behavioural test showed more unfavourable results, which were associated with environmental and sanitary conditions. On the other hand, sex did not affect the production parameters studied. Overall, the results of this work do not show a benefit of including a tree branch in the fattening cages, although no significant detrimental effects were detected. Larger scale studies are required before recommending the inclusion of gnawing material in Spain, mainly in view of future scenarios where slaughter age, number of animals per group and health risk could increase.

Keywords: animal welfare, enriched cage, behavior, gnaw, wood

Introducción

Roer es una actividad que se considera importante en el conejo. En el animal de compañía se sugiere que proveer material adecuado para roer disminuye el riesgo de patologías dentales (Palma-Medel *et al.*, 2023). En bibliografía relacionada con el conejo de granja no se señala esa "necesidad" aunque sí se propone incluirlo para evitar comportamientos indeseados, como estereotipias y agresiones, y para favorecer otros positivos (EFSA, 2020). Dado que el conejo silvestre realiza esta actividad se considera que el doméstico debería tener oportunidad de llevarla a cabo. Los animales muestran interés por el material para roer en las jaulas (Princz *et al.*, 2008) y además de roer, les permite olfatear, lamer, entretenerse, moverse y quizás saciar el hambre o necesidades nutritivas, si bien se encuentran discrepancias entre distintos autores (EFSA, 2020). Recientemente, un estudio mostró que incluir un bloque de heno favorece la respuesta activa y positiva ante la exposición a otros objetos y ambientes novedosos, lo que implica una mejora del bienestar animal según Birolo *et al.* (2022).

Por los motivos señalados, en algunos países se exige o se sugiere la inclusión de material para roer en granja. Sin embargo, se deben considerar repercusiones en la sanidad y los parámetros productivos en condiciones comerciales (López *et al.*, 2021), además del coste y necesidad de mano de obra. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del enriquecimiento de jaulas de cebo con una rama de árbol (laurel u olivo) sobre los parámetros productivos y la interacción humano-animal en una granja comercial española en dos épocas del año.

Material y métodos

Se controló el cebo de gazapos en verano de 2021 y en primavera de 2022 en la granja Campanales Balaguer Agrícola SL (Fabara, Zaragoza). Durante la temporada estival, se utilizaron 32 camadas, procedentes de dos bandadas, una destetada el 28 de junio y la otra el 5 de julio. El seguimiento en primavera fue de 24 camadas de una banda desde el 7 de marzo. Una vez destetados a los 35 d, ocho gazapos procedentes de la misma jaula-madre se ubicaron juntos en una jaula de cebo (50 x 85 cm). El pesaje fue individual ($N=448$) tras identificación con rotulador en la oreja, mientras que el consumo de pienso se determinó por jaula ($N=56$), datos registrados una vez por semana hasta los 63 d de edad. De manera alternada, la mitad de las jaulas disponían de un trozo de rama de árbol sujeto en un lateral: de laurel en verano y de olivo en primavera. A partir de los 42 d de edad, antes de pesar los gazapos, se abría con cuidado la jaula, se colocaba la mano durante 20 s y se contaban los animales que se acercaban, permanecían indiferentes, se alejaban o agredían (test de aproximación).

En cada época se utilizaron naves distintas, ambas con ventilación e iluminación natural. Los gazapos provenían del cruce a tres vías con línea cárnica parda (Granja Jordán, Fabara, Zaragoza). La alimentación programada consistía en: 1) pienso de transición (21-35 d); 2) post-destete (35-49 d); y 3) de acabado (49 d-sacrificio). Sin embargo, por problemas digestivos, en verano el pienso post-destete se medicó con antibiótico y su administración se prolongó una semana.

Se evaluaron los efectos enriquecimiento y estación sobre la mortalidad mediante chi-cuadrado. Se efectuaron, además, ANOVAs para cada semana y el periodo total para el consumo de pienso y el índice de conversión, considerando el enriquecimiento, la estación y sus interacciones como efectos fijos. Para el peso vivo y la ganancia de peso se añadió un efecto principal adicional (el sexo de los gazapos). Con los datos del test de aproximación se utilizó la prueba de Mann-Whitney para evaluar el efecto del enriquecimiento y la estación, y las pruebas de Friedman y de Wilcoxon para la edad. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS 26.0.

Resultados y discusión

No se detectaron diferencias significativas ($P=0,475$) en el porcentaje de mortalidad hasta los 63 d en jaulas con (8,5%) o sin rama (6,7%) en los 224 animales por tratamiento, cebados en época con baja mortalidad (primavera) y en verano, donde problemas digestivos provocaron una alta tasa de mortalidad ($P<0,001$, **Tabla 1**). En otro estudio, la inclusión de material para roer en parques con 16 gazapos tampoco mostró efecto en la salud y mortalidad ($n=144$, Birolo *et al.*, 2022). Sin embargo, evaluando un mayor número de animales ($n=264$) afectados por enterocolitis, otro estudio detectó una mortalidad más elevada (20%) a partir de los 68 d asociado a un taco de abeto de Douglas fijada en la pared de la jaula, comparado con jaulas con heno de forraje o sin material para roer (13%) (Mirabito *et al.*, 2000). La alta variabilidad de la mortalidad implica que para comprobar estadísticamente diferencias de menos del 5% se requieren más animales que los utilizados en nuestro estudio (Gidenne *et al.*, 2020).

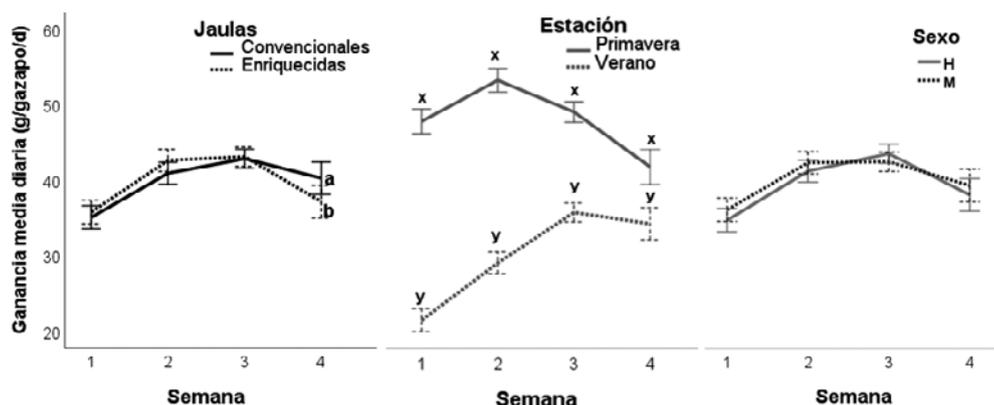
Tabla 1. Variables productivas durante el cebo de gazapos alojados en jaulas convencionales (Conv) o enriquecidas (Enriq) con rama de árbol

Variable	Conv	Enriq	Verano	Primavera	Hembra	Macho
Mortalidad (%)	6,7	8,5	12,1 x	1,6 y		
Peso vivo 35 d (g)	823	813	725 y	911 x	816	820
Peso vivo 63 d (g)	1936	1922	1593 y	2266 x	1918	1941
GMD ¹	39,94	39,64	31,19 y	48,38 x	39,43	40,14
Consumo ²	146,2	144,8	103,8 y	187,2 x		
IC ³	3,64	3,61	3,36 y	3,88 x		

¹ Ganancia media diaria (g/gazapo/d). ² Consumo de pienso (g/gazapo/día). ³ Índice de conversión: kg de pienso / kg de peso vivo. x, y: medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre época del año ($P<0,05$).

El enriquecimiento de la jaula no mostró un efecto significativo sobre el peso vivo en ninguna semana de medición ni sobre el crecimiento diario durante todo el periodo considerado (Tabla 1), aunque los animales en jaulas con rama crecieron menos durante la cuarta semana (56-63 d, Figura 1): 37,1 g/d frente a 40,2 g/d en jaulas convencionales ($P=0,049$). Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de pienso ni en la eficiencia de conversión (Tabla 1).

En el estudio de Birolo *et al.* (2022), por el contrario, la ganancia media diaria fue unos 2 g/d superior en el periodo 31-52 d de edad, que implicó 55 g más peso vivo al sacrificio (73 d) en los parques enriquecidos, sin observarse efecto en el consumo de pienso ni en la conversión alimentaria; mientras que Mirabito *et al.* (2000) no encontraron efecto en la ganancia de peso ni en el consumo de pienso por el enriquecimiento de las jaulas. El efecto sobre parámetros productivos de la inclusión de material de roer depende de varios factores, como el tipo de material, su localización, de si se cubren o no las necesidades nutritivas con el pienso (López *et al.*, 2021) y, probablemente, de cómo repercute sobre otros aspectos de bienestar animal.

Figura 1. Ganancia media diaria durante el cebo de gazapos en jaulas con rama o no, en verano y primavera, y en hembras y machos.

En nuestro estudio, el efecto de la estación del año fue marcado en todas las variables productivas evaluadas (Tabla 1), partiendo de un mayor peso en primavera los gazapos recién destetados y de que durante el cebo crecieron más, consumieron más pienso y presentaron una peor eficiencia de conversión ($P<0,001$). La Figura 1 muestra cómo las diferencias en ganancia de peso entre las dos épocas disminuían a lo largo de las semanas en cebo. El mayor calor en verano, los problemas sanitarios y el peso de los animales explican estos efectos. Tam-

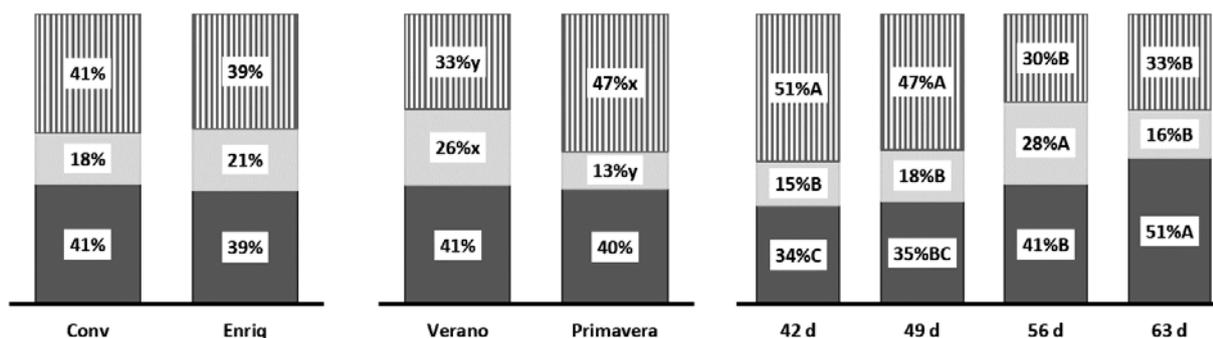
poco se encontró efecto del sexo en ninguno de los parámetros estudiados. Todos estos resultados concuerdan con estudios anteriores, como Feki et al. (1996).

En este trabajo se evaluó también uno de los criterios del comportamiento animal, la relación humano-animal, que se puede considerar positiva si un animal se acerca y negativa si tiene miedo o agrede (EFSA, 2020). Una mejor relación disminuiría el estrés, facilitaría el manejo, evitaría lesiones y, quizás, problemas de calidad del producto. No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de animales que se acercaban, alejaban o permanecían indiferentes a la introducción de la mano en jaulas enriquecidas o convencionales (Figura 2). Birolo et al. (2022) tampoco encontraron que la presencia de bloques de heno afectase al porcentaje de animales de 67 d que se acercaban a la mano de un sujeto desconocido.

A su vez, nuestro estudio muestra que el porcentaje de animales que se acercan a la mano aumenta con la edad ($P<0,001$), si bien no se puede excluir el hecho de que los gazapos se hayan ido habituando al contacto humano (Figura 2). Aunque el estudio difiere en el tipo de alojamiento y edades comparadas, nuestros resultados contradicen los de Trocino et al. (2018), quienes encuentran que se acerca un menor porcentaje de animales de 77-84 respecto a 40 d de edad (27% vs. 44%, respectivamente). Los autores sugieren que a mayor edad podrían tener una menor motivación para la exploración.

En verano, una mayor proporción de animales se alejaban ($P<0,001$), intentando huir y esconderse; mientras que en primavera una mayor proporción se mostraban indiferentes ($P<0,001$), permaneciendo constante el porcentaje de los que se acercaban ($P=0,728$). Fétiveau et al. (2021) sugieren que ante un mayor nivel de estímulos externos los animales se muestran más miedosos. En nuestro trabajo, además del posible mayor estrés de los animales en verano debido a las temperaturas y patología presente, se percibían más estímulos externos, tanto visuales como auditivos en comparación con la nave de primavera, lo que pudo influir sobre los resultados encontrados. Por último, la huella en la piel de la rama indica un mayor uso de la rama de olivo en primavera en comparación a la de laurel en verano, que puede deberse a la diferente especie arbórea o a un menor interés en los animales más estresados en verano. Estudios anteriores indican que el grosor de la rama o palo, la dureza, especie arbórea y ubicación en la jaula, pueden implicar diferencias en el interés y la persistencia de ese interés por parte de los animales (López et al., 2021; Birolo et al., 2022).

Figura 2 Gazapos que se acercaban ■, alejaban ■ o eran indiferentes ■ al humano (%), en jaulas convencionales o enriquecidas con rama de árbol, en dos épocas del año y diferente edad



De acuerdo con los aspectos sanitarios, productivos, y de comportamiento valorados, no se muestran beneficios ni perjuicios significativos por incluir una rama en las jaulas de cebo.

Agradecimientos

Proyecto financiado por el Gobierno de Aragón (PDR GCP2019003700).

Bibliografía

- Birolo M, Trocino A, Zuffellato A, Pirrone F, Bordignon F, Xiccato G. 2022. Use of gnawing hay blocks: effects on productive performance, behavior and reactivity of growing rabbits kept in parks with different sex-group compositions. *Animals* 12(1212):1-15.
- EFSA. Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) et al. 2020. Health and welfare of rabbits farmed in different production systems. *EFSA journal* 18(1):e05944.
- Feki S, Baselga M, Blas E, Cervera C, Gómez EA. 1996. Comparison of growth and feed efficiency among rabbit lines selected for different objectives. *Livest Prod Sci* 45(1): 87-92.
- Fetiveau M, Savietto D, Gidenne T, Pujol S, Aymard P, Fortun-Lamothe L. 2021. Effect of access to outdoor grazing and stocking density on space and pasture use, behaviour, reactivity, and growth traits of weaned rabbits. *Animal* 15(9):100334.
- Gidenne T, Lebas F, Licois D, García J. 2020. Nutrition and feeding strategy: impacts on health status. En *Nutrition of the Rabbit* (pp. 193-221). Wallingford UK: CAB International.
- López M, Cervera C, Pascual JJ. 2021. Bienestar y resultados zootécnicos en conejos de carne durante su lactancia y engorde. Revisión bibliográfica. *ITEA* 117(2):108-129.
- Mirabito L, Galliot P, Souchet C. 2000. Effect of different ways of cage enrichment on the productive traits and mortality of fattening rabbits. En: *7th World Rabbit Congress*, pp. 447-452.
- Palma-Medel T, Marcone D, Alegría-Morán R. 2023. Dental Disease in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and Its Risk Factors. *Animals* 13(4):676.
- Princz Z et al. 2008. Behaviour of growing rabbits under various housing conditions. *Appl Anim Behav Sci* 111:342-356.
- Trocino A, Filiou E, Zomeño C, Birolo M, Bertotto D, Xiccato G. 2018. Behaviour and reactivity of female and male rabbits housed in collective pens: effects of floor type and stocking density at different ages. *World Rabbit Sci* 26(2):135-147.

PRODUCTOS

Comparación de la aceptación y preferencia de salchichas frescas de carne de conejo, pollo y cerdo en un panel de consumidores jóvenes

Fierro-Raya M, González-Redondo P

Comparación de la aceptación y preferencia de salchichas frescas de carne de conejo, pollo y cerdo en un panel de consumidores jóvenes

Comparison of the acceptance and preference of fresh rabbit, chicken and pork sausages by young consumers

Fierro-Raya M, González-Redondo P*

Departamento de Agronomía, ETS de Ingeniería Agronómica, Universidad de Sevilla, 41013 Sevilla, España.

**pedro@us.es*

Resumen

Se comparó la aceptación de las características organolépticas (escala hedónica de 1 a 9 puntos) y el orden de preferencia (1º a 3º lugar) de salchichas frescas comerciales de carne de conejo, de cerdo y de pollo mediante un panel no entrenado de 70 consumidores jóvenes. La valoración del olor y de la apariencia no difirió entre tipos de salchichas. El color y la elasticidad de las salchichas de conejo y de pollo se valoraron al mismo nivel, y mejor que las de cerdo. La jugosidad se valoró mejor en la salchicha de pollo, a continuación en la de conejo y en último lugar en la de cerdo. Los jóvenes valoraron mejor la textura, el sabor y aceptación global en la salchicha de pollo que en la de cerdo, con la de conejo intermedia, sin diferencia por un lado con la de pollo y por otro con la de cerdo. La textura, sabor, elasticidad, jugosidad y aceptación global de las salchichas se valoraron mejor por los hombres que por las mujeres. Las salchichas de pollo se prefirieron en primer lugar, con diferencia sobre las de cerdo, quedando las de conejo en posición intermedia, sin diferencia con cada una de las otras. En conclusión, las salchichas de conejo se valoran bien, al nivel de las de pollo y mejor que las de cerdo, teniendo potencial para propiciar el consumo de esta carne en jóvenes.

Palabras clave: conejo, carne, salchichas, productos transformados, consumidores.

Abstract

The acceptance of organoleptic characteristics (hedonic scale: 1 to 9 points) and order of preference (1st to 3rd position) of rabbit, pork and chicken fresh sausages was compared by means of an untrained panel of 70 young consumers. The evaluation of the smell and appearance by the panelists did not differ between types of sausages. The color and elasticity of rabbit and chicken sausages were rated at the same level, and better than those of pork. The juiciness was valued better in the chicken sausage, followed by the rabbit and lastly in the pork sausages. Young people valued the texture, flavor and overall acceptance of chicken sausage better than pork sausage, with rabbit sausage being intermediate with no difference on the one hand with the chicken sausage and on the other with the pork sausage. The texture, flavor, elasticity, juiciness and the global acceptance of the sausages were better valued by men than women. Chicken sausages were preferred in first place, with a difference over pork, and rabbit sausages being in the middle position without difference with each of the others. In conclusion, rabbit sausages were valued well, at the level of chicken and better than pork sausages, showing potential to expand rabbit meat consumption in young people.

Keywords: rabbit, meat, sausage, processed products, consumers.

Introducción

El consumo de carne de conejo, tradicional de la dieta mediterránea, ha disminuido en España en las últimas décadas (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021). A esta caída del consumo han contribuido, entre otros factores, los cambios en el estilo de vida y en los hábitos de consumo que propician que se dedi-

que menos tiempo a cocinar platos tradicionales y elaborados en el hogar (Montero, 2015), los cambios en los hábitos laborales y en la estructura familiar (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2006) y la creciente pérdida de contacto y menor apetencia por las características organolépticas de una parte de los consumidores, sobre todo jóvenes, por la carne de conejo (González-Redondo *et al.*, 2010; Montero, 2015), concentrándose su consumo prevalentemente entre los consumidores tradicionales de mayor edad (Escribá-Pérez *et al.*, 2017).

Ante este panorama parte de las propuestas del sector transformador para retener y dirigir consumidores hacia la carne de conejo consisten en comercializar presentaciones alternativas a la canal entera, como son los despieces y los transformados como hamburguesas y salchichas (ASESCU, 1996; De Santos, 2019). Son presentaciones que facilitan el cocinado y algunas, como las hamburguesas y salchichas, resultan más atractivas para los consumidores de menor edad por estar familiarizados con su consumo cuando están elaboradas con otras carnes (Escribá-Pérez *et al.*, 2019). Varias empresas españolas comercializan salchichas de carne de conejo y se han publicado algunas investigaciones sobre su elaboración, perfil nutricional, parámetros físico-químicos y evaluación sensorial (Ramírez, 2009; Hleap *et al.*, 2014; Casillas-Peñuelas *et al.*, 2015; Honrado *et al.*, 2022). Pero apenas se ha investigado sobre la aceptación de salchichas frescas de carne de conejo por consumidores jóvenes en comparación con las elaboradas con otras carnes que son más habituales en el mercado. En este contexto, el objetivo de esta investigación es evaluar la aceptación y la preferencia de salchichas frescas de carne de conejo y compararlas con las elaboradas con carne de cerdo y con carne de pollo, mediante un panel de consumidores jóvenes. La hipótesis principal es que los jóvenes aceptarán bien las salchichas elaboradas con carne de conejo, como se ha constatado ya con hamburguesas (Lacalle-Ruiz y González-Redondo, 2021), porque esta forma de presentación elimina o enmascara algunas de características por las que no consumen esta carne (contenido de hueso, sabor al que no están acostumbrados, etc.).

Material y métodos

En noviembre de 2021 se realizó un panel de 70 consumidores no entrenados, compuesto por estudiantes de grado, máster y doctorado de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Sevilla, que participaron de forma voluntaria y con consentimiento informado. Se evaluaron salchichas frescas comerciales de carne de conejo, cerdo y pollo adquiridas en hipermercados. El valor nutricional y los ingredientes de las salchichas se muestran en la **Tabla 1**.

Las salchichas se cocinaron en una plancha eléctrica utilizando sólo un poco de aceite de oliva virgen extra para evitar que se adhiriesen. Las sesiones de cata se realizaron siguiendo las metodologías estándar para evaluaciones sensoriales con consumidores no entrenados (Pagliarini, 2002). Los catadores dispusieron de servilletas, cubiertos, agua y picos. Se les presentó un plato con una muestra de unos 5 cm de longitud de cada una de las tres salchichas, identificadas con números aleatorios de tres dígitos y con las muestras colocadas en orden aleatorio para cada panelista. Fueron instruidos para catar y evaluar las salchichas de izquierda a derecha y comer picos y beber agua entre cada dos salchichas distintas. Las salchichas se sirvieron calientes. En primer lugar, para cada tipo de salchicha se solicitó puntuar el grado de aceptación de los atributos organolépticos (olor, color, apariencia, textura, sabor, elasticidad y jugosidad) y la aceptación global utilizando una escala hedónica de nueve puntos (de 1: me disgusta extremadamente, a 9: me gusta extremadamente). En segundo lugar, y con las mismas muestras de la evaluación anterior, se solicitó clasificarlas por orden de preferencia (de 1: preferida en primer lugar a 3: preferida en último lugar).

Tabla 1. Valor nutricional (por 100 g) e ingredientes de las salchichas frescas evaluadas (información de los fabricantes).

	Salchicha		
	Conejo	Cerdo	Pollo
Valor energético (kJ/kcal)	570/136	548/131	411/98
Grasas (g)	6,0	7,0	3,4
Grasas saturadas (g)	2,6	2,6	1,1
Hidratos de carbono (g)	6,0	1,1	1,6
Azúcares (g)	0,5	1,1	1,0
Proteínas (g)	14,4	16,6	15,2
Sal (g)	1,85	2,10	1,95
Ingredientes	Carne de conejo (75%), agua, sal, especias naturales, almidón, fibras vegetales, proteínas de guisante, dextrosa, conservador E-221 (sulfitos), antioxidante E-300, colorante E-120.	Carne de cerdo (88%), agua, sal, almidón de maíz, especias y aromas. Embutido de tripa natural de cordero.	Carne de pollo (86%), agua, harina de arroz, sal, emulgente (monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos), extractos naturales de fermentación, antioxidante: ascorbato sódico, extractos de especias, fécula de patata, fibra vegetal, jarabe de glucosa de maíz, pimienta blanca, azúcar, especias, y extractos vegetales. Tripa nat.

Utilizando SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, EE.UU), se realizó un análisis GLM de la valoración de cada atributo sensorial con los factores tipo de salchicha y sexo de los sujetos, analizándose además la interacción entre ambos factores. Se realizó una prueba de Friedman para analizar el orden de preferencia de las salchichas. Ambos análisis fueron seguidos de pruebas post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey para identificar las diferencias de valoración de los atributos sensoriales y del orden de preferencia de las salchichas.

Resultados y discusión

Los jóvenes panelistas que evaluaron las salchichas tenían 22,1±0,49 años (media±ET), variando entre 18 y 45 años. El 57,1% eran hombres y el 42,9% mujeres.

La **Tabla 2** muestra la valoración otorgada por los panelistas a los principales atributos sensoriales y a la aceptación global de las salchichas de carne de conejo, cerdo y pollo.

Tabla 2. Valoración de los atributos sensoriales de salchichas de carne de conejo, cerdo y pollo.

Atributo	Salchicha (media±error típico; n=70)			P _{Salchicha}	P _{Sexo}	P _{Salchicha} X P _{Sexo}
	Conejo	Cerdo	Pollo			
Olor	6,73±0,181	6,90±0,172	7,16±0,140	0,150	0,446	0,380
Color	7,00±0,133b	6,26±0,177a	6,90±0,172b	<0,001	0,066	0,098
Apariencia	7,00±0,155	6,71±0,184	7,10±0,162	0,180	0,349	0,375
Textura	6,76±0,171ab	6,60±0,176a	7,30±0,151b	0,005	0,017	0,349
Sabor	7,29±0,188ab	7,00±0,195a	7,74±0,133b	0,005	0,001	0,147
Elasticidad	6,83±0,183b	6,10±0,195a	7,20±0,172b	<0,001	0,004	0,799
Jugosidad	7,16±0,170b	6,31±0,209a	7,93±0,134c	<0,001	0,012	0,349
Aceptación global	7,20±0,150ab	6,79±0,165a	7,67±0,142b	<0,001	0,003	0,207

a-c: medias acompañadas de letras diferentes son significativamente distintas (P<0,05). Valoración en escala Likert: 1: me disgusta extremadamente, 2: me disgusta mucho, 3: me disgusta moderadamente, 4: me disgusta levemente, 5: ni me gusta ni me disgusta, 6: me gusta levemente, 7: me gusta moderadamente, 8: me gusta mucho, 9: me gusta extremadamente.

No se observó interacción entre el tipo de salchicha y el sexo de los panelistas para ningún atributo sensorial ($P>0,05$). La valoración del olor y de la apariencia por los panelistas no difirió entre tipos de salchichas ($P>0,05$). El color y la elasticidad de las salchichas de conejo y de pollo se valoraron al mismo nivel, y mejor que en las de cerdo ($P<0,001$). La jugosidad se valoró mejor en la salchicha de pollo, a continuación en la de conejo y en último lugar en la de cerdo ($P<0,001$). Los jóvenes valoraron mejor la textura, el sabor ($P<0,01$) y la aceptación global ($P<0,001$) en la salchicha de pollo que en la de cerdo, con la salchicha de conejo intermedia, sin diferencia por un lado con la de pollo y por otro con la de cerdo.

Hubo influencia del sexo de los consumidores en la valoración de cuatro atributos sensoriales y en la aceptación global de las salchichas (Tabla 2), cuyo efecto se muestra en la Tabla 3. Los atributos sensoriales de textura, sabor, elasticidad, jugosidad y la aceptación global de las salchichas fueron mejor valorados por los hombres que por las mujeres.

Tabla 3. Influencia del sexo en la valoración de algunos atributos sensoriales de salchichas de carne de conejo, cerdo y pollo (media±error típico; n=70).

Sexo	Atributos				
	Textura	Sabor	Elasticidad	Jugosidad	Aceptación global
Mujer	6,62±0,162	6,96±0,185	6,36±0,183	6,84±0,173	6,92±0,157
Hombre	7,08±0,116	7,63±0,106	6,98±0,131	7,35±0,139	7,44±0,104
P_{Sexo}	0,017	0,001	0,004	0,012	0,003

Valoración en escala Likert: 1: me disgusta extremadamente, 2: me disgusta mucho, 3: me disgusta moderadamente, 4: me disgusta levemente, 5: ni me gusta ni me disgusta, 6: me gusta levemente, 7: me gusta moderadamente, 8: me gusta mucho, 9: me gusta extremadamente.

La Tabla 4 muestra el orden de preferencia de las salchichas por los panelistas. Hubo diferencias entre los tres tipos de salchichas ($P<0,05$) según el orden de preferencia. Las salchichas de carne de pollo fueron preferidas en primer lugar por los panelistas, con diferencia sobre las salchichas de carne de cerdo. Las salchichas de carne de conejo quedaron en una posición intermedia entre las otras dos, sin diferencia por un lado con las de pollo y por otro con las de cerdo.

Tabla 4. Prueba de Friedman de comparación de preferencia de salchichas de carne de conejo, cerdo y pollo (media±error típico; n=70).

	Salchicha			P
	Conejo	Cerdo	Pollo	
Preferencia*	2,04±0,0,96ab	2,21±0,097b	1,74±0,093a	0,019

*Puntuaciones de 1, 2 y 3 para la preferencia en primer, segundo y tercer lugar, respectivamente. a,b: medias acompañadas de letras diferentes son significativamente distintas ($P<0,05$).

Las pruebas de aceptación y preferencia realizadas por los consumidores jóvenes de este estudio revelaron que las salchichas frescas de carne de conejo son valoradas favorablemente, para varios atributos sensoriales al mismo nivel que las de pollo, y mejor que las de cerdo. Esto demuestra que esta forma de presentación del producto, en la que la carne de conejo está deshuesada, picada, mezclada con otros ingredientes y homogeneizada para darle una forma, consistencia y aspecto típicos de este elaborado (Petracci y Cavani, 2013; Honrado *et al.*, 2022) permite que sea atractiva al consumidor joven en la misma medida que las salchichas de otras carnes blancas de consumo habitual y con las que están familiarizados. La óptima valoración y aceptación de las salchichas de conejo de este ensayo coincide con lo constatado en estudios previos con salchichas de carne de conejo (Ramírez, 2009; Hleap *et al.*, 2014), así como con hamburguesas elaboradas con esta carne (Lacalle-Ruiz y González-Redondo, 2021). La presentación como salchicha tiene, además, algunas ventajas frente a otras presentaciones de la carne de conejo que pueden contribuir a su buena aceptación, como la ausencia de hueso o la estandarización del sabor (por la mezcla con otros ingredientes), soslayando así algunas características de esta carne por las que parte de los

jóvenes afirman no consumirla (sabor, contenido de hueso, etc.; González-Redondo *et al.*, 2010). Por otra parte, que varios atributos sensoriales y la aceptación global de las salchichas de conejo, pollo y cerdo se valorasen mejor por los hombres que por las mujeres coincide con el patrón de menor aceptación de las carnes en general y de conejo en particular por mujeres, sobre todo jóvenes (González-Redondo *et al.*, 2010). Sin embargo, en un panel de consumidores similar al del presente estudio en el que se compararon hamburguesas de carne de conejo con las de cerdo, pollo y pavo no se encontró efecto del sexo (Lacalle-Ruiz y González-Redondo, 2021).

Desde hace años se propugna la comercialización de transformados de carne de conejo (ASESCU, 1996), como las salchichas, como vía para incrementar el consumo de esta carne, siendo varias las empresas que las tienen en su cartera comercial. Sin embargo, su presencia en los puntos de venta es poco frecuente e irregular y su precio es superior al de las salchichas elaboradas con otras carnes (Petracci y Cavani, 2013), lo que no facilitaría la expansión de su consumo, que podría incrementarse con una adecuada promoción que las diera a conocer.

En conclusión, las salchichas de conejo se valoran bien frente a las de pollo y mejor que las de cerdo, teniendo potencial para propiciar el consumo de esta carne en jóvenes.

Bibliografía

ASESCU. 1996. *Transformados cárnicos de conejo. Boletín de Cunicultura* 83:36-37.

Casillas-Peñuelas R, Pérez-Esteve E, Fuentes A, Grau-Melo R, Pascual JJ, Barat-Baviera J. 2015. *Elaboración de una salchicha a partir de carne de conejo. En: 40 Symposium de Cunicultura. Santiago de Compostela, 28-29 de mayo de 2015, pp. 111-114.*

De Santos ML. 2019. *El sector de la carne de conejo se adapta a los cambios en el mercado. Distribución y Consumo* 157:48-51.

Escriba-Perez C, Baviera-Puig A, Buitrago-Vera J, Montero-Vicente L. 2017. *Consumer profile analysis for different types of meat in Spain. Meat Sci* 129:120-126.

Escribá-Pérez C, Baviera-Puig A, Montero-Vicente L, Buitrago-Vera J. 2019. *Children's consumption of rabbit meat. World Rabbit Sci* 27:113-122.

González-Redondo P, Mena Y, Fernández-Cabanás VM. 2010. *Factors affecting rabbit meat consumption among Spanish university students. Ecol Food Nutr* 49:298-315.

Hleap JI, Romero YV, Dussán S. 2014. *Comparación bromatológica, microbiológica y sensorial de dos formulaciones de salchichas elaboradas con carne de conejo. Acta Agron* 63:18-24.

Honrado A, Aínsa A, Marquina PL, Beltrán JA, Calanche JB. 2022. *Low-fat fresh sausage from rabbit meat: An alternative to traditional rabbit consumption. Meat Sci* 194:108973.

Lacalle-Ruiz E, González-Redondo P. 2021. *Estudio exploratorio de aceptación y preferencia de hamburguesas de carne de conejo y de otras carnes blancas por consumidores jóvenes. En: 45 Symposium de Cunicultura. Congreso virtual, 6-7 de octubre de 2021, pp. 96-100.*

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2006. *La alimentación en España, 2006. https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/libro-la-alimentacion-en-espana-/libro2010-11-04_18.56.25.7562.aspx*

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2021. *Panel de consumo alimentario. <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/>*

Montero L. 2015. *La cadena de valor del sector cunícola en España. Segmentación del consumo en base al Food-Related Lifestyle (FRL). Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.*

Pagliari E. 2002. Valutazione sensoriale. Aspetti teorici, pratici e metodologici. Ulrico Hoepli Editore, Milán, Italia.

Petracci M, Cavani C. 2013. Rabbit meat processing: historical perspective to future directions. World Rabbit Sci 21:217-226.

Ramírez MA. 2009. Utilización de carne de conejo en la elaboración de una salchicha escaldada. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala.



Una solución completa para la protección de los conejos

CUNIPRAVAC® RHD



Ficha técnica



Vacuna inactivada frente a **RHDV1**
Inicio de la inmunidad: **6 días**

ERAVAC®



Ficha técnica



Vacuna inactivada frente a **RHDV2**
Inicio de la inmunidad: **1 semana**

MIXOHIPRA® H



Ficha técnica



Vacuna viva atenuada frente a **Mixomatosis**
Inicio de la inmunidad: **1 semana**
(*Virus homólogo*)

MIXOHIPRA® FSA



Ficha técnica



Vacuna viva atenuada frente a **Mixomatosis**
Inicio de la inmunidad: **6 días**
(*Virus heterólogo*)

Consulte la ficha técnica del medicamento mediante el código QR



coren

Alimentos de Galicia

Alimentación Animal Certificada

**Trabajamos por una
alimentación de calidad,
segura y sostenible**



www.coren.es

 **CAI** coren AGROINDUSTRIAL, S.A.U.