

SEGOVIA

Del 27 al 28 de mayo de 2010



XXXV SYMPOSIUM DE CUNICULTURA DE ASESCU

UNION DE CAMPESINOS
Segovia  UCCL
La Unión

 Asociación
Española de
Cunicultura


cooperativa

 GOBIERNO
DE ESPAÑA  MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y EMPLEO  INIA
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

GOMEZ Y
CRESPO



GOMEZ Y CRESPO

PRESENTA
EL
MODELO

BURELA 2010



CUNICULTURA INDUSTRIAL

¡Su inversión en buenas manos!

XXXV SYMPOSIUM DE CUNICULTURA DE ASESCU

Segovia, 27 y 28 de mayo de 2010

Coordinadores:

Pedro González Redondo

Ignacio Badiola Sáiz

Ceferino Torres Lozano

Tomás M. Rodríguez Serrano



El XXXV Symposium de Cunicultura de ASESCU se celebró en el Teatro Juan Bravo de Segovia, los días 27 y 28 de mayo de 2010.

El simposio fue organizado por:

- Cooperativa Mesenor
- La Unión de Campesinos de Segovia.
- Asociación Española de Cunicultura

Contó con el patrocinio de:

- Excelentísima Diputación de Segovia.
- Fundación Caja Rural de Segovia
- Gómez y Crespo
- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA.
- INTERCUN
- Novartis
- Obra social y Cultura de Caja Segovia

Y con la colaboración de:

- Alpharma
- Andrés Pintaluba, S.A.
- BDCUNI
- Copele
- Elanco Spain
- Gaun, S.A., Instalaciones Cunícolas
- Grupo Hermi
- Grupo Hermi Alimentación
- Laboratorios Hipra, S.A.
- Laboratorios Maymó
- Nanta
- Núter Feed S.A.U.
- Plataforma Tecnológica de Agricultura Sostenible
- S.P. Veterinaria
- Tecnología y Vitaminas.
- Veterinaria Esteve, S.A.

Los coordinadores de este libro de actas fueron:

Pedro González Redondo
Ignacio Badiola Sáiz
Ceferino Torres Lozano
Tomás M. Rodríguez Serrano

DISEÑO Y ARTE FINAL: Editorial Agrícola Española, S.A.

CAPITULO 1

PATOLOGÍA

7

Desarrollo de un candidato vacunal de subunidad contra el virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo

Farnós O., Fernández E., Chiong M., Parra F., Joglar M., Méndez L., Rodríguez E., Rodríguez D., González E.M., Suárez M., Rodríguez MP., Rodríguez-Mallon A., Valdés J., González N., Limonta M., Estrada MP., Vargas M., Mena J., Sánchez K., Borroto C., García M.

9

Evolución de las poblaciones linfocitarias sanguíneas en conejas multíparas sometidas a dos ritmos reproductivos (destete a los 28 y 42 días postparto)

Ferrian S., Guerrero I., Cano J.L., Pascual J.J., Blas E., Corpa J.M.

15

Estudio de sensibilidad de cepas de Pasteurella multocida en conejos a la tilmicosina entre 2002 y 2008

Morel A., Boucher S., de Paz X., Caamaño M., Manso P.

20

Distribución pulmonar de la tilmicosina (Pulmotil-Elanco) en el conejo después de la administración oral

Lucatello L., Gallina G., Drigo I., Cocchi M., Scandurra S., de Paz X., Caamaño M., Manso P., Agnoletti F., Montesissa C.

22

El examen serológico con muestras de sangre obtenidas en papel de filtro

Villa Espinosa A., Pueyo Pintor R., Navarro Serrano A., Baselga J.M., Baselga R.

25

CAPITULO 2

REPRODUCCIÓN

31

COGAL, un nuevo método en la I.A. en cunicultura

Sánchez del Cueto M., Gullón J., Prieto M.C., Quintela L.A., Hernández-Gil R.

33

Medida de la fragmentación del ADN en muestras seminales de conejo utilizando HALOMAX®

González C., Besora J.A., Ribé M.T., Casado S., Gosálvez J.

37

Medida de la fragmentación de ADN en muestras seminales de conejo. Impacto sobre la tasa de fecundación y el tamaño de camada

González C., Besora J.A., Ribé M.T., Casado S., Gosálvez J.

41

Efecto del desarrollo hasta la recría sobre los parámetros seminales del conejo

Martínez Paredes E., Savietto D., Ródenas L., Arias J.M., Domingues V.S., De Jesús M.E., Lloréns J., Lavara R., Vicente J.S., Pascual J.J.

45

CAPITULO 3

GESTIÓN Y BIENESTAR

49

bdcuni: Resumen de resultados de gestión técnica 2008 y 2009

Pascual M., Serrano P., Gómez E.A.

51

Postura y comportamiento del conejo para determinar la altura de la jaula en relación con el bienestar animal

Negretti P., Bianconi G., Finzi A.

54

CAPITULO 4

NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN

59

Efecto del peso al nacimiento y del pienso de recría sobre el desarrollo y reproducción de las conejas

61

*Saviotto D., Ródenas L., Martínez-Paredes E., Esteve J.M., Villalba C., Fabre C., Blas E., Cervera C., Pascual J.J.***Costes asociados al manejo de la alimentación y al pienso empleado**

65

*Heras J., Martínez E., Ródenas L., Martínez-Vallespín B., Fernández C., Blas E., Cervera C.***Efecto de la restricción alimentaria sobre los parámetros productivos y la viabilidad de gazapos en dos cebos consecutivos**

69

*Romero C., Cuesta S., Astillero J.R., Nicodemus N., de Blas C.***Efecto del grado de molienda de la cebada y el heno de alfalfa sobre los parámetros productivos y la digestión en gazapos de cebo**

74

*Romero C., Nicodemus N., Rodríguez J.D., García A.I., de Blas C.***Efecto de la inclusión de ácidos orgánicos de cadena corta sobre el crecimiento, la mortalidad y el tejido linfoide del intestino en gazapos**

79

*Romero C., Rebollar P.G., Dal Bosco A., Castellini C., Cardinali R.***Influencia de un suplemento alimenticio líquido a base de minerales, vitaminas y aminoácidos sobre la mortalidad y el crecimiento de los conejos al engorde**

84

Colin M., Camino Callarías A., Teillet B., Varela E., Prigent A.Y.

CAPITULO 5

MORFOFISIOLOGÍA Y COMPOSICIÓN CORPORAL

89

Evolución con la edad de los mecanismos de barrera intestinal.**1. Tracto digestivo y microbiota cecal**

91

*Delgado R., Menoyo D., Badiola I., Pérez de Rozas A., Carabaño R1, García J.***Evolución con la edad de los mecanismos de barrera intestinal.****2. Morfología intestinal y sistema inmune**

95

*Delgado R., Menoyo D., Badiola I., Pérez de Rozas A., García J., Carabaño R.***Contenido de hueso de la canal de conejos de monte cazados en Andalucía (España)**

99

González-Redondo P., Camacho T., González-Sánchez C., Ramírez-Reina M.C.

CAPITULO 1

PATOLOGÍA

Desarrollo de un candidato vacunal de subunidad contra el virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo

Development of a subunit vaccine candidate against Rabbit Hemorrhagic Disease

Farnós O.¹, Fernández E.¹, Chiong M.¹, Parra F.⁸, Joglar M.¹, Méndez L.¹, Rodríguez E.¹, Rodríguez D.⁷, González E.M.¹, Suárez M.¹, Rodríguez MP.¹, Rodríguez-Mallon A.¹, Valdés J.², González N.⁶, Limonta M.², Estrada MP.¹, Vargas M.¹, Mena J.⁵, Sánchez K.³, Borroto C.¹, García M.⁴

¹Dirección de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave. 31, e/ 158 y 190, CP 10600, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba.

²Dirección de Desarrollo Tecnológico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave. 31, e/ 158 y 190, CP 10600, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba.

³División de Formulación y Envases, Dirección de Producción, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave. 31, e/ 158 y 190, CP 10600, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba.

⁴Grupo de Negociación y Desarrollo de Proyectos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave. 31, e/ 158 y 190, CP 10600, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba.

⁵Dirección de Ensayos Clínicos y Asuntos Regulatorios, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave. 31, e/ 158 y 190, CP 10600, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba.

⁶Dirección de Desarrollo Tecnológico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Circunvalación Norte y Ave. Finlay, CP 70100, Camagüey, Cuba.

⁷Centro Nacional de Epizootiología, Diagnóstico e Investigación, Ave. 51 No. 33212, Habana, Cuba

⁸Laboratorio de Biotecnología. Universidad de Oviedo. España.

Dirección de contacto: marianela.garcia@cigb.edu.cu

Resumen

Las vacunas existentes actualmente contra el virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo están basadas en la inactivación del virus a partir de la maceración de hígados de conejos previamente infectados con el virus campo, con el consecuente cuestionamiento ético y de seguridad. A partir del gen codificante para la proteína VP60, del aislamiento español AST/89, se ha logrado realizar el clonaje y expresión recombinante de una VLP, que contiene esta proteína, en la levadura *Pichia pastoris* y su caracterización física química, seguida del desarrollo de un proceso de purificación y la formulación final de un candidato vacunal. Se ha evaluado la respuesta inmune inducida a corto y largo plazo en animales de experimentación contra diferentes cepas del VEHC, incluyendo el subtipo antigénico VEHCa, demostrando la eficacia del candidato. Una confrontación con 100 DL50 del virus campo demostró que todos los animales inmunizados sobrevivieron al reto. Diferentes esquemas de inmunización, dosis y vías de administración han sido evaluados.

Palabras clave: VEHC, vacuna de subunidad, VLP, inmunidad a largo plazo.

Abstract

Currently available vaccines against the Rabbit Hemorrhagic Disease Virus are based on the virus from the maceration of livers of previously infected with the virulent virus rabbits, with the logical ethic and safety questioning. From the gene that codifies the VP60 protein, from the Spanish isolation AST/89, the cloning and expression of a VLP, that contains this protein, in yeast (*Pichia pastoris*) were performed and its physico-chemical characterization, followed by the development of a purification process and the final formulation of a vaccine candidate. The induced immune response in short and long term in experimental animals against different REHDV strains, including the antigenic subtype REHDVa has been evaluated, demonstrating the efficacy of the candidate. A confrontation with 100 DL50 of the virulent virus demonstrated that all the immunized animals survived the challenge. Different schemes of immunization, dose and routes of administration have been evaluated.

Key words: RHDV, subunit vaccines, VLP, long term immunity.

Introducción

La enfermedad hemorrágica viral del conejo se detectó por primera vez en la República Popular China en el año 1984 (Liu y cols., 1984). Es una enfermedad letal y contagiosa, que en conejos adultos tiene un índice de morbilidad del 100% y una mortalidad que puede alcanzar hasta el 90%. En la actualidad, el VEHC se considera endémico en toda Europa y en el este Asiático (Cooke, 2002). En Europa, los brotes afectan con frecuencia al sector productivo y provocan también la desestabilización de ecosistemas, que dependen de las poblaciones de conejos salvajes que en ellos habitan (Chasey, 1997; Calvete, 2006). En el continente americano, se han descrito brotes de magnitud variada en México, Estados Unidos, Cuba y Uruguay

(Gregg y cols., 1991; Toledo y cols., 1995; Neilan y cols., 2000; Campagnolo y cols., 2003; <http://www.oie.int>). Sin embargo, hasta el presente Cuba ha sido el país más afectado de la región, con cuatro epizootias ocurridas en los años 1993, 1997, 2000-2001 y 2004-2005. Los principales estudios realizados en el país se han dirigido al diagnóstico de la enfermedad, y a su aplicación en la ejecución de programas para impedir la diseminación del virus.

Actualmente, no existe un sistema de cultivo celular *in vitro* que permita la replicación del VEHC, por lo que los únicos preparados vacunales disponibles comercialmente consisten en formulaciones obtenidas a partir de macerados de órganos de conejos libres de patógenos, infectados con el virus (Argüello-Villares, 1991). El uso a gran escala de estas preparaciones, implica riesgos que incluyen la posibilidad de introducir microorganismos patógenos exóticos en aquellas regiones o países que decidan practicar este tipo de vacunación, además del cuestionamiento. El empleo de levaduras convencionales, células de insecto o plantas para la expresión de la proteína VP60, por su parte, ha producido bajos niveles de expresión, del orden de las unidades o pocas decenas de miligramos por litro de cultivo. Los mayores niveles alcanzados en el sistema de baculovirus/Sf9, han sido de aproximadamente 20 mg/L (Laurent y cols., 1994).

La respuesta inmune contra el VEHC está dirigida contra la proteína VP60 de la cápsida y consiste fundamentalmente en anticuerpos neutralizantes que reconocen determinantes antigénicos específicos expuestos en la superficie del virus, los cuales correlacionan con los niveles de protección en el animal (Capucci y cols., 1995). Estos anticuerpos son capaces también de inhibir la aglutinación de eritrocitos humanos del grupo O, producida por el virus en experimentos *in vitro* (Capucci y cols., 1995; Fernández-Fernández y cols., 2001). Por otra parte, las tendencias en investigación se encaminan a lograr el desarrollo temprano de una respuesta inmune humoral potente, tanto sistémica como local, contra este agente infeccioso. Desde otro punto de vista, el económico, es imprescindible obtener niveles de expresión de la proteína VP60, preferiblemente del orden de las centenas de miligramos o gramos por litro de cultivo, además de la utilización de sistemas heterólogos que propicien el desarrollo de plataformas productivas a gran escala, y permitan una producción factible de vacunas capaces de prevenir la infección por el VEHC. Entre las estrategias más recientes y efectivas se encuentra el empleo de nuevos sistemas de expresión eucarióticos como la levadura *Pichia pastoris*, con niveles que alcanzan con frecuencia los gramos por litro de cultivo (Higgins y Cregg, 1998; Cereghino y Cregg, 2000). En este trabajo exponemos las etapas vencidas para obtener y desarrollar una formulación vacunal basada en la expresión de la proteína VP60 recombinante en *P. pastoris*.

Material y métodos

El gen que codifica la proteína VP60 del VEHC, donado por el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Oviedo, se clonó en el vector de expresión pNAO, obteniéndose el plasmidio de expresión pNAOVP60. La inserción del gen se confirmó por secuenciación, y se encontró la secuencia nucleotídica esperada. El plasmidio se digirió con una enzima de restricción y se obtuvo el plasmidio lineal que se utilizó para transformar la cepa MP36 de *P. pastoris*. Entre 80 clones, se seleccionaron el clon PVP11 (expresado insoluble, intracelular) y el PVP12 (expresado soluble, intracelular), por mostrar altos niveles de expresión intracelular de la VP60, por inmunodot.

La cepa PVP12 se utilizó para los estudios de expresión de la proteína VP60 intracelular en cultivos de 100 mL y en fermentadores de 5 L de volumen. Para el análisis de las muestras del proceso, se procedió a la ruptura de las células de la levadura y se utilizó un suero hiperinmune anti-VEHC. Los niveles de expresión en el sobrenadante de ruptura se cuantificaron por ELISA, utilizando la VP60 obtenida en células de insecto, como patrón de concentración conocida.

El perfil antigénico de la proteína VP60 obtenida de forma soluble en *P. pastoris* se estudió por ELISA, con el empleo de sueros anti-VEHC obtenidos de conejos inmunizados con las cepas virales AST/89 y Bs.89, así como un suero hiperinmune generado contra la cepa que circuló en Cuba en los años 2004-2005. El perfil antigénico también se estudió por inmunodot con los anticuerpos monoclonales 1H8, 6H6 y 6G2, dirigidos contra epitopos conformacionales presentes en la proteína VP60 del VEHC (cepa "clásica" Bs.89), obtenidos en el laboratorio de referencia de la OIE para la enfermedad (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Italia) que reconocen epitopos discontinuos presentes en la proteína monomérica y un epitopo presente únicamente en la cápsida ensamblada.

La proteína VP60 obtenida de forma soluble en *P. pastoris* (cepa PVP12) se caracterizó por cromatografía líquida de alta eficacia de filtración en gel, con el empleo de una columna TSK G5000 PW equilibrada con PBS. Se utilizaron como patrones de peso molecular el HBsAg particulado (con un peso molecular >1500 kDa) y azida sódica (Figura 1A,B), analizados en la misma columna.

La proteína purificada se formuló en adyuvante oleoso, a razón de 50 µg/mL y se evaluó en conejos su capacidad inmunogénica y la funcionalidad de los anticuerpos generados, en las siguientes condiciones: se utilizaron 2 dosis de la proteína VP60;

se utilizó la proteína purificada o contenida en el sobrenadante de ruptura celular y la proteína VP60 obtenida insoluble en la cepa PVP11 de *P. pastoris* (VP60-PVP11), así como el antígeno VP60 obtenido en cultivos de células de insecto, y la vacuna Cunipravac-RHDTM (RHDV inactivado). Para evaluar la proteína VP60-PVP11 por vía oral, se administraron 3 dosis, a razón de 0,5 mg por dosis. Los grupos se inmunizaron los días 0 y 21 por vía subcutánea y los días 0, 21 y 40, por vía oral. Los niveles de anticuerpos capaces de unir el VEHC en un ELISA de competición, se evaluaron con la utilización de la cepa italiana Bs.89, los días 0, 14, 40, 60, 90 y cada 30 días hasta los 365 días.

Más tarde, experimentos de confrontación con dosis letales del virus se realizaron en las instalaciones de la Universidad de Oviedo, España, en coordinación con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de dicha institución. Se utilizaron 15 conejos adultos, de 8 semanas de edad y masas corporales por encima de 1,5 kg, los cuales se dividieron en tres grupos: Grupo 1: (7 animales). Se inmunizó por vía subcutánea con la proteína VP60 purificada por sec-HPLC, a partir del sobrenadante de ruptura de la cepa PVP12 de *P. pastoris* (Dosis de 50 mg en 2 mL); Grupo 2: (3 animales). Se inmunizó por vía subcutánea con la proteína VP60 expresada en células de insecto, ambas adyuvadas en Montanide 888 (Dosis de 50 mg en 1 mL). Grupo 3: (3 animales). Se administró Montanide 888 por vía subcutánea (placebo, 1 mL). En todos los casos se inmunizó a los Días 0, 21. Se tomaron muestras de suero a todos los animales los días 0, 21, 30 y 42 para determinar los niveles de anticuerpos IgG específicos contra el VEHC por ELISA de competición, así como los títulos capaces de inhibir *in vitro* la hemaglutinación viral. Todos los animales se retaron en el día 42 del experimento, utilizando 16000 unidades hemaglutinantes del aislamiento AST/89 del VEHC, administradas por vía intramuscular.

Un proceso de purificación por exclusión molecular, a escala productiva, fue establecido, evaluándose tres lotes de fermentación (1001, 1002, 1003). Se utilizó una columna BP250/60. La velocidad empleada fue de 15 cm/h, el flujo de trabajo fue de 122 ml/min. Se evaluaron por HPLC los picos colectados luego de la purificación en una matriz de sefarosa CL4B.

Resultados y discusión

Como resultado del entrecruzamiento génico, se obtuvo una banda de aproximadamente 7,3 kb (Figura 1A).

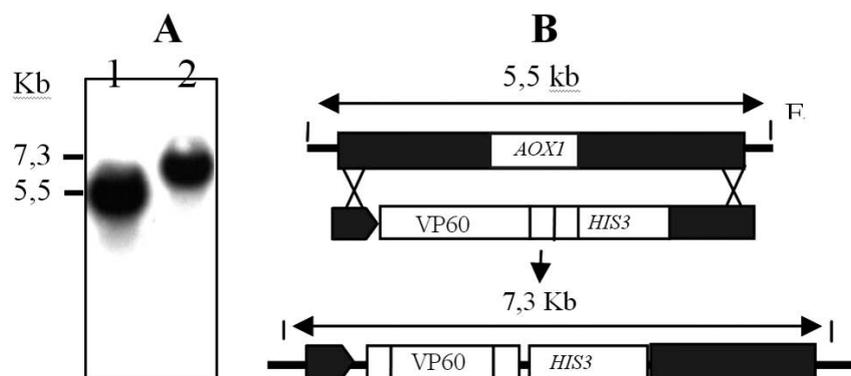


Figura 1. Análisis por Southern blot del gen AOX1 en las cepas de *P. pastoris* MP36 (A, Línea 1) y PVP12 (A, Línea 2). En B) se muestra el diagrama que representa el evento ocurrido. En este caso el casete de expresión se inserta en el genoma hospedante y reemplaza al gen AOX1 nativo.

Se observó por inmunodot y Western blotting que toda la proteína recombinante se obtuvo de forma intracelular y soluble a partir de las 12 h post-inducción, con un peso molecular de aproximadamente 60 kDa. No se detectó la proteína recombinante asociada al precipitado de ruptura celular. Los niveles de expresión en el sobrenadante de ruptura se cuantificaron por ELISA (Tabla 1) y alcanzaron los 300 mg/L de cultivo.

Los anticuerpos presentes en los sueros de animales inmunizados con las cepas virales AST/89 y Bs.89, así como el suero hiperinmune de la cepa que circuló en Cuba, reconocieron la proteína recombinante. La proteína VP60 soluble fue reconocida por los tres anticuerpos monoclonales 1H8, 6H6 y 6G2. La presencia del epítipo reconocido por el anticuerpo 1H8, presente sólo en la cápsida ensamblada del RHDV y no en la proteína VP60 en su forma monomérica o dimérica, sugirió que el antígeno alcanzó una conformación parecida a la que alcanza la proteína nativa ensamblada en la cápsida viral.

La caracterización de la proteína por HPLC confirmó que la proteína VP60 se encuentra formando estructuras de alto peso

molecular, debido a que la misma eluyó en un solo pico definido, con un tiempo de retención de aproximadamente 33 minutos. Este tiempo es similar al obtenido para el HBsAg en esta columna, con un flujo de 0,2 mL/min (Figura 3A,B,C).

Al inmunizar conejos para evaluar la capacidad de la proteína VP60 obtenida y la funcionalidad de los anticuerpos generados se observó que todos los grupos que recibieron la proteína VP60 recombinante, así como los conejos inmunizados con la vacuna de VEHC inactivado, desarrollaron altos niveles de anticuerpos capaces de competir por el VEHC, al utilizar menores concentraciones de antígeno, un número de dosis menor y con un adyuvante disponible para ser empleado en la medicina veterinaria, Montanide 888. Los grupos inmunizados con la proteína VP60-PVP12 purificada o contenida en el sobrenadante de ruptura celular, con

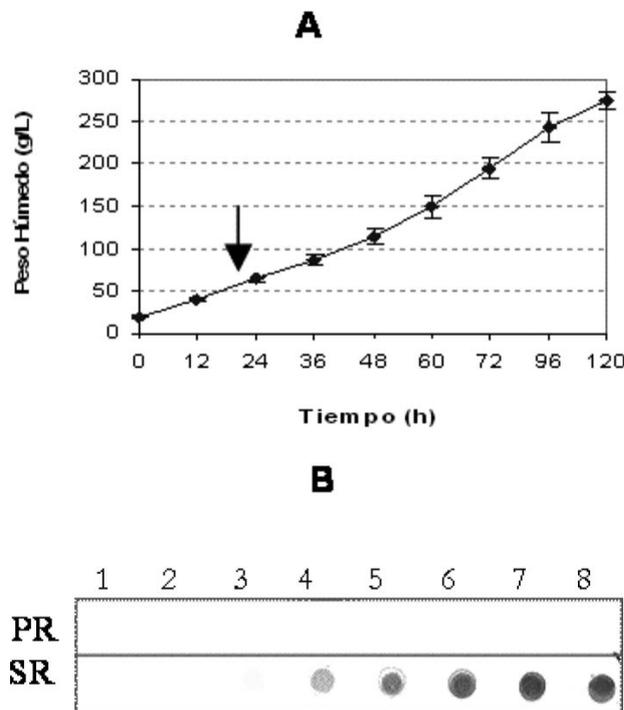


Figura 2. A) Perfil de crecimiento de la cepa PVP12 de *P. pastoris* en fermentador de 5 L. La flecha indica el inicio del crecimiento en metanol. B) Expresión en el tiempo de la proteína VP60 soluble, detectada por el anticuerpo monoclonal 6H6. PR: precipitado de ruptura, SR: sobrenadante de ruptura. Puntos 1 al 8 indican 12, 24, 36, 48, 72, 96, 108 y 120 horas de cultivo, respectivamente.

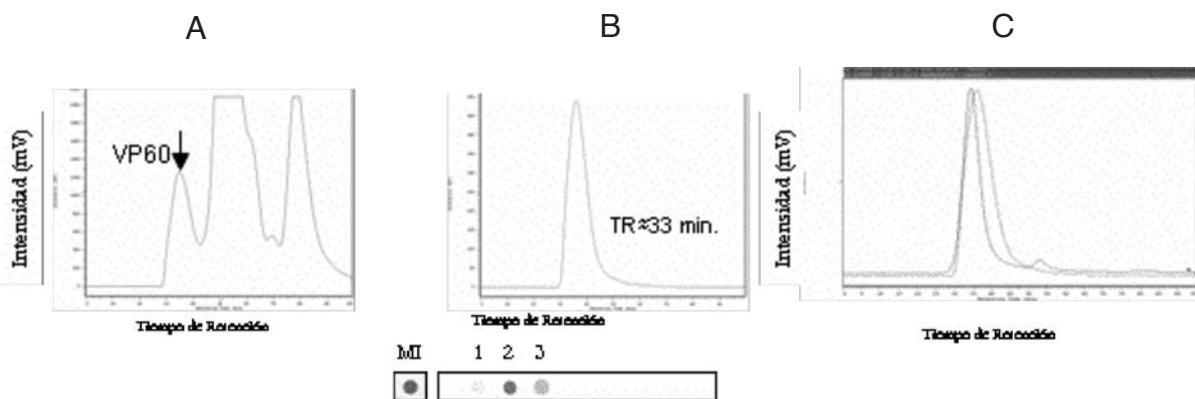


Figura 3. Análisis de la proteína VP60 obtenida. A) Cromatograma del sobrenadante de ruptura de la cepa PVP12, B) Cromatograma de la proteína VP60 previamente purificada en la misma columna, con un tiempo de retención de 33 min, y detección de la proteína por inmunodot al utilizar el anticuerpo monoclonal 1H8. MI: muestra inicial; Puntos 1, 2 y 3, fracciones colectadas correspondientes a este máximo de absorbancia, C. Superposición de los cromatogramas de VP60 y del HBsAg con tiempos de retención de aproximadamente 33 y 32 min, respectivamente.

la proteína VP60-PVP11 por vía subcutánea, así como los animales vacunados con la proteína VP60 obtenida en células de insecto o con la vacuna Cunipravac-RHDTM, desarrollaron una respuesta rápida de estos anticuerpos, solo 14 días después de la primera inoculación. Estos valores se mantuvieron hasta la última determinación, en el día 365 del experimento (Tabla 1).

Días	Porcentaje de inhibición en ELISA (anti-RHDV)						
	Grupo 1 (VP60-PVP12/ purificada, via s.c.)	Grupo 2 (VP60-PVP12/ sobrenadante ruptura, via s.c.)	Grupo 3 (VP60-PVP11 pellet ruptura, via oral)	Grupo 4 (VP60-PVP11 pellet ruptura, via s.c.)	Grupo 5 (VP60 baculovirus/Sf9, via s.c.)	Grupo 6 (vacuna de RHDV inactivado, Cunipravac-RHDTM via s.c.)	Grupo 7 (Placebo)
0	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a
14	93,1 ± 0,1a	71,0 ± 25,4a	0,1 ± 0,3b	83,4 ± 12,4a	93,7 ± 0,1a	57,3 ± 19,4c	0d
40	93,9 ± 0,3a	93,5 ± 1,3a	72,9 ± 18,3b	93,2 ± 0,6a	95,0 ± 0,8a	80,7 ± 17,2a	0c
60	91,6 ± 1,4a	92,5 ± 0,5a	82,2 ± 15,7 ^b	92,3 ± 1,4a	91,9 ± 1,2a	85,3 ± 10,0a	0b
90	92,2 ± 0,4a	92,1 ± 0,9a	53,1 ± 31,5b	91,7 ± 1,3a	91,2 ± 1,2a	88,1 ± 5,2a	0c
180	92,5 ± 0,3a	92,9 ± 0,2a	58,9 ± 9,5b	90,5 ± 0,6a	93,5 ± 1,7a	90,8 ± 1,4a	0c
270	92,8 ± 0,4a	91,8 ± 3,1a	60,8 ± 14,3b	93,8 ± 1,2a	93,6 ± 0,3a	92,7 ± 3,5a	0c
365	91,6 ± 1,7a	91,4 ± 0,6a	55,8 ± 12,5b	90,8 ± 3,1a	92,1 ± 0,3a	89,8 ± 3,9a	0c

Tabla 1. Niveles de anticuerpos contra el RHDV, medidos como porcentos de inhibición en un ELISA de competición. Las letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$, de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis y a la prueba de Dunn.

Los posteriores resultados de los experimentos de confrontación con dosis letales del virus arrojaron que todos los animales vacunados con las formulaciones que contenían la proteína VP60 expresada en células de insecto o en *P. pastoris* sobrevivieron la confrontación viral hasta 10 días después de aplicado el mismo, en que fueron sacrificados, sin mostrar signos clínicos característicos de la enfermedad. Sólo en el caso de los grupos inmunizados con la proteína VP60 obtenida en células de insecto o en la levadura *P. pastoris* se detectaron títulos capaces de inhibir *in vitro* la hemaglutinación.

El estudio de escalado de la purificación de la proteína, con vistas a establecer un proceso productivo robusto, arrojó que se obtiene una pureza elevada (más de un 80%) y un tamaño de partícula similar al obtenido en la escala inferior. (Fig. 3, A, B, C).

Estos lotes fueron formulados en adyuvante oleoso (Montanide 888) y se encuentran en estudios de estabilidad y en ensayos de inocuidad (Ensayo Fase I)

Conejos	Día 0	Día 42	Sobrevivencia al reto	Síntomas clínicos/Muerte	10 Días post-reto
1 (Placebo)	-	16	no	sí	-
3 (Placebo)	-	16	no	sí	-
4 (Placebo)	-	8	no	sí	-
5 (VP60 Baculo/Sf9)	-	4096	sí	no	8192
6 (VP60 Baculo/Sf9)	-	2048	sí	no	8192
8 (VP60 Baculo/Sf9)	-	2048	sí	no	4096
Media		2730,6			6826,6
9 (VP60 <i>P. pastoris</i>)	-	256	sí	no	1024
10 (VP60 <i>P. pastoris</i>)	4	1024	sí	no	2048
11 (VP60 <i>P. pastoris</i>)	2	256	sí	no	512
12 (VP60 <i>P. pastoris</i>)	-	256	sí	no	2048
13 (VP60 <i>P. pastoris</i>)	-	1024	sí	no	2048
14 (VP60 <i>P. pastoris</i>)	-	128	sí	no	256
15 (VP60 <i>P. pastoris</i>)	-	128	sí	no	512
Media		438,8			1206,8
C+ (1/4096)					

Tabla 2. Títulos de anticuerpos capaces de inhibir la hemaglutinación viral *in vitro*.

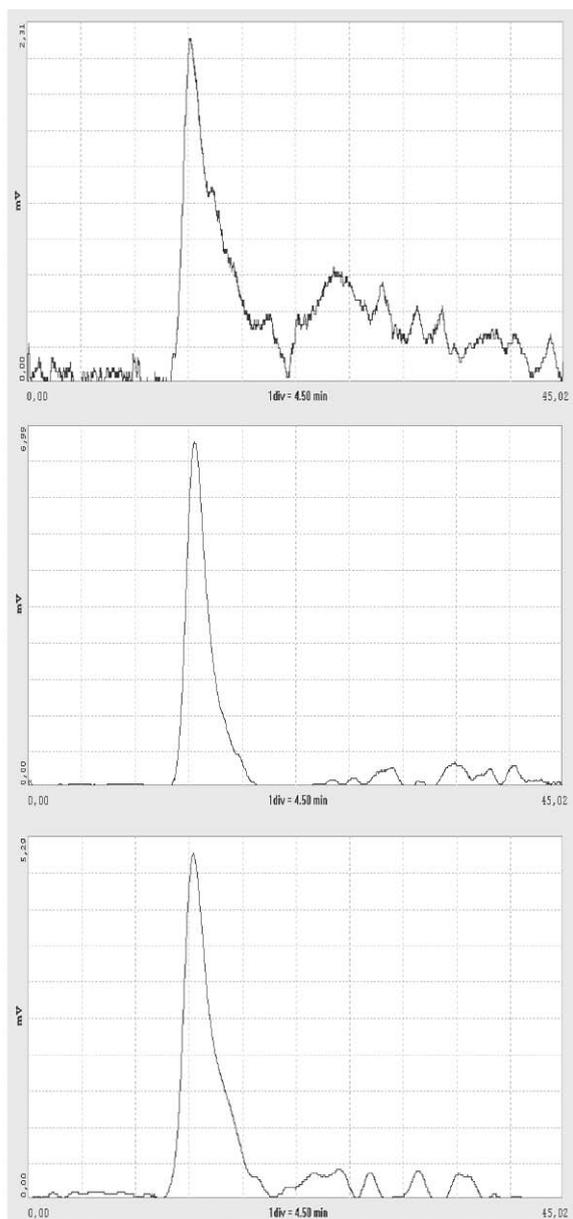


Figura 4. Cromatograma del HPLC realizado al pico colectado en los lotes A-1001, B-1002, C-1003.

Laurent S., Vautherot J. F., Madelaine M.A., Le Gall G., Rasschaert D. 1994. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into virus like particles and induces protection. *J. Virol.*, 68:6794-98.

Liu S.J., Xue H.P., Pu B.Q., Quian N.H. 1984. A new viral disease in rabbits. *Anim. Husb. Vet. Med.*, 16:253-55.

Neilan J.G., Lu Z., Ward G., Lubroth J., Rock D.L., Kutish G.F. 2000. The genome of rabbit hemorrhagic disease virus (Iowa 2000) from North America. EMBL/GenBank/DDBJ databases direct

Toledo M., Seoane G., Serrano E., Encinosa A., Delgado C., González S., Percedo M.E., Chávez P.R., Mesejo V., Fregel N., Crombet H., Díaz-Mulet E., Brook M., Cruz E., 1995. Estudio epizootológico y control de la enfermedad hemorrágica viral del conejo en la República de Cuba. *Rev. Cub. Cienc. Vet.*, 24:5-9.

Agradecimientos

Queremos agradecer al Dr. Francisco Parra, por su apoyo desinteresado en el logro de estos resultados y a ASESCU, por su invitación a participar en este Simposio.

Referencias

Argüello-Villares J.L. 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and immune response. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 10:471-80.

Calvete C. 2006. Modeling the effect of population dynamics on the impact of rabbit hemorrhagic disease. *Conserv. Biol.*, 20(4):1232-41.

Campagnolo E.R., Ernst M.J., Berninger M.L., Gregg D.A., Shumaker T.J., Boghossian A.M. 2003. Outbreak of rabbit hemorrhagic disease in domestic lagomorphs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 223:1151-5.

Capucci L., Frigoli G., Roenshold L., Lavazza A., Brocchi E., Rossi, C. 1995. Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Res.*, 37:221-38.

Cereghino J.L., Cregg J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:45-66.

Chasey D. 1997. Rabbit haemorrhagic disease: the new scourge of *Oryctolagus cuniculus*. *Lab. Anim.*, 31:33-44.

Cooke B.D. 2002. Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, 21:347-58.

Fernández-Fernández M.R., Mourino M., Rivera J., Rodríguez F., Plana-Duran J., Garcia J.A. 2001. Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology*, 280: 283-91.

Gregg D.A., House C., Meyer R., Berninger M. 1991. Viral hemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 10:435-51.

Higgins D.R., Cregg J.M. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. En: Higgins, R.D. y Cregg, M.J. (Eds.) *Pichia protocols*. Humana Press Inc., Towota, pp 1-15.

Evolución de las poblaciones linfocitarias sanguíneas en conejas múltiparas sometidas a dos ritmos reproductivos (destete a los 28 y 42 días postparto)

Evolution of the peripheral blood lymphocyte populations in multiparous rabbit does under two reproductive rhythms (weaning at 28 and 42 days post-partum)

Ferrián S.¹, Guerrero I.¹, Cano J.L.², Pascual J.J.³, Blas E.³, Corpa J.M.^{1*}

¹Dpt. Producción Animal, Sanidad Animal y Ciencia y Tecnología de los Alimentos (Histología y Anatomía Patológica), Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera, Edificio Seminario s/n. 46113 Moncada (Valencia), Spain

²Porcino Teruel S.A, Polígono Industrial La Paz C/M s/n, 44195 Teruel, Spain

³Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46071 Valencia, Spain

*Dirección de contacto: jmcorpa@uch.ceu.es

Resumen

La aparición de la enteropatía epizootica cunícola ha provocado la modificación de los protocolos de destete en las granjas industriales. Los protocolos tradicionales de destete a los 28 días postparto (dpp) están siendo sustituidos por ciclos más largos, ya que se ha observado empíricamente que se produce una reducción en la mortalidad del engorde, probablemente debido al efecto protector de la leche y a un mayor desarrollo del sistema inmune de los gazapos, aunque se desconoce el efecto que tiene en las madres. Por ello, el principal objetivo de este trabajo fue comparar la evolución de las poblaciones linfocitarias en conejas múltiparas, al final de su vida productiva, y sus gazapos bajo dos ritmos reproductivos. Se estudiaron un total de 22 conejas adultas y 44 gazapos, destetados a 28 y 42 dpp. Se tomaron muestras de sangre periférica en diferentes momentos y se evaluaron las poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo. También se midió el espesor de la grasa perirenal para evaluar su condición corporal. En general, las conejas con destete a 28 dpp mostraban un mayor número de diferentes poblaciones linfocitarias en sangre periférica durante el periodo estudiado. Estos resultados fueron independientes de su condición corporal, contrariamente a lo que ocurría en animales destetados a los 42 dpp. Se observaron algunas correlaciones entre la cantidad de linfocitos en las conejas y en sus gazapos en el momento del destete. Los gazapos destetados a 28 dpp mostraban un mayor número de linfocitos CD4⁺ el día del destete que los destetados a los 42 dpp.

Palabras clave: Conejos, poblaciones linfocitarias, sangre periférica, destete, ritmo reproductivo, citometría de flujo.

Abstract

The emergence of a novel pathology that was previously unknown (epizootic rabbit enteropathy) is causing the change in the protocols of weaning in commercial rabbitries. The traditional protocols of weaning at 28 days postpartum (dpp) are being changed by longer periods. This late weaning is an empirical practice for to reduce the mortality during fattening, probably because of the protective role of milk and the development of the immune system of the young rabbits. The main objective of this study was to compare the evolution of peripheral blood lymphocyte populations in multiparous rabbit does and their pups under two reproductive rhythms at the end of their productive life. A total of 22 commercial adult female rabbits and 44 pups, weaned at 28 and 42 dpp, were studied. Samples of peripheral blood were taken in different critical moments and several lymphocytic populations were evaluated with flow cytometry. Additionally, the perirenal fat thickness of does was also measured to evaluate the body condition. In general, rabbit does with weaning at 28 dpp had higher number of different lymphocytic populations in peripheral blood during the studied period. These results were independent of their body condition, contrary to what happened in the animals with weaning at 42dpp. Some correlations between the quantity of lymphocytes in the does and in the weaned pups were observed. The young rabbits weaned at 28 dpp had higher number of CD4⁺ lymphocytes in the weaning date than those weaned at 42 dpp.

Key words: Rabbit, lymphocytic populations, peripheral blood, weaning, reproductive rhythm, flow cytometry.

Introducción

Las enfermedades digestivas son la principal causa de enfermedad y mortalidad en conejos de cebo y son responsables, por lo tanto, de importantes pérdidas económicas en granjas industriales (Marlier et al., 2003). En el año 1997 apareció en Europa un nuevo síndrome gastro-intestinal denominado enteropatía epizootica cunicola y desde entonces este proceso se ha convertido, sin lugar a dudas, en la principal causa de mortalidad en conejos de cebo. Esta enfermedad afecta principalmente a conejos de engorde tras el destete (Licois et al., 2006). Esta es, probablemente, la principal causa por la cual los granjeros están cambiando, desde hace un tiempo, los protocolos de manejo en las granjas industriales. Los protocolos habituales, con destetes a 28 días post parto (dpp) e inseminaciones a 11 dpp, están siendo sustituidos por destetes más tardíos (35-42 dpp, con inseminaciones a 18-25 dpp). La implantación de estos protocolos menos intensivos se basa en la observación empírica de que con ello se logra una reducción de la mortalidad, probablemente debido al efecto protector de la leche (Fortun-Lamothe y Boullier, 2007; Gallois et al., 2007), ya que la lactación se amplía, y a un mayor desarrollo del sistema inmune de los conejos. Sin embargo, este incremento del periodo de lactación podría penalizar las reservas energéticas de las madres. La información sobre las consecuencias que pueden provocar en los animales este cambio de manejo es insuficiente y, por ello, con este estudio se pretende conocer el efecto de la implantación de un protocolo de destete tardío sobre las poblaciones linfocitarias en sangre periférica de conejas múltiparas, al final de su vida productiva.

Material y métodos

Animales

Se estudiaron un total de 22 conejas adultas (*Oryctolagus cuniculus*), de entre 11 y 15 meses de vida. Desde su primer parto, a los 5 meses de vida, se encontraban bajo dos ritmos reproductivos diferentes: 11 conejas eran inseminadas a los 11 dpp, con destetes a 28 dpp (grupo 28D), y las otras 11 eran inseminadas a los 25 dpp, con destetes a 42 dpp (grupo 42D).

Tras el 5º parto, se tomaron muestras de sangre periférica en diferentes momentos. Los animales 28D se muestrearon a los 16 dpp (máxima producción lechera), 28 dpp (destete), 35 dpp (recuperación de reservas energéticas) y 42 dpp (6º parto). Los animales 42D se muestrearon a los 16 dpp, 28 dpp, 42 dpp (destete) y 49 dpp (recuperación de reservas energéticas). También se estudiaron dos gazapos, de cada coneja, en el momento del destete.

Estudios de citometría de flujo

Previamente a realizar los estudios de citometría de flujo se obtuvo el número total de linfocitos mediante un contador celular (Nihon Kohden Celltac alpha MEK-6410). Para los análisis de citometría de flujo se dispensaron 50 mL de sangre completa en tubos de polipropileno en los que se añadieron varios anticuerpos monoclonales primarios (Tabla 1) y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lisaron los eritrocitos añadiendo 1 mL de solución lisante (8,02 g NH₄Cl; 0,84 g NaHCO₃ y 0,37 g EDTA por litro de agua) a 4°C. Tras 5 minutos de incubación en oscuridad las muestras se centrifugaron a 400 x G, durante 5 minutos, a 20°C. El sobrenadante fue cuidadosamente eliminado y el pellet lavado dos veces con 1 mL de PBS. A continuación se añadieron los anticuerpos secundarios (Rat anti-mouse IgG2a+b phycoerythrin y Goat anti-mouse IgM: R. Phycoerythrin -human adsorbed-), que se incubaron, durante 20 minutos, a 20°C, en oscuridad. Por último, se añadió 1 mL de PBS antes de analizar las muestras en el citómetro de flujo (Cytomics FC500- Beckman Coulter, Brea, CA).

Anticuerpos monoclonales	Isotipo	Especificidad	Células	Referencias	Compañía
Mouse anti-rabbit T lymphocytes: FITC	IgG1	Linfocitos T	Células T	Kotani <i>et al.</i> , 1993	Abd Serotec
α-Rabbit pan B	IgM	Linfocitos B	Células B	Davis y Hamilton, 2008	VMRD, Inc.
Mouse anti-rabbit CD4	IgG2a	CD4	Subpoblación de células T	Kotani <i>et al.</i> , 1993	Abd Serotec
α-CD8	IgG2a	CD8	Subpoblación de células T	Davis y Hamilton, 2008	VMRD, Inc.
Mouse anti-rabbit CD25	IgG2b	CD25	Células T activadas	Kotani <i>et al.</i> , 1993	Abd Serotec
Mouse anti-human CD14: FITC	IgG2a	CD14	Monocitos y granulocitos	Jacobsen <i>et al.</i> , 1993	Abd Serotec
α-CD45	IgM	CD45	Todos los leucocitos	Davis y Hamilton, 2008	VMRD, Inc.

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales empleados en este estudio.

Estudios ecográficos

El espesor de la grasa perirenal de las conejas fue medido ecográficamente al parto y al destete para evaluar la condición corporal, como describieron Pascual et al. (2000 y 2004).

Estudios estadísticos

Para analizar la evolución de las poblaciones linfocitarias sanguíneas de las conejas múltiparas se utilizó un modelo mixto (PROC MIXED de SAS; Statistical Analysis System, 2001). El modelo empleado para analizar los datos de las poblaciones linfocitarias sanguíneas de los gazapos al destete fue "Split plot" (PROC GLM de SAS, 2002) que incluía la edad al destete (28 y 42 dpp) como efecto fijo. Por último, la relación entre las poblaciones linfocitarias de las conejas y entre el cambio del espesor de la grasa perirenal y las poblaciones linfocitarias de los gazapos, se realizaron mediante coeficientes de correlación Pearson (ρ) utilizando el PROC CORR de SAS (2001).

Resultados y discusión

En líneas generales y teniendo en cuenta los valores medios, las conejas estudiadas al final de su vida productiva, a diferencia de resultados previos descritos en adultos jóvenes (Jeklova et al., 2007), presentaron una mayor cantidad de linfocitos T ($1191 \times 10^6/L$) que de linfocitos B ($96 \times 10^6/L$). Esta última población celular mostró una gran variabilidad entre individuos. Por otra parte, únicamente el 1,2% de los linfocitos T estaban activados ($CD25^+$), presentando también alta variabilidad entre animales. No obstante, el dato que mostró mayor variabilidad entre conejas fue el cambio del espesor de la grasa perirenal durante la lactación, sobre todo en las conejas 42D.

Las conejas 28D presentaron una mayor número de linfocitos totales (Figura 1), linfocitos T, linfocitos T $CD4^+$ y linfocitos T $CD8^+$ que las conejas 42D ($P=0,003$, $P=0,002$, $P=0,016$ y $P=0,042$, respectivamente). Es decir, los animales sometidos al protocolo de destete a 28 dpp muestran una mayor cantidad de las células que constituyen el núcleo de la respuesta inmune adquirida, coordinando y ejecutando la respuesta del hospedador frente a diferentes agentes infecciosos (Delves et al., 2006) y durante los fenómenos inflamatorios (Ross, 1994).

Respecto a la evolución de los linfocitos totales a lo largo del periodo estudiado, también se detectaron diferencias entre ambos grupos. Las conejas 28D mostraron un incremento de linfocitos totales en el momento del destete (a los 28 dpp) y en el siguiente parto (a los 42 dpp). Se han descrito diferencias en la cantidad de linfocitos a lo largo del ciclo gestación-lactación, produciéndose una disminución de linfocitos a los 24 dpp (Kim et al., 2002), de forma similar a lo que ocurre en las conejas 28D. Por el contrario, las conejas 42D no mostraron diferencias a lo largo del periodo estudiado. Esto podría indicar

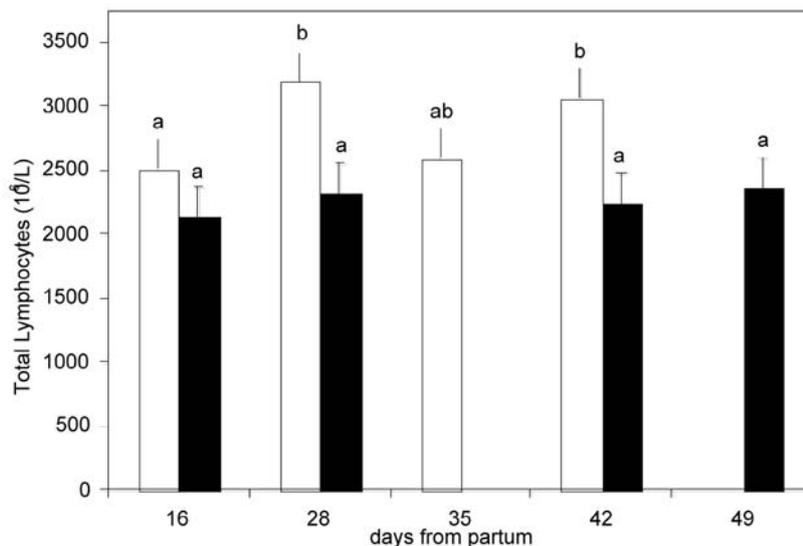


Figura 1. Efecto del ritmo reproductivo (edad de destete a 28□o 42■días) en la evolución de linfocitos totales ($\times 10^6/L$) en sangre periférica de conejas múltiparas. a,b Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

que los animales 42D han sufrido un mayor agotamiento inmunológico, de tal forma que, además de mostrar una menor cantidad de células linfocitarias, no son capaces de modular su cantidad a lo largo del ciclo gestación-lactación, por lo que podrían tener una respuesta deficiente ante infecciones o enfermedades.

Las conejas 28D tenían mayor cantidad de linfocitos T a los 16 y 28 dpp, debido a un incremento de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (sólo significativos a 28 dpp). En momentos trascendentales para los animales como es el día del destete, las conejas 28D también presentaban una mayor cantidad de linfocitos B, T, CD4⁺ y CD8⁺ que las conejas 42D. Estas diferencias desaparecieron una semana después.

Se observaron algunas correlaciones entre la condición corporal y las poblaciones linfocitarias, pero únicamente en las conejas 42D, de tal forma que a mayor espesor de grasa perirenal al parto más elevado era el número de linfocitos totales (R=0,65; P<0,05) y linfocitos B (R=0,82; P<0,001) a los 16 dpp. Igualmente, cuanto menor era la pérdida de espesor de grasa perirenal durante la lactación, mayor era el número de linfocitos T y B una semana después del destete (R=0,79 y 0,70; respectivamente, P<0,05). Estos resultados podrían indicar que estos animales presentan una mayor dependencia de su estado corporal.

Por último, respecto a los gazapos, la única diferencia significativa observada afectaba a la cantidad de linfocitos CD4⁺, que era mayor en los gazapos destetados a los 28 días que a los 42 días (409x10⁶/L vs. 255x10⁶/L; P=0,010). Este resultado es sorprendente ya que los animales destetados con el protocolo tradicional estarían, teóricamente, mejor preparados inmunológicamente para afrontar una infección. También se detectaron algunas correlaciones significativas entre algunas poblaciones linfocitarias de las madres y de los gazapos. Particularmente, el número de linfocitos T de las conejas estaba positivamente correlacionado con el número de linfocitos T (R=0,37, P<0,01), linfocitos T CD4⁺ (R=0,35, P<0,05) y linfocitos T CD8⁺ (R=0,34, P<0,05) de los gazapos y negativamente correlacionado (R=-0,40, P<0,01) con el número de linfocitos activados (CD25⁺).

En conclusión, las conejas sometidas a un destete a los 42 días postparto presentan un menor número tanto de linfocitos totales como de sub-poblaciones linfocitarias, sobre todo en momentos críticos, como el destete, así como menor capacidad de adaptación durante el ciclo gestación-lactación. Este hecho, aparentemente, las hace depender en mayor medida de su condición corporal. Además, contrariamente a lo esperado, sus gazapos tienen un menor número de linfocitos T CD4⁺, que son una pieza fundamental en la coordinación de la respuesta inmune.

Agradecimientos

Este estudio ha sido subvencionado mediante los siguientes proyectos de investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera (Banco Santander/CEU-UCH: Programa Copernicus (PRCEU-UCH/COOP 01/08)), Generalitat Valenciana (ACOMP/2009/207 y ACOMP/2010/062) y la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (AGL2008-00273/GAN), así como por sendas becas de la Universidad CEU Cardenal Herrera y Generalitat Valenciana (Programa Santiago Grisolia).

Bibliografía

- Davis W.C., Hamilton M.J. 2008. Use of flow cytometry to develop and characterize a set of monoclonal antibodies specific for rabbit leukocyte differentiation molecules. *J. Vet. Sci.*, 9:51-66.
- Delves P.J., Martin S.J., Burton D.R., Roitt I.M. 2006. *Inmunología: Fundamentos*. 11ª Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Fortun-Lamothe L., Boullier S. 2007. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livest. Sci.*, 107:1-18.
- Gallois M., Gidenne T., Tasca C., Caubet C., Coudert C., Milon A., Boullier S. 2007. Maternal milk contains antimicrobial factors that protect young rabbits from enteropathogenic *E. coli* infection. *Clin. Vaccine Immunol.*, 14:585-592.
- Jacobsen C.N., Aasted B., Broe M.K., Petersen J.L. 1993. Reactivities of 20 anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 39:461-466.
- Jeklova E., Leva L., Faldyna M. 2007. Lymphoid organ development in rabbits: major lymphocyte subsets. *Dev. Comp. Immunol.*, 31:632-644.
- Kim J.C., Yun H.I., Cha S.W., Kim K.H., Koh W.S., Chung M.K. 2002 Haematological changes during normal pregnancy in New Zealand White rabbits: a longitudinal study. *Comp. Clin. Pathol.*, 11:98-106.
- Kotani M., Yamamura Y., Tamatani T., Kitamura F., Miyasaka M. 1993 Generation and characterization of monoclonal antio-

dies against rabbit CD4, CD5 and CD11a antigens. *J. Immunol. Methods*, 157:241-52.

Licois D., Coudert P., Marlier D. 2006. Epizootic rabbit enteropathy. In: Maertens, L., Coudert, P. (Eds.), *Recent advances in rabbit sciences*, COST 848, ILVO, Melle, Belgium, pp. 163-170.

Marlier D., Dewrée R., Delleur V., Licois D., Lassence C., Poulipoulis A., Vindevogel H. 2003. Description des principales etiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). (In French). *Ann. Méd. Vét.*, 147:385-392.

Pascual J.J., 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.*, 12:7-31.

Pascual J.J., Castella F., Cervera C., Blas E., Fernández-Carmona J. 2000. The use of ultrasound measurement of perirenal fat thickness to estimate changes in body condition of young female rabbits. *Anim. Sci.*, 70:435-442.

Ross R. 1994. The role of T lymphocytes in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2879.

SAS Institute 2001. SAS/STAT® User's Guide (Release 8.2), SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.

Estudio de sensibilidad de cepas de *Pasteurella multocida* en conejos a la tilmicosina entre 2002 y 2008

Study of the sensitivity to tilmicosin of different rabbit strains of Pasteurella multocida between 2002 and 2008

Morel A.¹, Boucher S.², de Paz X.^{1*}, Caamaño M.¹, Manso P.¹

¹ Elanco Animal Health

² Labovet, ZAC de la Buzenière, 85505 Les Herbiers, France

*Dirección de contacto: de_paz_solanes_xavier@lilly.com

Resumen

Desde hace años la tilmicosina se viene utilizando para tratar los casos de pasterelosis en conejos; por este motivo se realizó un estudio para determinar la evolución de la sensibilidad a este macrólido. Entre los años 2002 y 2008 se recogieron muestras de brotes respiratorios en Francia y en los que posteriormente se aisló *Pasteurella multocida*; en total se recogieron 1.902 cepas distintas. Posteriormente se realizó el estudio de sensibilidad de todas las cepas a la tilmicosina. Los datos demuestran que sólo se detecta resistencia basal a la tilmicosina, lo cual demuestra que la resistencia no ha aumentado a lo largo del tiempo.

Palabras clave: Pasteurella multocida, Tilmicosina.

Abstract

Tilmicosin has been used for several years in rabbits to treat respiratory outbreaks due to Pasteurella multocida, and for this reason a study was conducted to determine the evolution of the sensitivity to this antibiotic. During the year 2002 and 2008 samples from different respiratory outbreaks in France were collected in which P. multocida was isolated. Globally 1,902 strains were isolated and later the sensitivity study to tilmicosin was performed. Data confirmed that only basal resistance is detected and there is no increase in the resistance rate during the years.

Key words: Pasteurella multocida, Tilmicosin.

Introducción

La tilmicosina se viene utilizando en la cría de conejos para tratar los casos de pasterelosis desde hace años, antes de que el Pulmotil premix obtuviera una aprobación de uso para conejos.

En colaboración con el laboratorio de análisis que efectúa el mayor número de autopsias de conejos en Francia, Labovet, Elanco puso en marcha un plan de vigilancia de sensibilidad de las cepas de *Pasteurella multocida* a la tilmicosina entre los años 2002 y 2008. Este informe analiza los datos recogidos.

Material y métodos

En la necropsia de los conejos en laboratorio por enfermedades respiratorias, se efectúa una búsqueda de cepas de *Pasteurella multocida* tras la siembra de órganos que presentan lesiones características de pasterelosis.

La lectura de la sensibilidad de sus cepas se efectúa, mediante lectura del diámetro de inhibición en gel de agar sembrado. El laboratorio efectúa una correspondencia entre el diámetro leído y la concentración mínima inhibidora para la tilmicosina de acuerdo con una plantilla.

El laboratorio, Lavovet, trabaja de acuerdo con las buenas prácticas editadas por la Sociedad de Microbiología Francesa, y

testa de modo regular sus métodos con cepas estandarizadas. El laboratorio también posee el certificado COFRAC.

El conjunto de los resultados se presenta por años de aislamiento, naturaleza del órgano de aislamiento de la cepa, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) calculada y número de la cepa conservada en banco de cepas.

Datos recogidos

- Las cepas de *P. multocida* fueron extraídas de animales enfermos llevados al laboratorio para su autopsia entre 2002 y 2008. Se analizaron un total de 1902 cepas de *P. multocida*. El desglose por años aparece detallado en la Tabla 1.
- No existen datos de concentraciones críticas por lo que respecta a la tilmicosina para las Pasterelosis aisladas procedentes de la especie conejo, dadas por el CLSI o la SMF.
- Los valores de concentraciones críticas aplicados para dichas cepas son los datos para *P. multocida* de origen porcino: $\leq 16 \mu\text{g/ml}$ = cepa sensible a la tilmicosina. Esta concentración corresponde a un diámetro de inhibición de 11 mm. $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ = cepa resistente a la tilmicosina. Esta concentración corresponde a un diámetro de inhibición de 10 mm.

Se calculó para cada año la CMI₅₀ (concentración mínima inhibidora del 50% de cepas de una población dada), y la CMI₉₀ (concentración mínima inhibidora del 90% de cepas de una población dada) de la población bacteriana representada por las cepas aisladas.

Resultados y discusión

La Tabla 1 muestra el desglose de las CMI₅₀ y CMI₉₀ calculadas para las cepas aisladas por años.

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Número total de cepas	176	467	239	241	294	233	256
Número de cepas con CMI>32	4	16	7	7	6	15	6
CMI ₅₀	1	2	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125
CMI ₉₀	8	8	4	8	2	4	4
% Resistencia	2,27	3,43	2,93	2,90	2,04	6,44	2,34

Tabla 1. Desglose de las CMI₅₀ y CMI₉₀ calculadas para las cepas aisladas por años.

- Los datos demuestran que las CMI de tilmicosina frente a *P. multocida* se han mantenido estables, siendo los valores de la CMI₅₀ y la CMI₉₀ constantes desde 2004.
- De igual modo, el porcentaje de aislamientos de *P. multocida* resistentes a tilmicosina se han mantenido por debajo del 5%, con la excepción de las muestras de 2007 en las que se describió un porcentaje de resistencias del 6,4%.
- Este bajo nivel de resistencias es el esperado en cualquier muestra de gran tamaño y se considera el valor de resistencia basal inferior al 5%.
- El aumento de resistencias observado en 2007 y los valores ligeramente elevados de CMI₅₀ y CMI₉₀ en los años 2002 y 2003 pueden deberse a varias razones, pero las explicaciones más probables podrían ser:
 - Las muestras se originan en una única granja o región, por tanto, se están analizando aislamientos clonales.
 - Los aislamientos se han obtenido a partir de un clon endémico resistente de *P. multocida* que evolucionó de forma transitoria, ya que con posterioridad no se han vuelto a detectar valores de CIM o porcentajes de resistencia con un valor similar elevado.

Conclusiones

- Los datos, recopilados a lo largo de 8 años en las cepas de *P. multocida* procedentes de conejos, demuestran claramente que sólo se detecta resistencia basal a la tilmicosina.
- Este valor basal es el esperado en cualquier muestra de gran tamaño. Esta afirmación se apoya en el hecho de que la resistencia no ha aumentado a lo largo del tiempo.
- Los datos apoyan el uso de tilmicosina para el tratamiento de la enfermedad respiratoria del conejo causada por *P. multocida*, sin riesgo de aparición de resistencias.

Distribución pulmonar de la tilmicosina (Pulmotil-Elanco) en el conejo después de la administración oral

Pulmonary disposition study of tilmicosin (Pulmotil AC, Elanco) after repeat oral bolus administration to rabbits

Lucatello L.¹, Gallina G.¹, Drigo I.², Cocchi M.², Scandurra S.³, de Paz X.^{3*}, Caamaño M.³, Manso P.³, Agnoletti F.², Montesissa C.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova, Italy

²Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Treviso, Italy

³Elanco Animal Health

*Dirección de contacto: de_paz_solanes_xavier@lilly.com

Resumen

Dos grupos (grupo I y II) de cuatro conejos sanos New Zealand, recibieron tilmicosina (TIM) por vía oral a una dosis de 12,5mg/kg de PV; el primer grupo de conejos recibió la tilmicosina durante 2 días y el segundo grupo durante 5 días consecutivos. Otros tres grupos (grupos III, IV y V) de cuatro conejos recibieron la misma dosis de TIM durante 7 días consecutivos. Dos horas después de la última dosis todos los conejos de los grupos I, II y III fueron sacrificados mientras que los conejos del grupo IV fueron sacrificados un día después y los del grupo V se sacrificaron 3 días después. En todos los animales se tomaron muestras de plasma, macrófagos alveolares y tejido pulmonar para determinar la concentración de TIM. Las concentraciones medias de TIM en el pulmón y en los macrófagos alveolares fueron más altas que en el plasma; 7 y 400 veces más a partir del segundo día de tratamiento. Los niveles de TIM bajaron en el plasma y en pulmón bajaron a partir del cese del tratamiento pero se mantuvieron elevados en los macrófagos alveolares incluso tres días después. En conclusión, después de la administración oral de tilmicosina se observa una gran acumulación en el tejido pulmonar y especialmente en los macrófagos alveolares y, como es de esperar al tratarse de un macrólido, excediendo en gran medida las concentraciones detectadas en plasma.

Palabras clave: Tilmicosina, macrófagos alveolares.

Abstract

Two groups of four non-infected New Zealand rabbits, received tilmicosin (TIM) by oral gavage at 12.5 mg/kg of body weight, daily, for 2 and 5 consecutive days, respectively, while three groups of four rabbits received the same dose of TIM for 7 days. Two hours after the last dose, all rabbits from groups treated for 2, 5 and 7 days were sacrificed. Other two groups treated for seven days were sacrificed during the 1st day and the 3rd day of withdrawal. At each time of sacrifice, plasma samples, alveolar macrophages (PAM) obtained by bronchoalveolar lavage and lung tissue were collected from each animal. TIM concentrations in PAM were calculated based on the macrophage cell volume. Mean tilmicosin concentrations in lung tissue and PAM were high in TIM-treated animals, already at the second day of treatment, exceeding concurrent plasma levels by 7 and 400-fold, respectively. Among the different days of sacrifice, the highest concentrations were found at the 3rd day-treated animals. TIM concentrations declined in plasma and lung tissue to significantly lower level already at the first day of withdrawal, while PAM concentrations remained high also after three days of withdrawal. In conclusion, after daily dosing TIM showed prominent accumulation in lung tissue and PAM, already from the second day, with by far lower concentrations in plasma, as expected for a macrolide compound.

Key words: Tilmicosin, Alveolar macrophages.

Introducción

La tilmicosina (TIM) es un antibiótico semisintético de la clase de los macrólidos cuyo uso está aprobado en veterinaria en animales de producción para combatir las infecciones respiratorias (Clark y cols., 2004). En efecto, la tilmicosina presenta actividad *in vitro* contra varias bacterias Gram- asociadas a enfermedades respiratorias como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*, y también contra micoplasmas. Los estudios clínicos efectuados en lechones y terneros han confirmado la eficacia del tratamiento con TIM por vía oral contra los patógenos pulmonares y su ca-

pacidad de modular el proceso inflamatorio al reducir los mediadores de la inflamación en el tejido pulmonar. Dicho efecto está relacionado con la capacidad de los macrófagos alveolares (MA) de acumular la TIM a nivel intracelular con concentraciones más elevadas que las alcanzadas en suero, como consecuencia de un fenómeno de atrapamiento iónico que se produce por las importantes diferencias de pH que existen entre el suero y el entorno intracelular del macrófago (Baldwin y cols., 1990; Conte y cols., 1995; Groll y cols., 2006).

En consecuencia, se han efectuado estudios en ese sentido con el objetivo de verificar la idoneidad de la administración oral en conejos de un medicamento con tilmicosina (Pulmotil AC, Elanco).

El objetivo del estudio fue evaluar las características de la distribución pulmonar (tejido pulmonar y macrófagos alveolares) de la tilmicosina y verificar que la posología adoptada es la adecuada, comparando para ello las concentraciones que se alcanzan en pulmón, macrófagos alveolares y plasma con respecto a los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las principales cepas de microorganismos patógenos.

Material y métodos

Doce conejos New Zealand (divididos en 3 grupos de 4 animales cada uno de ellos) recibieron tratamiento diariamente por vía oral durante 2, 5 y 7 días con una dosis única de TIM (Pulmotil AC, Elanco) equivalente a 12,5 mg/kg. La distribución de tilmicosina en plasma, macrófagos alveolares (obtenidos mediante el lavado broncoalveolar) y pulmón se estudió en los animales sacrificados 2 horas después de la última dosis. Otros dos grupos de conejos que habían recibido la misma dosis de TIM durante 7 días y fueron sacrificados después de 1 y 3 días tras la suspensión del tratamiento, para la obtención de los tejidos.

El análisis cualitativo y cuantitativo de la TIM en el pulmón, plasma y macrófagos alveolares se realizó tras la extracción mediante un disolvente orgánico, purificación de los extractos mediante extracción en fase sólida (EFS con columna STRATA-X, Phenomenex), separación cromatográfica con elución con gradiente (columna ZORBAX ECLIPSE PLUS C18, flujo 1 ml/min) y lectura mediante un equipo UV-VIS configurado a 287 nm.

Resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que 24 horas después del tratamiento la concentración media de TIM en plasma está por debajo del límite de cuantificación (LDC) del método analítico (0,06 µg/ml), mientras que en el pulmón y los MA las concentraciones se mantienen elevadas durante más tiempo (Tabla 1).

El estudio de la distribución revela que las concentraciones de TIM presentes en los pulmones y los MA, a igualdad de días de tratamiento, son hasta 7 y 400 veces mayores que las alcanzadas en plasma.

	plasma (µg/ml)	DE	pulmón (µg/ml)	DE	MA (µg/ml)	DE
2 d	0,249	0,034	1,293	0,467	93,867	32,330
5 d	0,402	0,091	2,686	0,732	147,025	77,021
7 d	0,269	0,031	2,181	0,807	115,174	69,586
1 dS	0,053	0,037	0,733	0,145	136,584	62,215
3 dS	0,095	0,081	0,146	0,092	43,884	12,967

Tabla 1. Concentraciones medias (µg/ml) de tilmicosina en plasma, pulmones y macrófagos alveolares (MA) con sus desviaciones estándar (DE) correspondientes después de 2, 5 y 7 días de tratamiento (2 d, 5 d y 7 d) y después de 1 y 3 días de suspensión del tratamiento (1 dS y 3 dS).

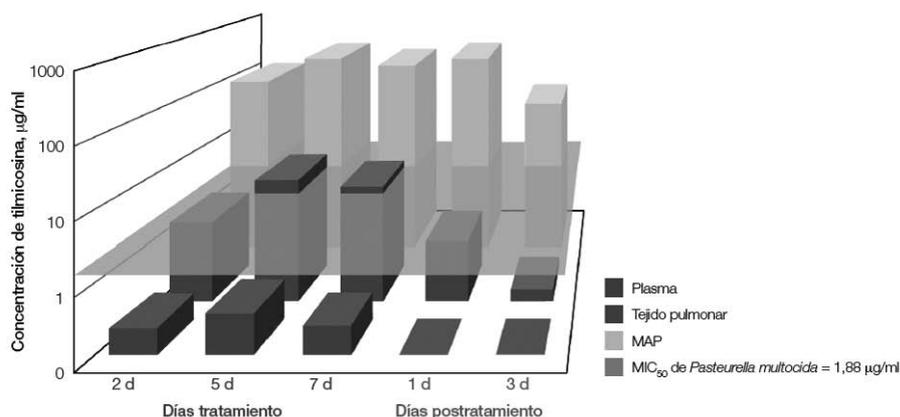


Figura 1. Histograma en escala logarítmica de las concentraciones medias ($\mu\text{g/ml}$) de tilmicosina en plasma, pulmón y macrófagos alveolares (MA) después de 2, 5 y 7 días de tratamiento (2 d, 5 d y 7 d) y después de 1 y 3 días tras la suspensión del tratamiento (1 d, 3 d). En color verde se representa el valor de la CMI50 registrado de *Pasteurella multocida* = 2 $\mu\text{g/ml}$...

Conclusiones

En consecuencia, el presente estudio confirma la capacidad de la tilmicosina de concentrarse preferentemente en el tejido pulmonar (Fedrizzi y cols., 2008) y en los macrófagos alveolares, y de mantener concentraciones por encima de la CMI incluso después de 2 días tras la suspensión del tratamiento (Figura 1). De esta forma, se confirma que la dosis y el periodo de tratamiento elegido (12,5 mg/kg durante 7 días) son los adecuados en presencia de infecciones respiratorias provocadas por patógenos sensibles al fármaco y cuya CMI sea $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ (Baselga y cols., 2006).

Bibliografía

- Baldwin D.R., Wise R., Andrews J.M., Ashby J.P., Honeybourne D. 1990. Azithromycin concentrations at the sites of pulmonary infection. *Eur. Respir. J.*, 3:886-890.
- Baselga J.M. 2006. Internal Study T5CRSP0602, Elanco.
- Clark C., Woodbury M., Dowling P., Ross S., Boison J.O. 2004. A preliminary investigation of the disposition of tilmicosin residues in elk tissues and serum. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 27:385-387.
- Conte Jr. J.R., Golden J.A., Duncan S., McKenna E., Zurlinden E. 1995. Intrapulmonary pharmacokinetics of clarithromycin and of erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:334-338.
- Fedrizzi G., Accurso D., Scandurra S., Montesissa C. 2008. Kinetic of tilmicosin after per os administration to rabbits. *Proc. 4th AAVM Conference, Prague.*
- Groll A.H., Lyman C.A., Petraitis V., Petraitiene R., Armstrong D., Mickiene D., Alfaro R.M., Schaufele, R.L., Sein T., Bacher J., Walsh, T.J. 2006. Compartmentalized intrapulmonary Pharmacokinetics of Amphotericin B and its lipid formulations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50:3418-3423.

El examen serológico con muestras de sangre obtenidas en papel de filtro

The serological test of blood samples obtained on filter paper

Villa Espinosa A., Pueyo Pintor R., Navarro Serrano A., Baselga J.M., Baselga R.*

EXOPOL, Pol. Río Gállego, calle D, Parcela 8, 50840 San Mateo de Gállego (Zaragoza), España. Tel. 976 694525

Dirección de contacto: exopol@exopol.com

www.exopol.com

Resumen

Se ha puesto a punto una técnica de obtención de sangre total en papel filtro para pesquisas serológicas de enfermedades de los conejos: RHD; *Encephalitozoon*; *Chlamydias* spp y Mixomatosis y se propone como alternativa de muestreo para la determinación de anticuerpos, por ser un método sencillo y no requerir de muchos cuidados en el envío al laboratorio. Se evaluaron 94 muestras de suero de conejos llegados al laboratorio para el diagnóstico de las entidades antes citadas. Los resultados serológicos de las muestras de sangre total obtenida por venopunción y en papel filtro fueron comparados. Los métodos empleados incluyeron: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para detectar IgG, Carbón inmunoensayo (CIA) e Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) para detectar anticuerpos totales. Los resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos obtenidos en este trabajo son satisfactorios y nos permiten decir, que la toma y el transporte de muestras de sangre en papel de filtro es una técnica útil y exacta para realizar estudios seroepidemiológicos en conejos.

Palabras clave: Conejos, Serología, Tarjeta papel.

Abstract

It has been developed a technique for obtaining whole blood on filter paper for serological investigation of diseases of rabbits: RHD; Encephalitozoon, Chlamydia spp and Myxomatosis. This paper proposes a simple alternative to sampling for the determination of antibodies in rabbits that in addition does not require much care in sending to the laboratory. We have evaluated 94 samples of serum from rabbits arrived at the laboratory for the diagnosis of the entities mentioned above. The results of serological testing of samples obtained by venipuncture whole blood and filter paper were compared. The methods used included: Indirect immunofluorescence (IIF) to detect IgG, carbon immunoassay (CIA) and hemagglutination inhibition (HI) to detect total antibodies. The overall sensitivity, specificity and positive and negative predictive values obtained in this work are satisfactory and enable us to say that the taking and transportation of blood samples on filter paper is a useful and accurate for seroepidemiological studies in rabbits.

Key words: Rabbits, Serology, Filter paper.

Introducción

Los ensayos serológicos pueden tener dos objetivos diferentes: el diagnóstico de una infección y/o el establecimiento del estado inmunitario. Se puede establecer que las determinaciones realizadas sobre una única dilución, para el screening o cribado, generan de forma fiable resultados cualitativos (positivo/negativo), que son considerados suficientes en la mayoría de las ocasiones (OIE, 2008; Aguiar Merino et al., 2009), tanto para el dictamen de diagnóstico (IgM e IgG), como el estado inmunitario (IgG y anticuerpos totales). Las determinaciones cuantitativas son de aplicación cuando se analizan muestras papeadas, al objeto de demostrar la seroconversión o variaciones significativas en el título de anticuerpos (OIE, 2008).

En los conejos, el análisis serológico es de gran importancia para el diagnóstico, prevención y vigilancia de enfermedades de diversas etiologías. La respuesta humoral es predictiva del nivel de protección frente a las infecciones, para la valoración de los títulos de anticuerpos calostrales y post vacunales y tiene un destacado valor en la investigación de animales centinelas de áreas vacunadas de Mixomatosis y RHDV, en el comercio de semen de animales reproductores seleccionados como no portadores de *Chlamydias* y *Encephalitozoon* entre otros (Rosell et al., 2000).

En la práctica veterinaria, para realizar programas de prevención de enfermedades de micro mamíferos y en especial lagomorfos, el screening serológico requiere la extracción de sangre venosa, la cual puede ser difícil de obtener cuando los pesquises son a mediana y a gran escala por la dificultad de hacer sangrías de calidad y obtener un volumen suficiente de muestra.

El objetivo del presente trabajo, fue evaluar la metodología de toma muestras de sangre en papel de filtro y compararla con muestras de sangre obtenidas por venopunción, para realizar pruebas serológicas de detección de anticuerpos.

Material y métodos

Las extracciones de sangre se llevaron a cabo por separado: con jeringa (obtención de suero de forma convencional, coagulación y centrifugación) y mediante goteo sobre papel de filtro. Las muestras de sangre depositadas y secas expuestas a temperatura ambiente dentro del laboratorio, se emplearon para preparar los eluatos.

Las muestra de suero y los eluatos se conservaron congelados a -20° C.

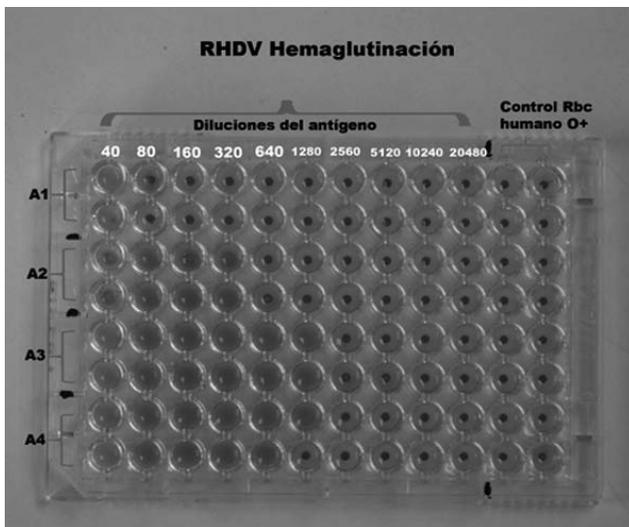


Figura 1. HA. Obsérvese los títulos de los preparados antigénicos empleados títulos > 160. Ej.: muestras A2, A3, A4

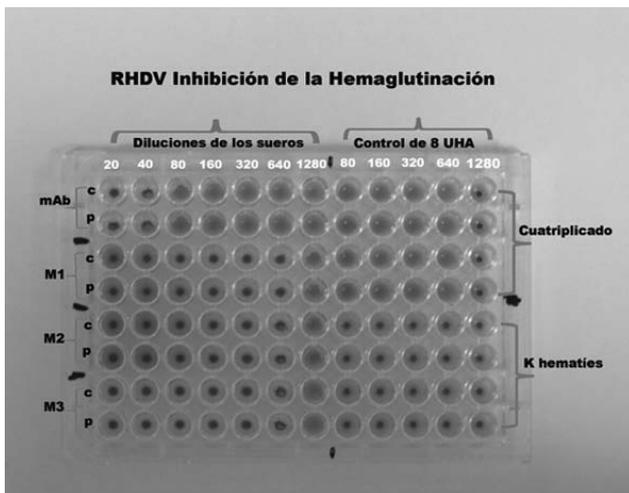


Figura 1. IHA. Los títulos de anticuerpos alcanzados por los eluatos del papel de filtro fueron similares o un logaritmo menor que los obtenidos con sueros de venapunción. Obsérvese M1, M2, M3 títulos de anticuerpo = 640. Control positivo anti VP 60 = 40.

Los donantes de sangre fueron 94 conejos llegados al laboratorio de diagnóstico con o sin síntomas de enfermedad clínica relacionada con el estudio serológico de Enfermedad Hemorrágica Viral (RHD), *Encephalitozoon cuniculi*, (EC), Mixomatosis (RMV) y *Chlamydia* spp. Los sueros y los eluatos del papel de filtro que contenían muestras de los mismos animales se compararon intra ensayos. Se consideró reactiva aquella muestra positiva al menos en una de las técnicas de muestreo empleada frente a sueros positivos de centros de referencia autorizados.

Los resultados obtenidos fueron evaluados en sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo.

1.- Hemaglutinación-Inhibición. La inhibición de la hemaglutinación (IHA) se realizó en frío, según recomendación de la OIE (2008) con RBCs humano grupo O+, sueros inactivados a 56° 30 minutos y tratados dos veces con Caolín. La elución del papel filtro se realizó con 450 µl de PBS 0,02 M pH 6,5 a 4°C durante toda la noche. Se eliminó el papel de filtro y se agregó 500 µl de caolín al 25% al eluido, con agitación ocasional durante 30min a temperatura ambiente para eliminar los inhibidores inespecíficos y se centrifugaron a 450g durante 30min, obteniendo una dilución final de 1:20. El antígeno utilizado en la prueba IHA fue obtenido a partir de pools de hígados homogenizados y clarificados de animales con enfermedad clínica y títulos hemaglutinantes > 640.

Las diluciones de cada suero se enfrentaron a 8 unidades hemaglutinantes del virus y los resultados se compararon con los ensayos de eluidos de la sangre de papel de filtro que contenía muestras de los mismos animales. El título asignado fue la mayor dilución capaz de inhibir la hemaglutinación (8 UHA /25 µl) provocada por el antígeno viral. El valor diagnóstico de los reactores positivos se consideró ≥ 20. El control positivo fue el anticuerpo monoclonal anti VP60 de Ingenasa.

2.- Inmuno-carbón (CIA): para la detección y verificación de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi*, se utilizó el Kit de Medicago que emplea antígeno de células completas de *E. cuniculi* mezcladas con una suspensión de carbón.

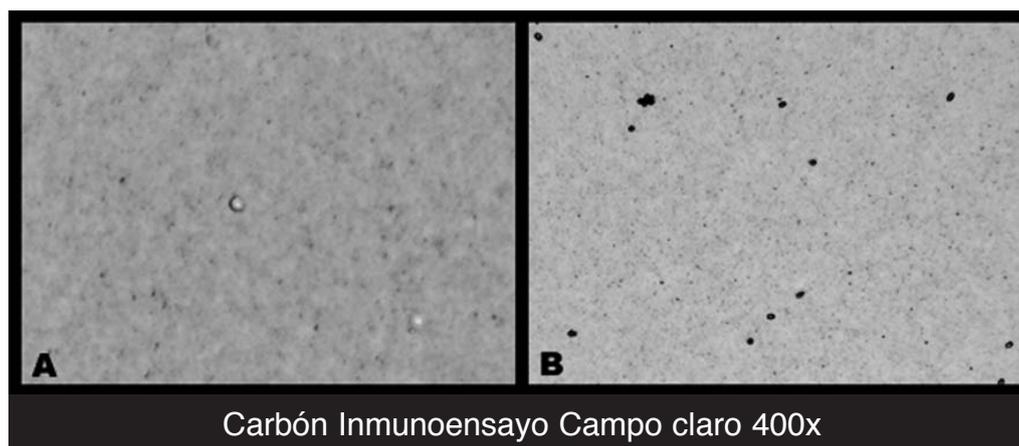


Figura 3. CIA. La intensidad de reacción de los eluatos del papel de filtro en la dilución de screening fue similar a la obtenida con sueros de venapunción. Observase la morfología de *E. cuniculi* y la fuerte reacción con el carbón. Cuantía mínima del reactor positivo = 10 parásitos X campo en dilución $\geq 1:40$

La elución del papel filtro se realizó con 450 μ l de PBS 0,02 M pH 7,2. El valor diagnóstico de los reactores positivos se consideró en screening ≥ 40 y más de 10 de *E. cuniculi* marcados en negro por campo de 400x en la observación microscópica. Sueros de conejos naturalmente infectados de Megacord / Eurovet, se emplearon como control positivo.

3.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se empleó para detectar anticuerpos de tipo IgG de Mixomatosis y Chlamydias en screening, la elución de los discos de papel filtro absorbidos con sangre se realizó con 2 ml PBS 0,02M pH 7,2 y albúmina bovina fracción V al 0,5% a 4°C durante toda la noche, obteniendo una dilución de 1:100.

Para la serología de estas entidades se empleó antígeno laminar. En Mixomatosis consistió de la cepa homóloga Lausanne cultivada in vitro y un anticuerpo policlonal de INRA, Francia, como control positivo. En *Chlamydia psittaci*, el antígeno laminar era de Eurovet y el control positivo policlonal C. género específico de BIOTREND. En ambos casos la conjugación se efectuó con el anticuerpo policlonal anti conejo FITC de SIGMA F-1262.

Resultados y discusión

En casi todas las especies, el plasma normalmente representa el 55% del volumen sanguíneo (dependiendo del hematocrito) y el suero es aproximadamente el 40% del plasma. En este trabajo empleamos un área de muestra de 2,8 cm² de papel de filtro para 50 μ l de sangre seca.

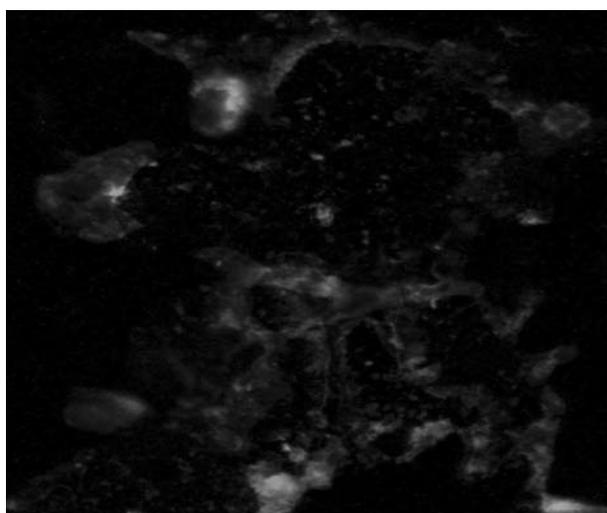


Figura 4. *Chlamydia psittaci*. Reactores positivos ≥ 100 . Obsérvese la inmunofluorescencia verde amarilla con localización extra e intra citoplasmática de los cuerpos elementales.

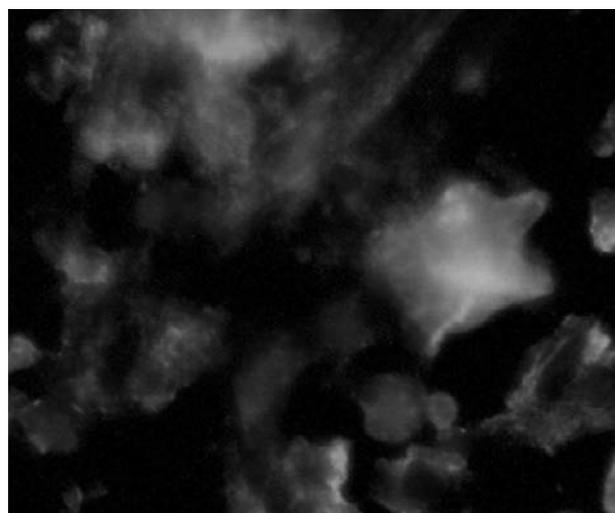


Figura 5. Reactor positivo a Mixomatosis ≥ 100 . Inmunofluorescencia de localización intracitoplasmática. 400 x.

Las preguntas que debíamos responder eran sobre la seguridad de las pruebas diagnósticas. ¿Con qué seguridad la toma de muestra sobre papel de filtro predecirá la presencia o ausencia de la enfermedad?. Ante un resultado positivo ¿Qué probabilidad existía de que ese resultado indicase presencia de la enfermedad?

La seguridad viene determinada por el valor predictivo (validez predictiva) de un resultado positivo o negativo y es de enorme utilidad a la hora de tomar decisiones clínicas y transmitir la información sobre el diagnóstico.

$$\text{Valor predictivo positivo VPP} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FP}$$

$$\text{Valor predictivo negativo VPN} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FN}$$

Consideramos VP y VN a los resultados obtenidos con el muestreo por venopunción y FP y FN a los resultados discordantes obtenidos con los eluatos.

En IHA se obtuvieron 32 muestras reactivas de las cuales 31 fueron reactivas por las 2 técnicas. Esto arrojó VPP (32/32) con VPN (10/11).

En CIA, 10 muestras fueron reactivas de las que 8 coincidieron en ambos muestreos para VPP (10/10) y VPN (18/20). En IFI el nivel de coincidencia fue de 100%. La sensibilidad y especificidad relativa del muestreo sobre papel de filtro también fue calculada.

$$\text{Especificidad} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FP}$$

$$\text{Sensibilidad} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FN}$$

En la tabla 1 se muestran los valores predictivos obtenidos en cada prueba cuando los muestreos fueron comparados. La especificidad y sensibilidad del conjunto de los ensayos sobre papel de filtro fue de 100% y 93% respectivamente. Ver tabla 2.

El muestreo de la sangre sobre papel de filtro, ha sido avalado por varios autores que han encontrado un alto valor de concordancia de los resultados y por ello es ampliamente utilizado para realizar encuestas seroepidemiológicas de Trypanosomiasis (Chagas) (Marinkelle et al., 1978; Altcheh, 2007; Serrano et al., 2008), Dengue (García et al., 1997), HTLV 1 (Fortes

Entidad	Ensayo	Muestras	Positivas		Negativas		VPP	VPN
			Papel	Sueros	Papel	Sueros		
RHD	IHA	42	31	32	11	10	1	0,9
EC	CIA	28	8	10	20	18	0,83	0,9
Mixomatosis	IFI	12	12	12	0	0	1	1
Chlamydias	IFI	12	2	2	10	10	1	1

RHD: Enfermedad hemorrágica viral. EC: *Encephalitozoon cuniculi*. VPP: Valor predictivo positivo. VPN: Valor predictivo negativo. IHA: Inhibición de la hemaglutinación. CIA: Inmuno-carbon. IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

Tabla 1. Muestreo con sangría convencional y con papel de filtro.

Suero	Positivo	Negativo	Indeterminado	Total	Validez
Papel de filtro					
Positivo	53	0	0	53	Especificidad 100%
Negativo	3	38	0	41	Sensibilidad 94,9%
Total	56	38	0	94	

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad del muestreo sobre papel de filtro.

et al., 1989; Preux et al., 1998) y resulta de especial utilidad en el diagnóstico de enfermedades genéticas (Aguilar Merino et al., 2009) y en pesquisajes de identificación de individuos con biología molecular (Penacino, 1997).

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron satisfactorios y significan que la toma y el transporte de muestras de sangre en papel de filtro es una técnica útil y exacta para realizar estudios epidemiológicos en que se analizan anticuerpos contra as entidades RHD, Mixomatosis y Chlamydias en conejos. Además, la muestra de sangre seca sobre papel de filtro, permite reducir costes en la extracción, envío y almacenamiento (Serrano et al., 2008) por lo que debe estar estandarizada (Aguilar Merino et al., 2009).

Bibliografía

Aguilar Merino J.M., Cercenado Mansilla E., de Ori Manchón F., Rojo Martín M.D., de la Rosa Fraile M. 2009. Procedimientos en Microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editores Emilia Cercenado y Rafael Cantón. www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap32.asp#1c

Altchek J. y colaboradores. 2007. Prevalencia de la enfermedad de Chagas en niños y mujeres asistidos en centros de atención primaria de la salud de la ciudad autónoma de Buenos Aires. www.bvs.pedriatia.org.ar/premios/chagas_2007.doc

Fortes P., Menitove J., Ross A., Steece R., Cabrian K., Ferrera C., Perkins P.A., Sturge J., Lealos R., Krieger M.S. 1989. Evaluation of blood collected on filter paper for detection of antibodies to Human Immunodeficiency Virus type 1. *J. Clin. Microbiol.*, 27:1380-1381.

García M., Cabeza C., Callahan J., Yana B., Gutiérrez V., Ortiz A., Anaya E. 1997. Determinación de IgG y anticuerpos totales contra el Virus Dengue, en muestras obtenidas en papel filtro. *Rev. Med. Exp. INS*, 14(1):45-49.

Marinkelle C.J., Sánchez N., Grögl M., Guhl F. 1978. Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel de filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de la infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 20(2):112-114.

OIE. 2008. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals*. Vol. 2. Sección 2. 6. Sixth Edition.

Penacino AG. 1997. Investigación e implementación de sistemas de identificación de individuos por técnicas de biología molecular, con especial referencia a los estudios post-mortem. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. www.wwicorp.com/tesis

Preux P.M., Houinato D.S., Nzisabira L., Verdeir M., Dumas M. 1998. The validity of filter paper blood sampling for the detection of HTLV-1 seropositivity: A Benin study. *Afr. J. Neurol. Sci.*, Vol. 17, N° 12.

Rosell J.M., de la Fuente L.F., García Jiménez F., Gracia E., Baselga R. 2000. Enfermedades de la reproducción: conejas. En: Rosell J.M. (coord.). *Enfermedades del Conejo*. Tomo II. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp.: 71-122.

Serrano O., Mendoza F., Suárez B., Soto A. 2008. Seroepidemiology of Chagas disease in two rural populations in the municipality of Costa de Oro, at Aragua State, northern Venezuela. *Biomédica*, 28(1):108-115.

UNA PROPUESTA PARA CONTROLAR LA CALIDAD DEL SEMEN DE CONEJO

Rafael Baselga. EXOPOL. Pol. Río Gállego, calle D, Parcela 8, 50840 – San Mateo de Gállego. Zaragoza. España. Tel 976694525, exopol@exopol.com - www.exopol.com

Control de machos de inseminación

- Ningún semental debe ser seropositivo a *Chlamydia* o *Encephalitozoon* porque no se vacunan.
- Los machos sí se vacunan frente a Mixomatosis y RHDV y son seropositivos, pero podemos controlar la ausencia de circulación viral con animales centinelas que quedan sin vacunar pero identificados (las vacunas vivas pueden circular entre animales, pero esto es poco frecuente).

La propuesta de control es analizar cada mes al menos 20-25 animales tomados aleatoriamente frente a *Chlamydia* y *Encephalitozoon* y analizar los centinelas frente mixomatosis y RHDV.

Un centro de inseminación puede certificar a sus clientes que sus sementales están libres de infección si un veterinario independiente se responsabiliza del muestreo de los animales del centro y un laboratorio independiente certifica los resultados analíticos.

Control de hembras

- Se puede emplear la misma técnica con las hembras en producción, donde también se pueden tener hembras centinela.

CAPITULO 2

REPRODUCCIÓN

COGAL, un nuevo método en la I.A. en cunicultura

COGAL, a new method of A.I. in rabbit farming

Sánchez del Cueto M.¹, Gullón J.¹, Prieto M.C.¹, Quintela L.A.², Hernández-Gil R.³

¹ COGAL Soc. Coop. Gallega. Rodeiro (Pontevedra)

² Dpto. Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo

³ Kubus S.A. Madrid

*Dirección de contacto: cogalvet@cogal.net

Resumen

La inseminación artificial en cunicultura aparece como técnica de manejo en los años 90. A lo largo de estos años ha ido evolucionando de manera positiva a favor de los resultados productivos y de aplicación de las dosis seminales. Uno de los grandes avances ha sido la sustitución del uso de la GnRH intramuscular por el intravaginal que da lugar a una serie de ventajas sanitarias, de manejo de productos hormonales, de mano de obra y de bienestar de las conejas. En el siguiente trabajo se explica la transposición de los estudios experimentales a las granjas industriales, dando lugar a un nuevo método de inseminación artificial en cunicultura.

Palabras clave: Inseminación artificial, reproducción, dosis seminales, hormona GnRH.

Abstract

Artificial insemination in rabbit farming appeared as a management technique in the 90's. During these years it has been evolving on a positive manner in favour of the productive results and in relation to the application of insemination doses. One of the greatest advances has been the replacement of the use of intramuscular GnRH by intravaginal one, resulting in a number of benefits in terms of health, management of hormonal products, labour and welfare of rabbits. In this paper it is explained the implementation of the pilot studies at industrial farms, leading to a new method of artificial insemination in rabbit farming.

Key words: Artificial insemination, reproduction, insemination doses, GnRH hormone.

Un poco de historia...

La inseminación artificial en cunicultura se consolida a partir de los años 90 como una herramienta imprescindible en el manejo de una granja industrial. Esto significa que llevamos unos 15 años trabajando con este sistema de producción y, se podría asegurar que el 95 % de los conejos sacrificados en España provienen de la Inseminación Artificial.

Como es lógico, a lo largo de este periodo de tiempo la técnica de Inseminación ha experimentado una serie de cambios importantes, que nos han permitido mejorar tanto en los resultados de fertilidad como en la facilidad de manejo. En este sentido podemos citar:

- El diluyente de semen (permite una conservación más larga).
- Las cánulas de inseminación (del uso del cristal pasamos a las desechables).
- El transporte (nos permite hacer envíos a distancias relativamente largas).
- Etc.

Manejo de hormonas en I.A.

En Inseminación Artificial en cunicultura es necesario el uso de dos tipos de hormonas:

- PMSG
 - Inducción del celo.
 - Uso opcional.
- GnRH
 - Inducción de la ovulación.
 - Imprescindible en cunicultura.

Estas dos hormonas son de aplicación parenteral, lo que supone un coste importante en cuanto a mano de obra, debido a que hay que pinchar todas las conejas que vamos a inseminar dos veces y una de ellas (GnRH) intramuscular.

Si somos capaces de eliminar la aplicación de ambas hormonas, conseguimos reducir considerablemente el tiempo de inseminación y, por lo tanto optimizamos la mano de obra.

Vamos a centrarnos en la eliminación de la GnRH, ya que el uso o no de la PMSG sería objeto de otro trabajo.

La GnRH es una hormona imprescindible en la inseminación artificial puesto que la coneja es un animal de ovulación inducida y ésta sólo se produce si es cubierta por el macho. Para sustituir el efecto del macho debemos de suministrar a la coneja GnRH, hasta ahora por vía parenteral, intramuscular.

En el año 2007, Cogal y el Dpto. de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo (Quintela y col.) llevan a cabo con éxito un trabajo titulado "Inducción de la ovulación en conejas mediante la administración intravaginal de diferentes análogos de la GnRH".

A partir de este momento somos conscientes de que la administración de la GnRH intravaginal es totalmente viable, eliminando así la inyección en el momento de inseminar.

En el año 2009 hemos conseguido dar forma legal a este proyecto y que por fin los ganaderos se puedan beneficiar de este novedoso sistema de inseminación.

Ventajas del nuevo método de I.A.

SANITARIAS

Se evitan posibles contagios de enfermedades por vía parenteral debido al uso de una misma aguja en varios animales.

MANEJO PRODUCTOS

Errores de manipulación en la aplicación de la GnRH.

MANO DE OBRA

Al simplificarse la aplicación de la dosis seminal se pueden llegar a inseminar 300-400 conejas/hora, casi un 50% más que con el sistema tradicional.

MEJORA EL BIENESTAR DE LAS CONEJAS Y POR TANTO SU FERTILIDAD

Las conejas no sufren el estrés de la inyección intramuscular.

Estudio de campo previo a la generalización de la técnica

Antes de tomar la decisión de extrapolar los resultados obtenidos en el año 2007 de manera global a todas las explotaciones, hemos realizado un estudio de campo que nos ha permitido constatar que el sistema es viable para cualquier explotación cunícola, siempre que las conejas tengan una buena sincronización del celo.

En la realización de cualquier estudio una de las premisas fundamentales es ser riguroso en cuanto a una serie de factores a fin de que los resultados obtenidos no tengan una interpretación errónea.

En nuestro caso hemos hecho especial hincapié en una serie de variables que nos parecían imprescindibles:

- Elección de las granjas para realizar los ensayos.
- Nº de granjas en prueba.
- Nº de conejas inseminadas en cada granja.
- Estado fisiológico de las conejas utilizadas.
- Elaboración de las dosis seminales.

Elección de las granjas

Para decidir qué granjas forman parte de las pruebas tenemos en cuenta los siguientes factores:

- El nº de conejas a inseminar debe ser lo más elevado posible (500 conejas mínimo por explotación), para poder tener cantidad suficiente de hembras tanto para el grupo control, como para el grupo prueba.
- El historial de fertilidad de la explotación ha de ser bueno (más del 80 % de manera constante).
- El granjero debe colaborar en la realización de las pruebas y ha de ser metódico.
- El día de la inseminación es necesario que haya como mínimo dos granjas que cumplan estos requisitos.

Número de granjas en prueba

Cuanto mayor sea el nº de granjas utilizadas, más fiables serán los resultados. Hemos utilizado 20 granjas para la realización del estudio.

Nº de conejas inseminadas en cada granja

El nº de conejas que se eligen en cada explotación es también un dato muy importante. Se escoge un nº dependiendo de la cantidad total de hembras presentes y, en la medida de lo posible nunca menos de 100 hembras/explotación.

Estado fisiológico de las conejas

Para poder comparar resultados es necesario que las hembras se encuentren en la misma fase productiva. El mayor nº de conejas en una explotación el día de la inseminación lo componen las multíparas lactantes. Por ello en todos los ensayos usamos este tipo de animales para los grupos prueba y control. Evitamos utilizar nulíparas y primíparas por ser animales con resultados más variables

Elaboración de las dosis seminales

Tanto las dosis seminales empleadas en las hembras del grupo prueba como en las del grupo control deben proceder del mismo lote para un mismo día de inseminación. Esto excluye las posibles diferencias debidas al uso de diferentes lotes de dosis seminales.

Primera inseminación

Elegimos 5 explotaciones de 900, 900, 900, 500 y 500 conejas cada una e inseminamos 100, 100, 100, 50 y 50 conejas con el nuevo sistema.

- Mismo lote de dosis seminales (500 d).
- Multíparas lactantes.
- Diagnóstico gestación a los 12-14 días.
- Resultados satisfactorios.

Segunda inseminación

Elegimos 2 explotaciones de 1.200 y 600 hembras e inseminamos 350 y 150 conejas con el nuevo sistema.

- Mismo lote (500 d).
- Multíparas lactantes.
- Número de conejas proporcional a cada granja.
- Diagnóstico gestación.
- Resultados satisfactorios.

Incorporación paulatina de nuevas granjas

A medida que vamos obteniendo más resultados surgen pequeños problemas. Esto nos sugiere que, aunque el estudio inicial llevado a cabo entre la Facultad de Veterinaria y Cogal, es concluyente y sabemos que funciona, a la hora de trasladarlo a todas las explotaciones es necesario hacer una serie de ajustes en cuanto a la dosis hormonal que se administra intravaginal.

De esta forma tenemos la completa seguridad de que trabajamos en el rango adecuado para cualquier granja.

Dimensión del estudio

- El nº de granjas que ha participado en las pruebas es de 20.
- En total hemos inseminado con dosis de prueba 19.150 conejas.
- Período de tiempo que abarca desde marzo a noviembre de 2009, fecha en la cual damos por concluido el trabajo ya que los resultados así nos lo confirman.

Difusión de la técnica al resto de las explotaciones

- La primera inseminación se lleva a cabo de la siguiente manera:
 - Mitad de las reproductoras con GnRH mediante inyección intramuscular.
 - Mitad con análogo de GnRH intravaginal.

El hecho de que cada granja realice su propio testaje nos permite descartar las incidencias que factores externos a la dosis seminal puedan ejercer sobre la fertilidad global de la explotación, ya que dichos factores influirán de igual manera para ambos grupos.

- En la segunda inseminación todas las hembras han sido inseminadas con el nuevo método.
- Esto supone la incorporación de más de 140 granjas con un número superior a las 85.000 dosis en esta prueba de campo.

Conclusiones y resultados

La fertilidad y prolificidad de las conejas inseminadas con la nueva técnica, una vez reajustada la dosis hormonal es muy similar en todas las granjas para el grupo prueba (GnRH intravaginal) como para el grupo control (GnRH intramuscular).

En más del 80 % de los casos, la fertilidad para el grupo prueba se situó 2-3 puntos porcentuales por encima del grupo control.

Toda esta labor nos ha permitido conseguir con éxito el objetivo primordial que es la transferencia de los estudios realizados de las condiciones experimentales a las de campo en las explotaciones cunícolas.

Bibliografía

Interesados en bibliografía al respecto del tema, contactar con cogalvet@cogal.net.

Medida de la fragmentación del ADN en muestras seminales de conejo utilizando HALOMAX®

Sperm DNA fragmentation in samples from O. cuniculus using HALOMAX®

González C.¹, Besora J.A.², Ribé M.T.², Casado S.³, Gosálvez J.¹

¹Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, C/. Darwin 2, 28049 Madrid, España

²TARLAP REPRODUCCIO S.L., Afueras s/n, 43814 Vila-Rodona (Tarragona), España

³HALOTECH, C/. Santiago Grisolia 2, 28760 Tres Cantos (Madrid) España

Dirección de contacto: susanacasado@halotech.es

Resumen

La calidad seminal se determina rutinariamente en base a parámetros como concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides. Estos parámetros dan una información parcial de la calidad de las muestras dado que no informan sobre el estado de la cromatina espermática y la calidad de la molécula del ADN. Sin embargo, niveles de fragmentación del ADN espermático (SDF) altos se relacionan con una disminución en la capacidad fertilizante, la tasa de fecundación y el éxito reproductivo. El objetivo del presente estudio es determinar el nivel de SDF en una población relativamente amplia de conejos utilizados para la obtención de dosis seminales. Para ello, se ha utilizado el kit comercial Halomax® (HALOTECH DNA SL, Madrid), que permite un análisis sencillo, rápido y con equipamiento laboratorial mínimo. Varios trabajos científicos han demostrado que el nivel de SDF varía en el tiempo tras la eyaculación, por lo que se estudia la fragmentación de ADN en 3 momentos tras la eyaculación: t_0 , t_{24} (24h tras la eyaculación) y t_{48} (48h tras la eyaculación). Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 15°C con el fin de simular las condiciones de envío de las muestras. Se estudiaron 81 conejos macho del centro TARLAP. La media de SDF a t_0 fue $9,68\% \pm 9,48$, a t_{24} fue $14,31\% \pm 12,06$ y a t_{48} de $21,96\% \pm 21,03$. El 75% de los individuos presentaron niveles de SDF inferiores al 10% (t_0), y el 18,5% mantuvieron este nivel a lo largo de las 48h. En base a los resultados, se recomienda analizar la fragmentación del ADN espermático de los sementales utilizados para producción de dosis seminales con objeto de asegurar unos estándares mínimos de calidad. Además, al ser un parámetro sensible al estado sanitario del animal (fiebre, infecciones) y al manejo de granja (vacunaciones) puede generar información útil sobre el estado reproductivo de cada animal en un momento determinado.

Palabras clave: Fragmentación de ADN espermático, andrología, Halomax®, SCD (Sperm Chromatin Dispersion) test, reproducción, calidad espermática, conejo.

Abstract

Semen quality is calculated by the assessment of concentration, motility and morphology in semen samples. These parameters do not inform about the state of the chromatin, which could be tested by measuring DNA fragmentation (SDF). High SDF values are related to low fertilization rate and low success of artificial insemination (AI). The present work determines SDF values in 81 rabbits, in order to establish the normal rate of SDF in this species. We use, for testing SDF, the commercial kit Halomax® (HALOTECH DNA SL, Madrid), that allows a fast, and easy way to test DNA fragmentation. Several scientific papers demonstrated that SDF increases after ejaculation, and that is why we study SDF at several time points (0h, 24h, and 48h after ejaculation). We tested 81 rabbits from TARLAP centre. Mean of SDF values at t_0 was $9.68\% \pm 9.48$, at 24h was $14.31\% \pm 12.06$ and at 48h was $21.96\% \pm 21.03$. The 75% of the animals present a SDF value lower than 10% at t_0 , but only 18% present SDF lower than 10% at t_{24} and t_{48} . Measurement of DNA fragmentation is recommended to select high quality semen doses.

Key words: Sperm DNA fragmentation, Andrology, Halomax®, SCD (Sperm Chromatin Dispersion) test, reproduction, sperm quality, rabbit.

Introducción

Durante el proceso reproductivo natural, los espermatozoides permanecen a una temperatura corporal constante, y pueden permanecer en el aparato reproductivo de las hembras durante horas antes de alcanzar el ovocito. El uso de la inseminación artificial incrementa el tiempo entre el momento de la eyaculación y la fecundación del ovocito, y normalmente genera una rotura en el mantenimiento constante de la temperatura biológica correcta. Todos estos factores pueden influir en el estado de la cromatina del espermatozoide e incrementar la fragmentación de ADN. De esta forma se incrementa el impacto negati-

vo sobre la capacidad fecundante de la muestra (López-Fernández et al., 2007). La fragmentación de ADN se produce como consecuencia tanto de causas intrínsecas al animal de carácter genético o ligadas a procesos erróneos en el desarrollo del espermatozoide (protaminación) o bien por causas extrínsecas y ligadas al manejo de esas muestras tras la eyaculación. Lo que se conoce como daño iatrogénico. Entre las causas intrínsecas más importantes se encuentran el reemplazo de las histonas por las protaminas, procesos apoptóticos y estrés oxidativo (Agarwal y Allamaneni, 2005). Las causas extrínsecas que afectan a la calidad del ADN del espermatozoide pueden ser el paso del tiempo desde la eyaculación hasta la utilización de esa muestra de semen (Gosálvez et al., 2009), el efecto de los diluyentes o bien los efectos mecánicos y de transporte. El presente trabajo trata de conocer cuáles son los niveles basales de daño de ADN registrados en una población de conejos, con el fin de determinar el nivel de fragmentación de ADN que puede considerarse normal para la especie, y establecer así un umbral que permita discriminar qué conejos producen dosis seminales con niveles de fragmentación de ADN bajos y mantenidos en el tiempo que sean de alta calidad para su uso en inseminación artificial. Al mismo tiempo se analiza la dinámica de la fragmentación del ADN espermático en estos mamíferos con la intención de poder identificar aquellos animales que, independientemente de los niveles de daño basales registrados, presentan tasas más pronunciadas en la degradación del ADN espermático.

Material y métodos

Población

Machos: 81 conejos macho utilizados para la obtención y comercialización de dosis seminales para inseminación artificial. La raza de los animales estudiados es Hyla y su aptitud es maternal.

Fragmentación de ADN de muestras seminales (SDF)

Se estudió el nivel de fragmentación de ADN (SDF) en dosis monospermicas de los distintos animales. La determinación del SDF se ha realizado con el kit comercial Halomax® (HALOTECH DNA SL, España). Halomax® permite distinguir, mediante microscopía de fluorescencia o bien de campo claro, los espermatozoides con ADN fragmentado frente a aquellos que lo tienen intacto. Las soluciones incluidas en el kit inducen el desarrollo de un halo de dispersión grande y difuso de ADN alrededor del núcleo si éste se encuentra fragmentado, mientras que si el ADN está intacto el halo de dispersión es de pequeño diámetro y más compacto. El protocolo se podría resumir en los siguientes pasos: 1) inmovilización de los espermatozoides en una matriz de agarosa fijada sobre un portaobjetos, 2) incubación de la muestra con solución de lisis durante 5 min., 3) deshidratación de las muestras en concentración creciente de etanoles y 4) tinción para visualización con microscopía de fluorescencia utilizando GelRed (5% en Vectashield). Se analizan 500 espermatozoides y se calcula el SDF como el número de espermatozoides con halo respecto al total incluidos en el conteo final.

Dado que la fragmentación del ADN aumenta a lo largo del tiempo tras la eyaculación, y de manera específica para cada individuo (López-Fernández et al., 2007), se estudiaron las muestras seminales de los 81 conejos a los siguientes tiempos: 0h, 24h y 48h tras la eyaculación, manteniéndolas en pajuelas y refrigeradas a 15°C. Posteriormente, se representaron gráficamente los valores de la fragmentación de ADN a lo largo del tiempo. Esta representación ofrece una visión intuitiva de la dinámica de la fragmentación de ADN.

Para establecer el nivel de normalidad respecto a la fragmentación del ADN se calculó la media del 75% de la población estudiada, tanto de muestras recién eyaculadas, como transcurridas 24h y 48h de incubación.

Resultados y discusión

La dinámica de la fragmentación de ADN de los animales estudiados se representa en la Figura 1.

La media de SDF a t_0 fue de $9,68\% \pm 9,48$, a t_{24} fue de $14,31\% \pm 12,06$ y a t_{48} de $21,96\% \pm 21,03$. Por lo tanto, la media de incremento de fragmentación de ADN en el tiempo sería de $t_{0-24} = 4,63\%$; y de $t_{24-48} = 7,61\%$. El 75% de los individuos presentaron niveles de fragmentación de ADN por debajo del 10% a t_0 , y el 18,5% de los mismos mantuvieron este nivel de SDF a lo largo de las 48h. Si calculamos las tasas de fragmentación de ADN media dentro de cada uno de estos grupos, los valores son de $4,81\% \pm 1,45$, $6,31\% \pm 2,29$ y $6,37\% \pm 2,43$ en t_0 , t_{24} y t_{48} en los que presentan fragmentación de ADN por debajo del 10%, y de $10,79\% \pm 10,18$, $16,13\% \pm 12,63$ y $25,50\% \pm 21,78$, respectivamente a las 0h, 24h y 48h en los que presentan niveles de fragmentación de ADN superiores al 10%, encontrándose diferencias estadísticamente significativas (t-student, $p < 0,05$).

Por tanto, aun cuando las condiciones medioambientales son las mismas para todas las muestras, se producen variaciones

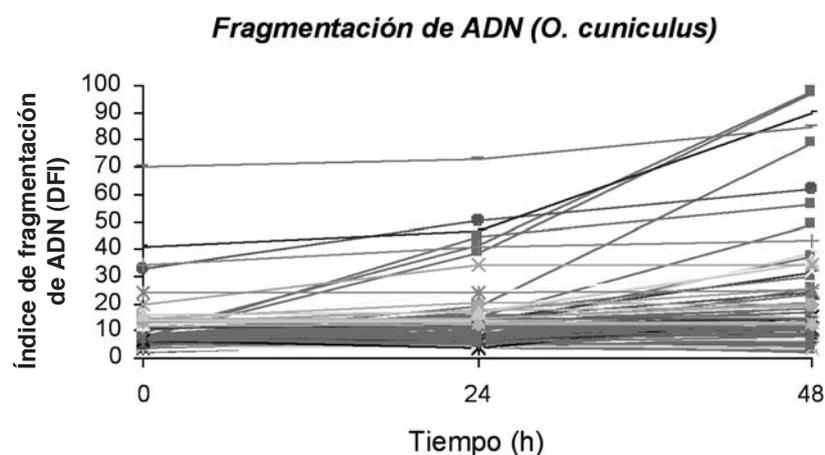


Figura 1. Dinámica de la fragmentación de ADN de los animales estudiados

entre individuos respecto al nivel de fragmentación de ADN. Algunos animales presentan niveles de SDF bajos y mantenidos en el tiempo, los cuales, presuntamente, tendrán más posibilidades de generar una gestación a término.

De acuerdo con el comportamiento de la longevidad de ADN, se podría asumir que aquellas muestras seminales o bien individuos que presenten una tendencia a experimentar incrementos de la fragmentación de ADN rápidos en el tiempo serían menos efectivas a la hora de producir un embrión viable que aquellos cuyo nivel de fragmentación de ADN es constante a lo largo del tiempo. Uno de los primeros estudios que alertaron sobre el impacto de la dinámica de daño en los espermatozoides fue ofrecido por Young en humanos (Young et al., 2003). Estos autores demuestran que la recogida de semen fuera del laboratorio, con la entrega por correo durante la noche, podría dar lugar a daño en los espermatozoides con consecuencias posteriores sobre la fertilización.

Se conoce también con cierto detalle que en pacientes con azoospermia obstructiva, la fragmentación del ADN después de la criopreservación se incrementa de forma intensa transcurridas 4 horas. En tales circunstancias, se recomienda que las muestras de espermatozoides que se deriven para inseminación deben ser utilizadas con el mínimo retraso posible tras la capacitación (Dalzell et al., 2003; Dalzell et al., 2004). En otras especies de mamíferos, se ha demostrado que muestras seminales con niveles de fragmentación basal baja, presentan mayor éxito reproductivo.

En toro, inseminaciones realizadas con animales con bajo DFI aumenta el porcentaje de hembras preñadas (García-Macías et al., 2007), y en verracos, el número de hembras paridas aumenta si la fragmentación basal es baja (Didion et al., 2009). Aunque es necesario aumentar la población estudiada, la fragmentación de ADN, tanto en su determinación dinámica como basal, se presenta como un parámetro útil para la selección de reproductores de alta fiabilidad en la inseminación.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de M. Chamout y J.F. Bertran en el trabajo de campo, así como a Sofía de la Maza en el tratamiento de los datos. Agradecen especialmente su colaboración a Begoña Díez, por el análisis de la fragmentación de ADN en muchas de las muestras incluidas en este estudio.

Bibliografía

- Agarwal A., Allamaneni S.S. 2005. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil. Steril.*, 84:850-853.
- Dalzell L.H., McVicar C.M., McClure N., Lutton D., Lewis S.E.M. 2004. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil. Steril.*, 82:1443-1445.
- Dalzell L.H., Thompson-Cree M.E., McClure N., Traub A.I., Lewis S.E.M. 2003. Effects of 24-hour incubation after freeze-thawing on DNA fragmentation of testicular sperm from infertile and fertile men. *Fertil. Steril.*, 79 Suppl. 3:1670-1672.

Didion B.A., Kasperon K.M., Wixon R.L., Evenson D.P. 2009. Boar fertility and sperm chromatin structure status: A retrospective report. *J. Androl.*, 30:665-660.

García-Macías V., de Paz P., Martínez-Pastor F., Álvarez M., Gomes-Alves S., Bernardo J., Anel E., Anel L. 2007. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int. J. Androl.*, 30:88-98.

Gosálvez J., Cortés-Gutiérrez E.I., Nuñez R., Fernández J.L., Caballero P., López-Fernández C., Holt W.V. 2008. A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil. Steril.*, 92:1915-1919.

López-Fernández C., Crespo F., Arroyo F., Fernández J.L., Arana P., Johnston S.D., Gosálvez J. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology*, 68:1240-1250.

Young K.E., Robbins W.A., Xun L., Elashoff D., Rothmann S.A., Perreault S.D. 2003. Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. *J. Androl.*, 24:853-861.

Medida de la fragmentación de ADN en muestras seminales de conejo. Impacto sobre la tasa de fecundación y el tamaño de camada

*Sperm DNA fragmentation assessment in *O. cuniculus* and its relationship with fertilization rate and litter size*

González C.¹, Besora J.A.², Ribé M.T.², Casado S.³, Gosálvez J.¹

¹Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, C/. Darwin 2, 28049 Madrid, España

²TARLAP REPRODUCCIO S.L., Afueras s/n, 43814 Vila-Rodona (Tarragona), España

³HALOTECH, C/. Santiago Grisolia 2, 28760 Tres Cantos (Madrid) España

Dirección de contacto: susanacasado@halotech.es

Resumen

La calidad seminal se determina en base a la concentración, la motilidad y la morfología de los espermatozoides. Estos parámetros ofrecen una visión parcial de la calidad de una muestra seminal dado que no informan sobre el estado de la cromatina espermática y de la calidad de la molécula del ADN. Sin embargo, los niveles de fragmentación del ADN espermático (SDF-*Sperm DNA Fragmentation*), muestran unas buenas correlaciones con la fertilidad de los individuos, con la tasa de fecundación y con el éxito reproductivo. El objetivo del presente estudio es determinar si, en conejo, el SDF tiene también un impacto sobre la tasa de fecundación y el tamaño de camada. Además, se intenta encontrar un umbral de SDF que permita mejorar la selección de sementales y discriminar entre muestras seminales que presentan una mejor aptitud para la fertilización. Para ello, se ha analizado el SDF utilizando dosis monospermicas procedentes de 23 conejos tras la eyaculación (T0), tras 24 horas (T24) y tras 48 horas (T48) de incubación a 15°C. Los animales se clasificaron en función de si alcanzaban un SDF alto (SDF-a >10%) o bajo (SDF-b <10%) durante el periodo de incubación. Tras establecer estos dos grupos con este criterio, se inseminaron hembras del mismo lote con machos SDF-a y posteriormente en el siguiente ciclo, con machos SDF-b. La tasa de fecundación fue mayor en las inseminaciones realizadas con semen con SDF-b (77% frente a 60%). El número de gazapos vivos nacidos en el grupo con SDF-b fue, a su vez, superior (72 gazapos frente a 46). Se concluye que, en conejo, los niveles de fragmentación de ADN superiores al 10% disminuyen la tasa de fecundación y el tamaño de camada. Sementales con niveles dinámicos de fragmentación de ADN espermático superiores al 10% deberían ser descartados para inseminaciones.

Palabras clave: Fragmentación de ADN espermático, andrología, Halomax®, SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*) test, reproducción, calidad espermática, conejo.

Abstract

Semen quality is determined by the assessment of concentration, motility and morphology in semen samples. These parameters are unable to determine the state of the chromatin. Sperm DNA fragmentation index (SDF) measured with Halomax® allow evaluating the state of the chromatin in an easy and fast way. In humans, bulls and boar it has been demonstrated that SDF is related to fertilization rate and litter size. In the present study we determine if SDF is related to fertilization rate and litter size in rabbits. We also suggest a SDF cut-point to select males of high semen quality. Twenty-three rabbits were tested for SDF at three time points after ejaculation: 0h, 24h and 48h. Animals were classified in high SDF (SDF-a>10%) and low SDF (SDF-b<10%). Females were inseminated to compare fertilization rate and litter size of both groups. Fertilization rate and litter size was higher in those with low SDF (fertilization rate: 77% vs. 60%; litter size: 72 vs. 46). SDF values over 10% diminish fertilization rate and litter size in rabbits.

Key words: Sperm DNA fragmentation, Andrology, Halomax®, SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*) test, Reproduction, sperm quality, rabbit.

Introducción

La medida de la calidad de semen se realiza tradicionalmente mediante el estudio de la concentración, morfología y motili-

dad de los espermatozoides; sin embargo, ninguno de estos parámetros informa sobre la calidad de la molécula de ADN, cuyo papel en la calidad del embrión es crucial. La presencia de roturas que afectan a la molécula de ADN en el espermatozoide disminuye la capacidad fertilizante de la muestra y empeora la calidad embrionaria (Carrell et al., 2003; Garcia-Macias et al., 2007; Muriel et al., 2006; Velez de la Calle et al., 2008). Por tanto, la medida de la fragmentación del ADN (SDF) aporta información útil para la selección de sementales y de muestras seminales de alta calidad que se pretendan utilizar en reproducción asistida.

El impacto negativo de elevados niveles de fragmentación de ADN sobre la capacidad fecundante de la muestra seminal y el tamaño de camada en mamíferos con interés industrial se ha estudiado previamente en toros y cerdos (Boe-Hansen et al., 2008; Garcia-Macias et al., 2007). Sin embargo, la bibliografía a este respecto es escasa, debido a que los estudios en las especies animales mencionadas son difíciles de acometer dado que el ciclo reproductivo es largo, el tamaño de la camada es reducido y hasta ahora, no existían técnicas sencillas y asequibles para el análisis de la fragmentación del ADN.

El objetivo principal de este estudio es cuantificar el impacto de la fragmentación de ADN sobre la tasa de fecundación y el tamaño de camada, en el caso de conejos. De forma paralela se intenta establecer un umbral crítico para los niveles de fragmentación de ADN espermático a partir de los cuales el éxito reproductivo se ve afectado negativamente. El presente estudio se ha realizado utilizando conejos macho procedentes de un centro de producción de dosis seminales (TARLAP SL) y se enfocó como una experiencia piloto que se ampliará en el futuro sobre la misma base experimental.

Material y métodos

Se utilizaron 23 conejos elegidos al azar de un lote dedicado para la obtención y comercialización de dosis seminales para inseminación artificial de raza Hyla. De éstos, se generaron dos grupos: SDF-a superior al 10% (n=10) y SDF-b inferior al 10% (n=13). Las hembras utilizadas fueron de aptitud maternal y utilizadas para reposición. El mismo lote de hembras se inseminó con los dos grupos de machos para evitar el efecto del factor femenino.

Fragmentación de ADN de muestras seminales (SDF)

Aunque el manejo general en esta especie implica la inseminación con dosis polispérmicas, en el presente estudio se ha caracterizado cada animal individualmente y se ha evaluado el impacto de su nivel de fragmentación del ADN sobre los resultados del cruzamiento. La determinación del SDF se ha realizado con el kit comercial Halomax® (HALOTECH DNA SL, España). Halomax® permite distinguir, mediante microscopía de fluorescencia o bien de campo claro, los espermatozoides con ADN fragmentado frente a aquellos que lo tienen intacto. Las soluciones incluidas en el kit inducen el desarrollo de un halo de dispersión grande y difuso de ADN alrededor del núcleo si éste se encuentra fragmentado, mientras que si el ADN está intacto el halo de dispersión es de pequeño diámetro y más compacto. El protocolo se podría resumir en los siguientes pasos: 1) inmovilización de los espermatozoides en una matriz de agarosa fijada sobre un portaobjetos, 2) incubación de la muestra con solución de lisis durante 5 min., 3) deshidratación de las muestras en concentración creciente de etanoles y 4) tinción para visualización con microscopía de fluorescencia utilizando GelRed (5% en Vectashield). Se analizan 500 espermatozoides y se calcula el SDF como el número de espermatozoides con halo respecto al total incluidos en el conteo final.

Dado que la fragmentación del ADN aumenta a lo largo del tiempo tras la eyaculación y de manera específica para cada individuo (Gosalvez et al., 2009), se estudiaron las muestras seminales de los 23 conejos a los siguientes tiempos: 0h, 24h y 48h tras la eyaculación, manteniéndolas en pajuelas y refrigeradas a 15°C. Posteriormente, se representó gráficamente la evolución de la fragmentación de ADN a lo largo del tiempo. Esta aproximación experimental nos permite conocer la dinámica de la fragmentación de ADN. Los animales se clasificaron, respecto a su dinámica de fragmentación de ADN en los grupos anteriormente descritos de acuerdo con el nivel de fragmentación alcanzado a 48h (menor del 10% en SDF-b y mayor de un 10% en SDF-a). El mismo lote de hembras se inseminó primero con conejos SDF-a y, posteriormente durante el siguiente ciclo reproductivo, con conejos SDF-b y se registraron los siguientes parámetros: número de hembras inseminadas, número de hembras paridas, número partos/número inseminaciones y número de gazapos por grupo. Se compararon los parámetros anteriores entre ambos grupos con el fin de determinar el impacto de la fragmentación del ADN sobre la tasa de éxito reproductivo.

Resultados

La dinámica de la fragmentación de ADN de los 23 machos se representa en la Figura 1. El 56% de los animales estudiados mantienen niveles de SDF por debajo del 10% durante todos los tiempos estudiados (SDF-b) y la media de la fragmentación

de ADN de estos animales fue de $4,6 \pm 1,1$. El resto de individuos se clasificaron como SDF-a y la media fue de $12,4 \pm 16,69$.

En lo que se refiere a los resultados de los cruzamientos, las hembras inseminadas con los machos SDF-b tuvieron una tasa de partos del 77%, mientras que las inseminadas con machos SDF-a generaron valores del 60% (Tabla 1). Del mismo modo, la media del número de gazapos vivos por cubrición fue mayor en el grupo SDF-b. El número de gazapos vivos resultó ser superior en el grupo SDF-b respecto al grupo SDF-a (72 gazapos frente a 46).

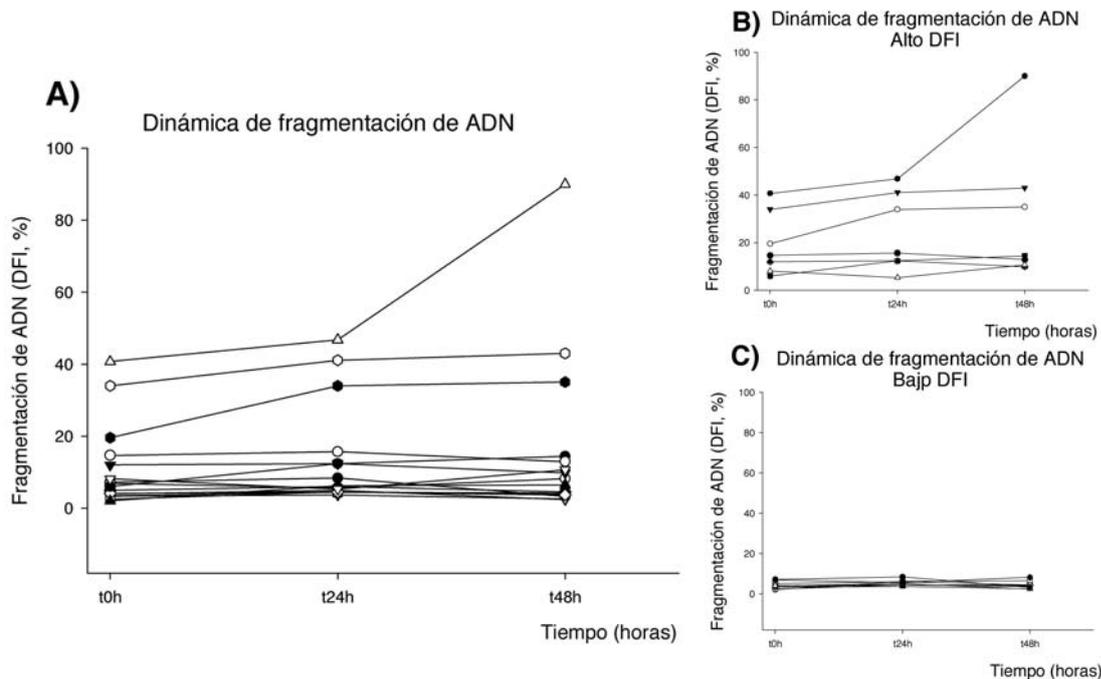


Figura 1. Dinámica de la fragmentación de ADN de los animales estudiados. **A)** Representación gráfica de los 23 conejos incluidos en el estudio. **B)** Dinámica de fragmentación de ADN del grupo SDF-a. **C)** Dinámica de fragmentación de ADN del grupo SDF-b.

	Bajo SDF	Alto SDF
Nº inseminaciones	13	10
Nº partos	10	6
Tasa partos/inseminaciones (%)	77	60
Nº gazapos vivos/inseminación	5,54	4,60

Tabla 1. Resultados de los cruzamientos realizados conejos SDF-b en comparación con los resultados de los conejos SDF-a.

Discusión

Los resultados mostrados en el presente experimento muestran dos aspectos del valor de la fragmentación del ADN espermatóico que difiere de los resultados anteriormente publicados y en lo que tan sólo se establecen correlaciones entre los niveles basales de daño espermático y la fertilidad: 1) La valoración dinámica de la pérdida de calidad seminal es un estimador más exacto del éxito reproductivo; 2) Determinados individuos que se caracterizan como SDF-b en el inicio, pueden incrementar sus valores de fragmentación tras su incubación durante un tiempo determinado y pasar a ser catalogados como SDF-a. Por el contrario, estos valores permanecen más estables en otros individuos. Esta disminución en la longevidad de la molécula de ADN puede tener efectos en la fertilización si el estro de la hembra no está bien sincronizado con el momento de la inseminación.

En general, las especies sometidas a selección genética para aumentar su productividad presentan niveles de fragmentación

de ADN más bajos que las especies no seleccionadas para fines productivos. De esta forma, en el verraco, los valores medios de fragmentación de ADN se encuentran por debajo del 5% (Lopez-Fernandez et al., 2008), mientras que en el caballo, los valores se sitúan en un entorno de 15% con facilidad (Lopez-Fernandez et al., 2007); valores muy parecidos a los encontrados en humanos (Gosalvez et al., 2009). Los conejos incluidos en este estudio presentan unos niveles medios de fragmentación de ADN espermático del $9,6\% \pm 9,9$. En cuanto al impacto de la fragmentación del ADN en la productividad, en ganado vacuno se ha observado que la tasa de no retorno al celo es mayor en hembras inseminadas con semen que presenta un SDF menor del 6% (Garcia-Macias et al., 2007). En porcino, cuando el SDF es superior al 6%, existe una disminución del tamaño de camada de 0,5, 0,7 y 0,9 lechones/parto en las razas Hampshire, Landrace y Danish Large White, respectivamente (Boe-Hansen et al., 2008). En caballo, se demostró una correlación negativa entre el nivel de fragmentación de ADN y la tasa de preñez ($r=-0,63$; $p<0,05$) (Morrell, 2008). Por lo tanto, si el nivel basal (T_0) de daño en el ADN del espermatozoide tiene un efecto en los individuos nacidos, y el efecto de la pérdida de calidad dinámica de ese mismo ADN es otro factor que limita el éxito, parece indicado controlar este parámetro a lo largo del tiempo en aquellos sementales que se utilicen para reproducción asistida. Aunque, evidentemente, es necesario aumentar el tamaño de muestra sometido a estudio, en el caso del conejo, se propone un nivel de SDF inferior a un 10% para la selección de sementales que tengan una mayor eficacia reproductiva.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de M. Chamout y J.F. Bertran en el trabajo de campo, así como a Sofia de la Maza en el tratamiento de los datos. Agradecen especialmente su colaboración a Begoña Díez, por el análisis de la fragmentación de ADN en muchas de las muestras incluidas en este estudio.

Bibliografía

- Boe-Hansen, G.B., Christensen, P., Vibjerg, D., Nielsen, M.B., Hedeboe, A.M., 2008, Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology* 69, 728-736.
- Carrell, D.T., Liu, L., Peterson, C.M., Jones, K.P., Hatasaka, H.H., Erickson, L., Campbell, B., 2003, Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 49, 49-55.
- Garcia-Macias, V., de Paz, P., Martinez-Pastor, F., Alvarez, M., Gomes-Alves, S., Bernardo, J., Anel, E., Anel, L., 2007, DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int J Androl* 30, 88-98.
- Gosalvez, J., Cortes-Gutierrez, E.I., Nunez, R., Fernandez, J.L., Caballero, P., Lopez-Fernandez, C., Holt, W.V., 2009, A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril* 92, 1915-1919.
- Lopez-Fernandez, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernandez, J.L., Arana, P., Johnston, S.D., Gosalvez, J., 2007, Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 68, 1240-1250.
- Lopez-Fernandez, C., Perez-Llano, B., Garcia-Casado, P., Sala, R., Gosalvez, A., Arroyo, F., Fernandez, J.L., Gosalvez, J., 2008, Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Anim Reprod Sci* 103, 87-98.
- Morrell JM, J.A.e.a., 2008, Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta. Vet. Scand.* 7;50:2.
- Muriel, L., Garrido, N., Fernandez, J.L., Remohi, J., Pellicer, A., de los Santos, M.J., Meseguer, M., 2006, Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 85, 371-383.
- Velez de la Calle, J.F., Muller, A., Walschaerts, M., Clavere, J.L., Jimenez, C., Wittemer, C., Thonneau, P., 2008, Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril* 90, 1792-1799.

Efecto del desarrollo hasta la recría sobre los parámetros seminales del conejo

Effect of development until rearing on seminal parameters in bucks

Martínez Paredes E.¹, Savietto D.¹, Ródenas L.¹, Arias J.M.², Domingues V.S.², De Jesús M.E.², Lloréns J.¹, Lavara R.¹, Vicente J.S.¹, Pascual J.J.^{1*}

¹ICTA, Universidad Politécnica Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

²El Adil Redondo S.L.

*Dirección de contacto: jupascu@dca.upv.es

Resumen

El objetivo del trabajo es analizar el efecto del peso al nacimiento (PN) y el desarrollo durante las diferentes fases de la recría, sobre el número de eyaculados y las principales características seminales en la fase de testaje de machos seleccionados por velocidad de crecimiento durante el periodo de engorde (VC). Para ello se analizaron 227 eyaculados que procedían de 90 machos nacidos en verano. Los animales fueron estratificados para poder obtener la mayor representación de la variabilidad en PN (bajo: <60g; medio: 60-67g; alto: >67g), en peso al final de la recría (bajo: <4720g; medio: 4720-5400g; alto: >5400g) y en la velocidad de crecimiento en lactación (0-28 días: bajo: <24g/d y alto: >24g/d), en engorde (28-63 días: bajo: <59g/d y alto: >59g/d) y en recría (63-147 días: bajo: <26g/d y alto: >26g/d). Los machos con mayor peso vivo al final de la recría tuvieron un menor número de eyaculados en su fase de testaje respecto al grupo de bajo peso (2.4 vs. 3.2 respectivamente; $P<0.05$) y un mayor porcentaje de espermatozoides anormales que los grupos bajo y medio (49.0 vs. 37.1 y 38.1, respectivamente; $P<0.05$). El análisis de la interacción PN y peso al final de la recría, muestra que los machos con bajo PN que llegaron a la recría con peso alto tuvieron un menor número de eyaculados y un mayor porcentaje de espermatozoides anormales ($P<0.05$). Estos resultados parecen indicar que el desarrollo temprano (gestación, lactación y recría) podría influir de una forma importante en las futuras características reproductivas durante la etapa de testaje, de los machos seleccionados por VC.

Palabras clave: machos, conejos, características seminales, desarrollo.

Abstract

The aim of the work is to analyse the effect of birth weight (BW) and rearing development on the number of ejaculates and main seminal traits during training period on bucks selected for growth rate over fattening period (VC). Seminal analyses were performed from 227 ejaculates from 90 bucks born in summer. The animals were organized to range main variability of the BW (low: <60g; medium: 60-67g; high: >67g), the weight at the end of rearing (low: <4720g; medium: 4720-5400g; high: >5400g), as the growth rate during lactation (0-28 days: low: <24g/day and high: >24g/day), growth (28-63 days: low: <59g/day and high: >59g/day) and rearing (63-147 days: low: <26g/day and high: >26g/day). Bucks with high weight at the end of rearing had lower number of ejaculates during their training period than bucks with low weight (2.4 vs. 3.2 respectively; $P<0.05$), as well as, higher percentage of abnormal spermatozoa than medium and low weight bucks (49.0 vs. 37.1 and 38.1 respectively; $P<0.05$). The interaction results between BW and weight at the end of rearing showed that bucks with lower BW and high weight at the end of rearing had the lowest number of ejaculates and the highest percentage of abnormalities ($P<0.05$). These results indicate that early development (gestation, lactation and rearing) could have a relevant effect in the future reproductive characteristics during training period of bucks selected for growth rate.

Key words: bucks, rabbit, seminal traits, development.

Introducción

Uno de los factores más importantes en la evolución de la producción en cunicultura ha sido la inseminación artificial (IA). Así, disponemos de centros de IA con machos seleccionados por velocidad de crecimiento (VC) que se destinan a la producción de semen, y que permiten una mejor difusión del material genético. Como consecuencia, en los últimos años ha aumentado el interés por este tipo de animales, habiéndose incrementado el número de estudios destinados a mejorar su alimentación (Pascual, 2002) y manejo (Lavara et al., 2003), así como a mejorar el conocimiento de su desarrollo fisiológico reproductivo (García Tomás et al., 2008).

En conejas reproductoras, Poigner et al. (2000) y Rommers et al. (2002) observaron que el peso al nacimiento o al final de la recría puede tener efecto sobre algunos parámetros reproductivos (tamaño de la camada o fertilidad). Sin embargo, en machos de elevada VC en el engorde sólo Brun et al. (2006), en dos líneas divergentes, observó que algunos parámetros reproductivos estaban relacionados con el peso vivo.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene el desarrollo temprano y durante la recría sobre el número de eyaculados y los principales parámetros seminales en la fase de testaje de los machos seleccionados por alta VC.

Material y métodos

Se emplearon 179 conejas de la línea R seleccionada por VC en el engorde de la Universidad Politécnica de Valencia, y localizadas en la granja "El Adil Redondo" (Carrizo de la Ribera, León). Todas las conejas del estudio fueron inseminadas con semen de la misma línea genética, realizando un total de 288 partos en los meses de Julio y Agosto. El número inicial de machos controlados fue de 930.

El mismo día del parto, los machos eran sexados, pesados e identificados con un microchip subcutáneo de 2x12 mm en la parte posterior del cuello (Felixcan, Albacete). También se registró la presencia de mancha láctea para estimar el peso real del gazapo, el tamaño de camada, así como el número de nacidos vivos y muertos. A los 28 días de vida los machos fueron tatuados y pesados, realizando el destete a los 36 días de vida. El día 63 de vida, los machos fueron pesados, se escogieron aquellos que nos permitiera tener representada la máxima variabilidad de desarrollo, y se alojaron en una jaula individual hasta los 147 días, cuando se realizó la última pesada.

Las muestras de semen de los machos provienen de su etapa de testaje (4 semanas consecutivas tras el control a 147 días), que sirve a los centros como criterio de elección de los futuros machos reproductores. El semen se recuperó de una sola monta semanal y se evaluó de forma individual, descartando aquellos que tenían orina. El volumen de los eyaculados se determinó mediante lectura directa en un tubo graduado. La motilidad se valoró de forma visual previa dilución 1:5 de una muestra del eyaculado con un tampón tris-cítrico glucosa. Tras la recuperación, se tomaron muestras para el análisis de la concentración y normalidad acrosómica según el protocolo descrito por Lavara et al. (2005). En la valoración de las formas anormales se incluyeron los criterios descritos por Barth y Oko (1989), incluyéndose el número de cabezas desprendidas del flagelo.

Los datos de las distintas variables de desarrollo se estratificaron en 2 ó 3 grupos, tratando de equilibrar los grupos resultantes:

- Peso al nacimiento (día 0): Bajo <60g, Medio 60-67g y Alto >67g.
- Peso al final de recría (día 147): Bajo <4720g, Medio 4720-5400g y Alto >5400g.
- Incremento de peso en lactación (0-28 días): Bajo <24g/d y Alto >24g/d.
- Incremento de peso en engorde (28-63 días): Bajo <59g/d y Alto >59g/d.
- Incremento de peso en recría (63-147 días): Bajo <26g/d y Alto >26g/d.

Para analizar el posible efecto del peso al nacimiento y al final de la recría sobre el número de eyaculados recuperados y las características del semen durante la fase de testaje se realizó un modelo lineal general (GLM de SAS, 2002), incluyendo con efectos fijos el peso al nacimiento (bajo, medio o alto), el peso al final de la recría (bajo, medio o alto) y su interacción. Por otro lado, para estudiar el posible efecto del incremento de peso durante las distintas etapas (lactación, engorde y recría), así como sus posibles interacciones sobre las variables citadas, se utilizó otro GLM incluyendo como covariable el peso al nacimiento.

Resultados y discusión

La Tabla 1 muestra los estadísticos descriptivos de las características seminales analizadas en los 227 eyaculados recuperados.

La mayoría de las características seminales analizadas en función del peso al nacimiento y al final de la recría fueron similares para los diferentes grupos analizados, si bien para el número de eyaculados y el porcentaje de formas anormales se observaron diferencias significativas entre algunos de los grupos (Tabla 2). El número de eyaculados recuperados fue significativamente menor para los machos más pesados al final de la recría respecto a los menos pesados ($P<0.05$, Tabla 2). Este resultado está en concordancia con lo observado por Brun et al. (2006) donde, los animales que fueron seleccionados por mayor VC en el engorde y con un posterior mayor peso en la recría, mostraron un menor número de eyaculados ($P<0.001$) útiles para la IA respecto del grupo seleccionado por una menor VC en el engorde.

	N	MEDIA	SD	MÍNIMO	MÁXIMO	CV
Eyaculado	227	2.52	0.16	0	4	58.06
Volumen (ml)	198	0.61	0.03	0.2	1.25	44.27
Motilidad (%)	176	56.44	2.35	17.50	80	31.17
Concentración espermática (10⁶ spz/ml)	176	161.11	10.58	42.00	462.00	54.96
Producción espermática (10⁶ spz/eyaculado)	176	105.55	9.11	8.40	381.00	72.22
Normalidad Acrosómica (%)	176	97.00	0.2	90.99	100.00	2.03
Espermatozoides Anormales (%)	176	40.60	1.9	11.73	87.06	40.21

N: N° de datos; SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación; Spz.: Espermatozoides

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de las características seminales analizadas.

	PESO NACIMIENTO			PESO FINAL RECRÍA		
	Bajo (n=30)	Medio (n=30)	Alto (n=30)	Bajo (n=30)	Medio (n=40)	Alto (n=20)
N° Eyaculados (n=219)	2.9 ± 0.3	2.8 ± 0.3	2.6 ± 0.3	3.2 ^b ± 0.3	2.6 ^{ab} ± 0.2	2.4 ^a ± 0.3
Spz. Anormales (%)	42.6 ± 3.1	42.3 ± 3.2	39.3 ± 3.2	37.1 ^a ± 3.0	38.1 ^a ± 2.6	49.0 ^b ± 3.8

^{a,b}: Significación entre grupos del mismo efecto (P<0.05); n= número; Spz.: Espermatozoides

Tabla 2. Características seminales en función del peso al nacimiento y a final de recría (media ± error estándar).

	Δ PESO LACTACIÓN		Δ PESO ENGORDE		Δ PESO RECRÍA	
	Bajo (n=40)	Alto (n=50)	Bajo (n=40)	Alto (n=50)	Bajo (n=43)	Alto (n=47)
N° Eyaculados (n=219)	3.3 ^b ± 0.3	2.6 ^a ± 0.2	3.1 ± 0.2	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.3	2.7 ± 0.2
Spz. Anormales (%)	37.0 ± 3.9	43.3 ± 3.3	39.1 ± 3.3	41.3 ± 3.8	39.9 ± 3.9	40.4 ± 3.2

^{a,b}: Significación entre grupos del mismo incremento efecto (P<0.05); Δ : Incremento; n = número; Spz.: Espermatozoides

Tabla 3. Características seminales en función del incremento de peso en las diferentes fases del desarrollo (media ± error estándar).

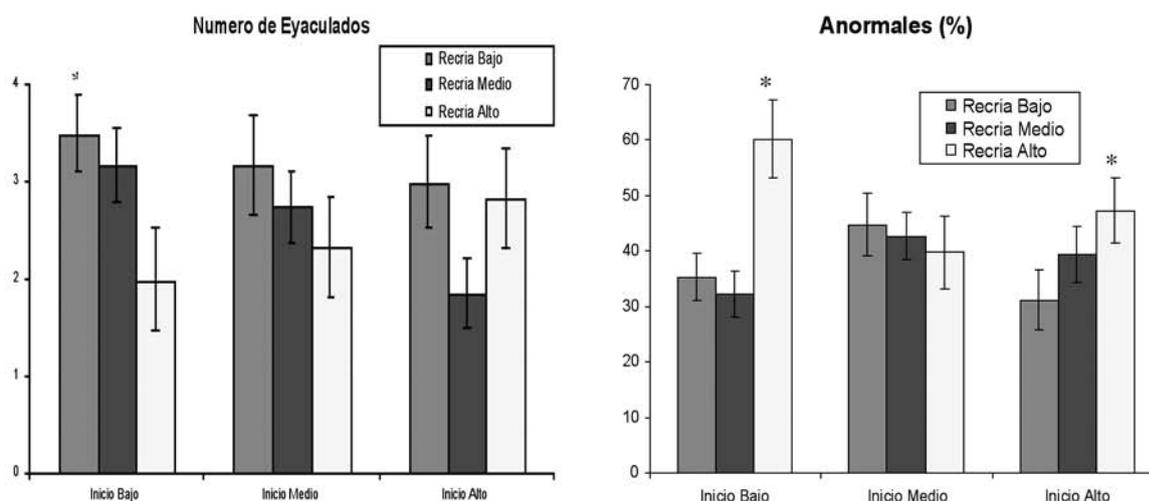
En cuanto al porcentaje de formas anormales, los animales con un peso superior a 5400g al final de la recría obtuvieron valores significativamente superiores (P<0.05) respecto a los grupos de peso inferior a 5400g al final de la recría (Tabla 2).

Si observamos la influencia que tienen cada una de las fases de desarrollo en los parámetros seminales (Tabla 3), la causa más probable del menor número de eyaculados de los machos con mayor peso al final de la recría se refleja principalmente en el mayor desarrollo de los machos durante la lactación (P<0.05).

En la Figura 1, que representa la interacción entre los grupos de peso al parto y al final de la recría, se observa que aquellos animales que nacieron con un peso al nacimiento bajo y su crecimiento fue elevado (Recría Alta) mostraron peores resultados para el número de eyaculados recuperados y para el porcentaje de formas anormales (P<0.05).

Esto podría estar relacionado con un engrasamiento excesivo de los machos. Otra posible explicación podría estar relacionada con el desarrollo embrionario del futuro macho reproductor. Cuando se observa un animal que nace pequeño y posteriormente muestra un importante crecimiento especialmente durante la lactación, éste podría ser reflejo de un insuficiente desarrollo durante la fase de gestación, que podría afectar a su futuro potencial como animal reproductor. Trabajos como los de Poirier et al. (2000) en el que observa que conejas que muestran un menor peso al nacimiento, tienen un menor tamaño de camada en sus dos primeros partos o el de Iczkowski et al. (1991) que muestra que el mayor desarrollo del volumen testicular ocurre durante las primeras semanas de vida podrían reforzar esta idea.

Si bien este es un primer estudio y sólo engloba aquellos animales nacidos y desarrollados en una situación concreta, podemos concluir que el desarrollo temprano (gestación, lactación y recría) podría influir de una forma importante en las futuras características reproductivas durante la fase de testaje de los machos seleccionados por VC en el engorde.



Diferencias significativas entre mismo grupo de inicio: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

Figura 1. Número de eyaculados y porcentaje de anormales según el peso al nacimiento (inicio) y su posterior desarrollo (final de la recria).

Agradecimientos

Agradecer a todo el personal de “El Adil Redondo” por su total predisposición y trabajo en esta experiencia.

Bibliografía

- Barth A.D., Oko R.J. 1989. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Iowa State University Press.
- Brun J-M., Theau-Clément M., Esparbié J., Falières J., Saleil G., Larzul C. 2006. Semen production in two rabbit lines divergently selected for 63-d body weight. *Theriogenology*, 66:2165-2172.
- García-Tomás M., Sánchez J., Piles M. 2008. Postnatal sexual development of testis and epididymis in the rabbit: Growth and maturity patterns of microscopic markers. *Theriogenology*, 71:292-301.
- Iczkowski K.A., Sun E.L., Gondos B. 1991. Morphometric study of the prepuberal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimension. *Am. J. Anat.*, 190:266-72.
- Lavara R., Mocé E., Vicente J.S. 2003. Buena práctica de inseminación artificial: I. Preparación de dosis seminales. Los factores responsables de la variación de los resultados de fertilidad y prolificidad de la IA. *Boletín de Cunicultura*, 128:14-23.2003.
- Lavara R., Mocé E., Lavara F., Viudes de Castro M.P., Vicente J.S. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits?. *Theriogenology*, 64:1130-1141.
- Pascual J.J. 2002. Nutrición de machos destinados a inseminación artificial. En: *Proc. de las II Jornadas Internacionais de Cunicultura*, Vila Real, Portugal, 2002, pp.: 197-212.
- Poigner J., Szendrő Z., Lévai A., Radnai I., Biró-Nemeth E. 2000. Effect of birth weight and litter size at suckling age on reproductive performance in does as adults. *World Rabbit Science*, 8(3)103-109.
- Rommers J.M., Meijerhof R., Noordhuizen J.P.T.M., Kemp B. 2002. Relationships between body weight at first mating and subsequent body development, feed intake, and reproductive performance of rabbit does. *Journal Animal Science*. 80:2036-2042.
- SAS 2002. *SAS/SAT User's Guide (Release 9.1)*. SAS Inst. Inc. Cary NC, USA.

CAPÍTULO 3

GESTIÓN Y BIENESTAR

bdcuni: Resumen de resultados de gestión técnica 2008 y 2009

bdcuni: Technical management results in rabbit production during 2008 and 2009

Pascual M., Serrano P., Gómez E.A.

Centro de Tecnología Animal Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
Polígono La Esperanza 100. 12400 Segorbe. Castellón.

Dirección de contacto: pascual_mde@gva.es

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de gestión técnica obtenidos con **bdcuni** correspondientes a 2008 y 2009. Los índices calculados fueron tasa de sobreocupación (120% y 125%), fertilidad aparente (81,8% y 82,8%), fertilidad real (77,3% y 78,0%), número de partos por hembra y año (7,32 y 7,19), intervalo entre partos (49,9 y 51,2 días), mortalidad en lactación (11,4% y 12,2%), mortalidad en engorde (6,6% y 6,2%), peso media de venta (2,113 y 2,101 kg/conejo), tasa de reposición (118% y 109%), gazapos destetados por hembra y año (56,6 y 55,6), hembras muertas y/o eliminadas por mes (7,8% los dos años), gazapos producidos por hembra y año (53,7 y 51,8), número de nacidos vivos por parto (8,74 y 8,81), kilogramos de conejo vendidos por inseminación (12,0 y 11,8) e índice de conversión global de la explotación (3,58 y 3,59).

Palabras clave: conejo, gestión técnica.

Abstract

*Technical management indexes during 2008 and 2009 in Spanish rabbit farms using **bdcuni** (database of technical management in Spanish commercial rabbitries, www.ivia.es/bdcuni) are shown in the present work. Indexes obtained were occupation rate (120% and 125%), apparent fertility (81,8% and 82,8%), real fertility (77,3% and 78,0%), number of kindlings per doe and year (7,32 and 7,19), kindling interval (49,9 and 51,2 days), mortality during lactation (11,4% and 12,2%), mortality during the fattening period (6,6% and 6,2%), averaged slaughter weight (2,113 and 2,101 kg per rabbit), replacement rate (118% and 109%), litter size at weaning per doe and year (56,6 and 55,6), does mortality per month (7,8% both years), produced rabbits per doe and year (53,7 and 51,8), total born alive per kindling (8,74 and 8,81), kilograms produced per insemination (12,0 and 11,8) and global feed conversion ratio (3,58 and 3,59).*

Key words: technical management, Rabbit.

Introducción

En un contexto de crisis generalizada, y en un sector como el ganadero que ha sufrido especialmente esta situación, es interesante observar cuál ha sido la evolución del sector cunícola a lo largo de estos últimos años.

En este trabajo se presenta una comparativa de los resultados técnicos en cunicultura obtenidos a partir de los datos de algunas explotaciones que voluntariamente utilizaron **bdcuni** como apoyo a la gestión en 2008 y 2009. **bdcuni** es un sistema de gestión técnica y/o económica gratuito y confidencial para los cunicultores a nivel nacional, creado gracias al convenio de colaboración establecido entre el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Durante estos dos años de funcionamiento de **bdcuni**, este sistema ha ofrecido un servicio de calidad a los cunicultores españoles y prueba de ello es la continuidad de las explotaciones que tras haber iniciado su actividad con **bdcuni** continúan usando este sistema periódicamente. El interés de los cunicultores, así como el número de explotaciones que utilizan este sistema de gestión ha seguido aumentando en lo que llevamos de año.

Material y métodos

Los índices se calcularon en base a los datos técnicos nacionales, de 26 y 27 explotaciones incluidas en la base de datos **bdcuni** en los años 2008 y 2009, respectivamente, siendo 24 las explotaciones comunes a los dos años. La información sobre el sistema de recogida de datos está disponible en www.ivia.es/bdcuni. Los índices mensuales fueron calculados para cada explotación. Los índices medios mensuales se obtuvieron ponderando por el número de reproductoras de cada explotación. Los índices medios anuales se calcularon como la media de todos los índices medios mensuales del año correspondiente.

Resultados y discusión

Las características de las explotaciones de **bdcuni** incluidas en el estudio se muestran en la Tabla 1. El tamaño medio de las granjas fue de 776 ambos años. La mayor parte de las explotaciones (61,5% y 63,0%) tenían entre 400 y 1000 hembras reproductoras, a diferencia de lo indicado en el informe del MARM (2008), en que predominaban las explotaciones españolas con menos de 400 jaulas (62,7%).

	2008	2009
Nº de explotaciones	26	27
Nº de reproductoras por explotación	776	776
Tamaño de las explotaciones (%)		
<400 reproductoras	15,4	14,8
400 a 1000 reproductoras	61,5	63,0
> 1000 reproductoras	23,1	22,2
Número de bandas (%)		
banda única	53,8	55,6
2-3 bandas	30,8	18,5
banda semanal	15,4	25,9

Tabla 1. Características de las explotaciones cunícolas pertenecientes a **bdcuni** incluidas en el estudio.

Índice	2008	2009
Tasa de sobreocupación (%)¹	120	125
Fertilidad aparente (%)²	81,8	82,8
Fertilidad real (%)³	77,3	78,0
Nº partos por hembra y año	7,32	7,19
Intervalo entre partos (días)	49,9	51,2
Mortalidad en lactación (%)	11,4	12,2
Mortalidad en engorde (%)	6,6	6,2
Peso medio de venta (kg/conejo)	2,113	2,101
Tasa de reposición (%)⁴	118	109
Destetados por hembra y año	56,6	55,6
Hembras muertas y/o eliminadas por mes (%)	7,8	7,8
Producidos por hembra y año	53,7	51,8
Nacidos vivos por parto	8,74	8,81
Kg vendidos por inseminación	12,0	11,8
Índice de conversión global⁵	3,58	3,59

¹Nº de reproductoras respecto a nº de jaulas x 100; ²Nº de palpaciones positivas respecto a nº de reproductoras x 100; ³Nº de partos respecto a número de reproductoras x 100; ⁴Nº reproductoras reemplazadas respecto a nº de reproductoras en la explotación x 100; ⁵kg de pienso consumidos en la explotación por kg de conejo vivo producido.

Tabla 2. Resultados de gestión técnica en 2008 y 2009 con **bdcuni**

El 96,6% de la explotaciones **bdcuni** realizaban inseminación artificial, frente a valores del 51,3% de las explotaciones reportados en 2007 (MARM, 2008), pese a la importancia que representaba en la cantidad total de conejo producido (81,2% del total).

El porcentaje de explotaciones **bdcuni** que utilizan banda única es alto (53,8% y 55,6%) respecto al 40,6% a nivel nacional en 2007 (MARM, 2008).

Estas diferencias indican un mayor tamaño medio y grado de tecnificación de las explotaciones incluidas en **bdcuni**.

En la Tabla 2 se muestran los índices de gestión técnica obtenidos. La mayoría de los valores son similares a los publicados en otros trabajos de gestión (ITAVI, 2007; Rosell y González, 2009). El valor de número de nacidos vivos por parto (8,74 y 8,81) es menor al 9,4 en 2008 publicado por Rosell y González (2009). Sin embargo una menor mortalidad en engorde (6,6 y 6,2 vs. 7,5 en Rosell y González, 2009) se tradujo en valores de número de producidos por hembra y año similar en ambos trabajos (53,7 y 51,8 vs. 51,7).

No existía una gran variación de los índices calculados mensualmente a lo largo del año en la mayoría de los casos (coeficientes de variación inferiores a 0,05). La mayor variación se observó en los resultados de mortalidad tanto en lactación como en engorde (coeficientes de variación de 0,13 y 0,22, respectivamente). Se observaron también diferencias estacionales en los promedios de pesos al sacrificio, con mayores valores en los meses de invierno que en los de verano.

Es momento de coger lápiz y papel para poder cotejar nuestros datos de gestión con los datos promedio que estamos leyendo gracias a **bdcuni**, con las prevenciones necesarias a la hora de comparar (tamaño de explotación, número de bandas, localización de la explotación) o, mejor aún, es posible hacerlo directamente si utilizo esta herramienta entrando en su web www.ivia.es/bdcuni.

Tiene que haber granjas con mejores y peores resultados que estos promedios **bdcuni**. Es hora de detectar nuestros puntos débiles o, en el caso de ser mucho mejores ser posibles candidatos a los premios *Cunicultores de España* organizados por el Ministerio en colaboración con ASESCU y el equipo **bdcuni**.

Bibliografía

ITAVI (Institut Technique de l'Aviculture). 2007. *Gestion technico -économique des éleveurs de lapins de chair. Programmes RENACEB et RENALAP*, 2006.

MARM (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino). 2008. *Encuesta Nacional de Cunicultura. Memoria. Secretaria General Técnica*.

Rosell J., González F.J. 2009. *Gestión Técnica de explotaciones cunícolas 1992-2008*. *Cunicultura*, 200:27-28.

Postura y comportamiento del conejo para determinar la altura de la jaula en relación con el bienestar animal

Rabbit posture and behaviour to determine cage height in relationship with animal welfare

Negretti P., Bianconi G., Finzi A.*

Rabbit Unconventional Rearing Experimental Centre, Department of Animal Production, University of Tuscia, 01100 Viterbo, Italy

*Dirección de contacto: finzi@unitus.it

Resumen

Diez conejos (4 machos y 6 hembras) se alojaron individualmente en una jaula de 1,0 _ 0,65 m de planta y 1,0 m de altura para estudiar sus comportamientos en relación con la altura alcanzada adoptando diferentes posturas. Se utilizó una cámara web, capturando un fotograma cada minuto, para comprobar la postura de los animales durante todo el ciclo circadiano. Se grabó en video el comportamiento de cada conejo durante una semana, analizándose unos 45.000 fotogramas por animal. El ensayo mostró claramente que la mayor parte del tiempo (99,52% del total de ocurrencias) los conejos permanecían a una altura inferior a 40 cm, que es la altura estándar de las jaulas comerciales. Los resultados muestran que los conejos no necesitan jaulas mayores para conseguir un mejor bienestar. También se analizó la actitud de los conejos de alzarse sobre las patas traseras para alcanzar alturas superiores a 40 cm. Aunque ésta fue muy inusual, gracias al gran número de observaciones fue posible demostrar también una diferencia significativa cuando se comparó la actividad diurna con la nocturna. La diferencia máxima fue un 11,2% de ocurrencias alrededor de medianoche versus 23,8% alrededor de las ocho ($P < 0,01$).

Palabras clave: conejo, altura de la jaula, bienestar.

Abstract

Ten rabbits (4 bucks and 6 does) have been introduced individually in a cage 1.0 _ 0.65 and 1.0 m height to test their behaviour in relationship with the height reached assuming different postures. A web camera was utilised, shooting a photogram each minute, to check the posture of the animals during all the circadian cycle. The behaviour of each rabbit was video recorded for a week and about 45,000 photograms per animal were checked. The trial showed clearly that most of the time (99.52% of the total occurrences) the rabbits remained at an height lower then 40 cm, that is the standard height of commercial cages. Results show that rabbits don't need higher cages to get a better welfare. The attitude of rabbits to raise on the hind legs to reach heights exceeding 40 cm was analysed too. Though this was very uncommon, thanks to the great number of observations it was possible to demonstrate also a significant difference when comparing the diurnal with the nocturnal activity. The maximum difference was 11.2% of the occurrences about midnight versus 23.8% about eight o' clock ($P < 0.01$).

Key words: rabbit, cage height, welfare.

Introducción

De acuerdo con el interés creciente por el bienestar animal, se han propuesto jaulas de mayor altura, en comparación con las comerciales (Standing Committee of the European Convention, 2003; Hoy y Verga, 2006). Se suponía que los conejos debían poder alzarse libremente sobre las patas traseras con las orejas erectas, y se propuso una altura de la jaula de 50-60 o incluso 70 cm, entre otras características de la jaula, en lugar de la altura estándar de 38-40 cm de las jaulas industriales.

Cuando se ensayó una jaula de dos pisos para aumentar la superficie disponible para caminar, la zona de paso para permitir el salto del conejo de un piso a otro era de 52 cm de alto. Ésta era utilizada por los conejos para saltar de arriba abajo y al revés, pero la altura sólo fue utilizada rara vez para adoptar una postura levantada sobre las patas traseras (Finzi *et al.*, 1997; Negretti *et al.*, 2004).

Se han ensayado jaulas mayores (50 cm de altura) por Rommers y Meijerhof (1998). Se registró una posición "redressée",

probablemente referida a los animales levantados sobre las patas traseras, pero el porcentaje no fue citado. Princz et al. (2005) han ensayado jaulas con alturas de 20, 30, 40 cm y con el techo abierto para alojar conejos en crecimiento desde la 5ª a la 10ª semana de edad. Durante el período activo era preferida la jaula de 40 cm de altura, mientras que en el período de reposo era preferida la jaula menor, la de 20 cm. Las jaulas con el techo abierto nunca fueron preferidas. De todos modos el Panel AHAW de la European Food Safety Authority (2005), discutiendo el impacto de los actuales sistemas de alojamiento y producción sobre la salud y el bienestar de los conejos domésticos de granja, no mencionan ningún problema de altura de las jaulas ni ningún posible efecto negativo de la altura estándar sobre el bienestar del conejo.

Las jaulas de mayor altura son más caras y la captura del animal puede estar dificultada incrementando el estrés. Puesto que es importante clarificar la posible relación entre las características estructurales de las jaulas y el bienestar del conejo, se diseñó un ensayo específico para determinar si, cuándo y cuántas veces los conejos pueden beneficiarse de jaulas más altas.

Material y métodos

Se construyó una jaula experimental. Las paredes laterales eran de 1,0 m de altura, para permitir a los conejos adoptar cualquier posible postura respecto a la altura. La jaula era de 1,0 x 0,65 m de planta y estaba equipada con una regla graduada con unidades de medida para permitir la lectura de la altura alcanzada por los animales (Figura 1)

Diez conejos adultos (4 machos y 6 hembras) fueron introducidos individualmente en la jaula experimental. La postura de los animales fue registrada automáticamente con una cámara web regulada para disparar cada minuto durante todo el ciclo nictameral. Cada prueba se realizó durante una semana para registrar posibles modificaciones comportamentales.

Las alturas alcanzadas por los conejos se dividieron en 4 clases asimétricas basadas en el tipo de posturas adoptadas durante el ciclo nictameral. La clase hasta 30 cm incluyó los animales que estaban tendidos; la clase de 30 a 35 cm incluyó los sujetos que estaban de pie apoyados sobre las cuatro patas, o caminando, o sentados, o comiendo y bebiendo, o acicalándose; la clase de 36 a 40 cm incluyó los animales que adoptaban una posición erecta pero sin extender las patas traseras. Los casos de conejos que estaban de pie en una posición erecta por encima de tal altura, siempre apoyados en las paredes de la jaula y con las patas traseras extendidas, se registraron sólo excepcionalmente, principalmente como fase transitoria de la actividad exploratoria.

Hasta 40 cm, es decir hasta las posturas permitidas por las jaulas industriales estándar, sólo se registró el total de ocurrencias. Por encima de tal medida, que exigiría jaulas mayores, cada ocurrencia fue registrada singularmente y también se registró la hora para analizar si estos comportamientos raros eran dependientes de un período peculiar (noche o día o alba) del ciclo de 24 horas.

Dado que los animales provenían de un alojamiento al aire libre, se mantuvo la iluminación natural durante el día y, durante la noche, se utilizó una iluminación baja (2,2 W/m² de luz indirecta, simulando una noche de luna media) para permitir grabar a la cámara web cuando la luz de la luna no era suficiente. El análisis estadístico se realizó usando SAS (1993).

Resultados

Han sido analizados unos 45.000 fotogramas por conejo. Todos los animales ensayados mostraron claramente que no tenían tendencia a adoptar posturas que excediesen la altura de las jaulas estándar (40 cm). En más del 99% de las ocurrencias,



Figura 1. Dispositivo experimental para ensayar la postura del conejo en relación a la altura alcanzada por los animales durante el ciclo de 24 horas. La primera altura mostrada en la cinta métrica amarilla son 30 cm. El conejo está sentado con las patas delanteras levantadas y la altura hasta el extremo de las orejas es de 35 cm

cuando estaban tendidos, sentados, de pie apoyados sobre las cuatro patas, comiendo y bebiendo o acicalándose, los animales no alcanzaron la altura de 40 cm. Esto muestra que las jaulas estándares son bastante adecuadas para permitir el comportamiento más usual del conejo. Cuando los datos se consideraron analíticamente (Tabla 1), los conejos fueron observados un 90,5%, 7,8% y 1,2% de las veces registrando alturas <30 cm, 31-35 cm y 36-40 cm respectivamente. Sólo excepcionalmente se superó esta altura: 0,33%, 0,071%, 0,042%, 0,020%, 0,016% para alturas hasta 45, 50, 55, 60, >60 cm respectivamente, es decir menos del 0,5% del total.

Altura (cm)	Ocurrencias	%	%
<30	40.982	90,502	99,52
31-35	3.541	7,820	
36-40	542	1,197	
41-45	151	0,334	0,48
46-50	32	0,071	
51-55	19	0,042	
56-60	9	0,020	
>60	7	0,016	
Total	45.283	100,000	

Tabla 1. Ocurrencias de las alturas alcanzadas por los conejos durante el ensayo completo.

En la Figura 2 se representa un ejemplo. El conejo, mientras permanece levantado sobre las patas traseras, alcanza una altura de sólo 42 cm. Puede comprenderse fácilmente porque es difícil que los conejos puedan alcanzar alturas mayores que ésta, principalmente porque pueden hacerlo apoyados en la pared de la jaula con las patas delanteras para hacerlo más fácilmente. No es lo mismo que en las condiciones de vida silvestre en libertad donde, en la posición de alerta, las patas traseras no están extendidas.

En la Tabla 1 se resumen los datos referidos al lote total de animales del ensayo. Éstos muestran que las sugerencias que demandan jaulas mayores en aras de un supuesto mejor bienestar no están sustentadas por evidencias experimentales. Incluso la clase de alturas de 36 a 40 cm apenas es visible en la mayoría de las representaciones gráficas del porcentaje de ocurrencias. Esta clase pudo ser sensiblemente apreciada prácticamente en solo dos casos. El más evidente fue el caso del macho mostrado en la Figura 3 que tuvo el máximo (1,03%) de posiciones levantadas observado.



Figura 2. El conejo está en posición erecta (42 cm). Posturas como esta han sido observadas durante periodos bastante cortos.

Discusión

El análisis del comportamiento del conejo cuando se cría en jaulas demuestra que algunas posturas son frecuentes mientras que otras son bastante inusuales. Es obvio que algunas actitudes corresponden a patrones de comportamiento especie-específicos capaces de satisfacer exigencias etológicas específicas de los animales. Otras actitudes, por el contrario, aparecen solo como posibles u opcionales.

Puede discutirse cuál debería ser la frecuencia necesaria para considerar un comportamiento como correspondiente a las

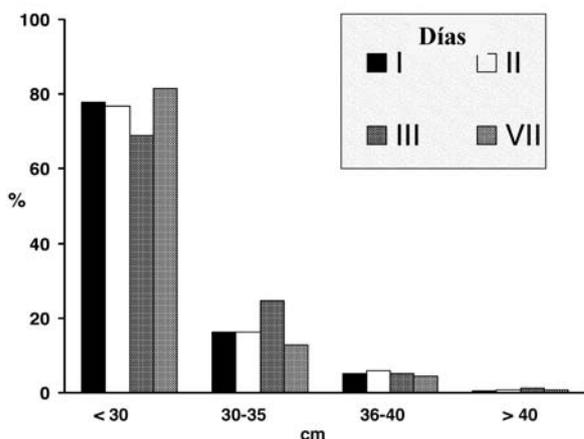


Figura 3. Frecuencias de las alturas alcanzadas por un macho adulto en diferentes días de observación. Es el caso más claro de los únicos dos sujetos en el que es visible la clase de 36 a 40 cm.

ma de 40 cm más frecuentemente que las hembras, son alojados en jaulas mayores, en los sistemas industriales, para permitir una más fácil recolección del semen.

Gracias al muy elevado número de observaciones, los datos obtenidos permitieron un análisis estadístico también de las ocurrencias inusuales. Cuando se consideraron las ocurrencias que mostraron una altura por encima de cm 40 durante el ciclo circadiano, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$). Los datos se muestran en la Figura 4, donde el día estaba dividido en 6 periodos de 4 horas (en el eje de abscisas sólo se representan los valores medios). La tendencia muestra frecuencias mayores (23,8%) por la mañana temprano (6:00 a 10:00) seguidas de valores medios (15,4% a 18,2%) para la mayor parte del día (10:00 a 22:00). Entonces los valores cayeron hasta un mínimo (11,2% a 13,1% de 22:00 a 6:00).

Los resultados están de acuerdo con los registros obtenidos por Princz *et al.* (2005) quienes concluyeron que las jaulas con 30-35 cm de altura no contravienen el bienestar y confort de los conejos en crecimiento.

Se han ensayado jaulas mayores (50 cm) por Rommers y Meijerhof (1998). Se registró una posición “redressée”, probablemente referida a los animales levantados sobre las patas traseras, pero el porcentaje no fue citado. Nosotros calculamos un posible 2,9% de las ocurrencias, de acuerdo con la descripción de los métodos experimentales hecha por los autores mismos.

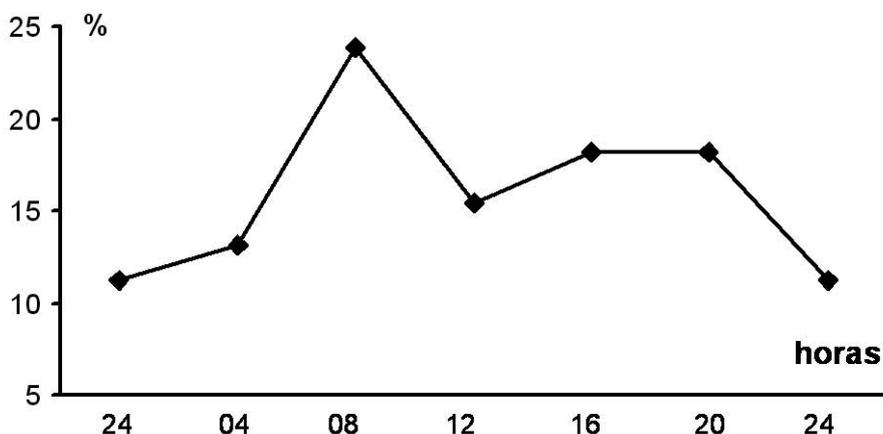


Figura 4. Tendencia circadiana de las frecuencias del porcentaje de ocurrencias cuando las alturas son >40 cm. Cada clase del eje de abscisas representa un periodo de 4 horas, 2 antes y 2 después de la hora referida.

exigencias etológicas básicas de una especie animal. Los datos registrados mostraron que sólo en el 0,48% de las ocurrencias los conejos levantaban su cuerpo una altura por encima de 40 cm (menos del 0,15% sobre 45 cm). Por lo tanto, este debería ser considerado como un comportamiento *opcional* pero no como *necesario*.

Otro aspecto a considerar es que, si algún animal nunca adopta una determinada postura, también en este caso esta postura no debería ser reconocida como una necesidad específica de la especie. En este experimento, nunca se observó una ocurrencia así, pero dos sujetos mostraron sólo 1 ocurrencia sobre 4.000 o más en la cual levantaron sus cuerpos por encima de 40 cm. Esto es muy próximo a nada. Además debería considerarse que los machos, que muestran una tendencia limitada a levantar sus cuerpos por encima

Este resultado debería incluir nuestras dos clases de 36 a 40 cm y de 41 a 45 cm cuando los animales adoptan una posición erecta, menor y mayor que las jaulas estándar, respectivamente. Nuestro valor fue de 1,5% y el resultado puede considerarse de acuerdo con los de los mencionados autores, puesto que su registro ha sido inferido por nosotros.

Como conclusión, el modelo experimental ha mostrado ajustarse para definir las condiciones de bienestar para los conejos en relación con la altura óptima de las jaulas industriales. Éstas parecen satisfacer las necesidades de bienestar de los conejos. Además, la discusión ha ilustrado el problema de definir qué debe ser considerada solo una posibilidad comportamental y qué son necesidades etológicas especie-específicas a tener en cuenta en aras del bienestar animal.

Bibliografía

European Food Safety Authority – AHAW Panel. 2005. *The impact of the current housing and husbandry systems on the health and welfare of farmed domestic rabbits. Annex to the EFSA Jour.*, 267:1-31.

Finzi A., Margarit R., Calabrese A. 1997. *Une cage à 2 étages pour le bien-être des lapins. Cuniculture*, 24(4):159-161.

Hoy S., Verga M. 2006. *Welfare indicators. In: Maertens L., Coudert P. Recent advances in rabbit sciences, chapter 2.1. Ed. ILVO, Animal Science Unit, Melle, Belgium, pp. 71-74.*

Negretti P., Albani A., Finzi A. 2004. *Location and behaviour of young rabbit bucks. Proc. 8th World Rabbit Congress. Puebla. México*, 8: 1257-1262.

Morisse J.P. 1998. *Le bien-être chez le lapin: rapport de synthèse. Proc. 7èmes Journées de la Recherche Cunicole, 13-14 May, 1998, Lyon, France, pp. 205-214.*

Princz Z., Szendrő Zs., Radnai I., Biró-Németh E., Orova Z. 2005. *Free choice of rabbits among cages with different height. 17th Hungarian Conf. on Rabbit Prod. WRS, Kaposvár, Hungary, 2005, 14 (spec. issue), p. 16.*

Rommers J.M., Meijerhof R. 1998. *La dimension de la cage influence-t-elle la productivité et le bien-être des lapins. Cuniculture*, 25(2):67-72.

SAS 1993. *SAS User's guide, Statistics. SAS Institute Inc., Cary (NC), USA.*

STANDING COMMITTEE OF THE EUROPEAN CONVENTION for the protection of animals kept for farming purposes. 2006. *Proc. 45th Meeting, Strasbourg France, 25-27 November.*

CAPÍTULO 4

NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN

Efecto del peso al nacimiento y del pienso de recría sobre el desarrollo y reproducción de las conejas

Effect of birth weight and rearing diet on the development and reproduction of rabbit does

Savietto D.¹, Ródenas L.¹, Martínez-Paredes E.¹, Esteve J.M.¹, Villalba C.³, Fabre C.³, Blas E.¹, Cervera C.¹, Pascual J.J.^{1*}

¹ ICTA, Universidad Politécnica Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España

² GUCO Grupo ARCOIRIS, Ctra. de Beceite Km 23, 44580 Valderrobres (Teruel), España

³ Granja Jordan, Núcleo de Mejora Genética, 50793 Fabara (Zaragoza), España

*Dirección de contacto: jupascu@dca.upv.es

Resumen

Con el objetivo de evaluar el efecto del peso al nacimiento (PN: <52, 52-57, 57-62 y >62 g) y del tipo de pienso suministrado a las conejas en la fase de recría (control vs. fibroso), se utilizaron 355 animales provenientes del cruce entre las líneas V y A de la Universidad Politécnica de Valencia. Al nacimiento los animales fueron sexados, pesados e identificados. A las 9 semanas de vida las conejas fueron transferidas a una granja comercial dónde recibieron uno de los piensos experimentales hasta el momento del primer parto. Las diferencias de PN parecen mantenerse en las conejas hasta la fecha de la primera inseminación artificial (IA). Así, las conejas con un PN superior a 57 g mostraron un mayor grosor de la grasa perirenal a la 1ª IA (+0.18 mm; P<0.05). Sólo las conejas con un PN<52 g llegaron al primer parto con un menor peso (-270 g; P<0.001). Las conejas con un PN>57 g presentaron un número de gazapos nacidos totales (NT) superior en su segundo parto (+1.24 gazapos; P<0.05). El uso de un pienso fibroso en recría no produjo ningún retraso en el desarrollo de los animales hasta el momento de la 1ª IA, y aunque se observó una reducción del NT en el primer parto (-1.0 gazapos; P<0.05), dicho problema desaparece en el siguiente ciclo. En conclusión, las conejas con un PN<52-57g llegan al primer parto con un menor peso y pueden mostrar unos peores índices reproductivos en los primeros ciclos. Por otra parte, la utilización de piensos fibrosos se presenta como posible alternativa de restricción en recría.

Palabras clave: conejas, peso al nacimiento, fibra, recría.

Abstract

In order to evaluate the effect of birth weight (BW: <52, 52-57, 57-62 and >62 g) and the rearing diet (control vs. fibrous), 355 crossbreed rabbit does (V_A; Universidad Politécnica de Valencia) were used. The animals were sexed, weighted and identified at the birth day. Nine weeks after, young females were transferred to a commercial farm receiving one of the experimental diets from this moment to the first partum. BW differences were maintained until the 1st artificial insemination (AI). Thus, females with a BW>57g had a greater perirenal fat thickness at 1st AI (+0.18 mm; P<0.05). Only those females with BW<52g reached to first partum with a lower live weight (-270 g; P<0.001). Females with BW<57g showed a larger number of total born (TB) at the 2nd partum (+1.24 kits; P<0.05). The use of a rearing fibrous diet did not impair the adequate development of young females until 1st AI, and although a reduction of TB at 1st partum was observed (-1.0 kits; P<0.05) this disadvantage disappeared in the next cycle. In conclusion, females with a BW<52-57g arrive to 1st partum with a lower live weight and can show worse reproductive traits. On the other hand, fibrous diets could be a possible restriction choice for rearing.

Key words: rabbit does, birth-weight, fibre, rearing.

Introducción

En las últimas décadas se ha realizado un gran esfuerzo para mejorar la nutrición y manejo de las conejas reproductoras (Xiccato, 1996; Pascual et al., 2006). Sin embargo, parte del potencial reproductivo de las conejas se puede haber decidido antes de que ocurra el primer parto (en su propia gestación, lactación, crecimiento o recría).

En este sentido Poigner et al. (2000a) describieron la posible influencia del efecto materno (peso al nacimiento y tamaño de camada) sobre el crecimiento y tasa de mortalidad de sus crías. De hecho, Poigner et al. (2000b) observan como el peso al

nacimiento (PN) de las hembras podría afectar a su potencial reproductivo, teniendo este PN mayor importancia que el tamaño de la camada en el que se crió la coneja.

Por otra parte, algunos autores (Rommers, 2004; Quevedo et al., 2005; Theilgaard et al., 2006) han mostrado como el sistema de manejo utilizado durante la recría y el nivel de desarrollo de los animales en el momento de su primera inseminación artificial (IA) puede afectar a la productividad y esperanza de vida de las futuras conejas reproductoras.

Basado en la importancia de los parámetros reproductivos y de los factores que les afectan, el presente trabajo trata de ahondar en el efecto de dos sistemas de alimentación aplicados en la fase de recría, considerando el peso al nacimiento y la condición corporal de conejas a la primera IA.

Material y métodos

Se utilizaron un total de 355 hembras del núcleo de selección Jordá (Fabara, Zaragoza), provenientes del cruce entre las líneas V y A de la Universidad Politécnica de Valencia, ambas seleccionadas por tamaño de camada al destete. El día del nacimiento las conejas fueron sexadas, pesadas y marcadas mediante la inyección de un microchip de 2x12 mm (Felixcan, Albacete). A las 9 semanas de vida los animales fueron trasladados a una granja comercial de Valderrobres (GUCCO, Grupo Arcoiris, Teruel). Desde dicho momento hasta el día del primer parto las conejas recibieron uno de los dos piensos experimentales (Tabla 1): control (C) o fibroso (F).

Los piensos fueron asignados en función del peso al nacimiento, clasificando los animales en 4 grupos experimentales: <52, 52-57, 57-62 y >62 g. A partir del primer parto, todos los animales pasaron a recibir el mismo pienso (C). La primera IA se realizó a las 21 semanas de vida, y tras el parto las conejas fueron inseminadas a los 18 días post-parto.

Se controló la evolución del peso vivo desde los 63 días hasta el primer parto en controles realizados a cada 21 ó 28 días (manejo en 2 bandas). En la 1ª IA se midió el grosor de grasa perirenal (GGP) utilizando un equipo de ultrasonidos (Toshiba, Just Vision, 200, SSA-320), y siguiendo la metodología descrita por Pascual et al. (2000). Se controló el número de nacidos totales, vivos y destetados. La tasa de fertilidad y el intervalo entre partos para los distintos grupos fue también registrada.

Los datos fueron analizados mediante un modelo mixto (PROC MIXED de SAS, 2002) incluyendo el pienso y el grupo experimental como factores fijos y el animal como efecto aleatorio. El tamaño de camada al nacimiento se introdujo como covariable. Se realizó un análisis de contraste ortogonal para el peso al nacimiento (<57 vs. >57 g).

Resultados y discusión

Efecto del peso al nacimiento

Las diferencias de PN parecen mantenerse en las conejas hasta la fecha de la primera IA (Tabla 2; $P < 0.001$). De hecho, las conejas con un $PN > 57$ g mostraron una mayor condición corporal a la 1ª IA (+0.18 mm de GGP; $P < 0.05$) que las conejas de menos de 57 g. Sin embargo, sólo las conejas con un $PN < 52$ g presentaron un peso vivo inferior al primer parto (-270 g; $P < 0.001$). De ese mismo modo, Poigner et al. (2000a) observaron como las diferencias de PN se mantienen hasta la semana 16 de vida, pero desaparecen al primer parto.

Respecto, al efecto del PN sobre los parámetros reproductivos registrados durante los primeros dos ciclos reproductivos, a medida que aumenta el PN hasta los 62 g se produce una mejora de la fertilidad ($P < 0.05$). Sin embargo, la fertilidad volvió a caer en las conejas de >62 g. Por otra parte, las conejas que nacieron con un peso mayor a 57 g tuvieron un mayor número de gazapos nacidos totales en su 2º parto (+1.24 gazapos; $P = 0.056$) que aquellas que al nacimiento pesaron menos de 57 g. Estos valores también se observaron durante el primer parto (+0.53 gazapos nacidos totales) pero sin diferencias significativas. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos por Poigner et al. (2000b), donde las conejas con un mayor PN (>63 g) tuvieron un mayor número de nacidos totales (+1.18 gazapos; $P < 0.01$) durante los dos primeros ciclos reproductivos, y ponen en evidencia el posible efecto del adecuado desarrollo fetal sobre el ulterior desarrollo reproductivo adulto.

Efecto del tipo de pienso de recría

La utilización del pienso fibroso no produjo un retraso en el desarrollo de los animales hasta el momento de la 1ª IA, llegando las conejas con un peso similar (3.94 kg), a diferencia de lo observado en trabajos previos con piensos bajos en energía

Ingredientes (%)	Pienso	
	Control (C)	Fibroso (F)
Grano de cebada	7.18	2.01
Harina semilla girasol	16.00	5.02
Haba de soja extrusionada	2.77	-
Salvado de trigo	30.00	18.07
Pulpa remolacha	8.74	15.56
Harina alfalfa	28.99	41.17
Paja cereal	-	15.06
Aceite soja	1.69	1.00
Melaza caña	2.00	-
Lisina 50 líquida	0.15	-
Metionina OH líquida	0.10	-
Treonina	-	0.17
Carbonato cálcico	1.27	-
Fosfato bicálcico	-	0.63
Cloruro sódico	0.40	0.50
Px Guco 0.20 % ¹	0.20	0.20
Contenido Nutritivo		
Materia seca (MS, %)	90.46	91.03
Cenizas	7.98	11.39
Proteína bruta	18.42	13.36
Grasa Bruta	4.98	2.57
Fibra neutro detergente	38.08	43.61
Fibra ácido detergente	19.47	23.37
Lignina ácido detergente	3.41	2.00

¹Corrector de vitaminas y oligoelementos. Ambos piensos incluían Robenidina (66 mg/kg) y cobre (10 mg/kg).

Tabla 1. Ingredientes (%) y composición química (%MS) de los piensos experimentales

Parámetros	Peso al nacimiento (PN, g)				Pienso de recría		Contraste PN (g)	
	< 52	52-57	57-62	> 62	Control	Fibroso	< 57 vs. > 57	P-valor
Peso a 63 d	1815 a ±34	1928 b ±42	1954 b ±39	2053 c ±36	1947 ±26	1928 ±26	132 ±42	<0.001
Peso a la IA	3787 a ±49	3866 b ±57	4017 b ±47	4084 c ±54	3965 ±36	3912 ±35	224 ±57	<0.001
Peso al parto	3956 a ±54	4193 b ±59	4302 b ±49	4183 b ±60	4247 A ±39	4070 B ±36	168 ±62	0.006
GGP ¹ a I.A.(mm)	6.03 ±0.07	6.01 ±0.08	6.20 ±0.07	6.19 ±0.08	6.17 ±0.05	6.04 ±0.05	0.18 ±0.08	0.026
Fertilidad (%)	83.78 a	93.10 ab	97.67 b	84.38 a	92.19	94.81	4.12	NS ²
IPP ³ (días)	51.42 ±2.89	51.68 ±2.68	58.15 ±2.12	53.63 ±2.86	55.09 ±1.86	52.35 ±1.68	4.34 ±3.00	0.153
Primer parto								
Nacidos Vivos	8.98 ±0.56	9.42 ±0.66	9.59 ±0.55	9.54 ±0.65	9.78 ±0.45	8.99 ±0.41	0.37 ±0.62	0.553
Nacidos Totales	9.42 ±0.49	9.73 ±0.55	9.84 ±0.46	10.37 ±0.56	10.35 A ±0.38	9.33 B ±0.35	0.53 ±0.52	0.310
Nº Destetados	7.20 ±0.43	6.28 ±0.46	6.91 ±0.41	7.10 ±0.49	6.86 ±0.34	6.88 ±0.29	0.26 ±0.45	0.562
Segundo parto								
Nacidos Vivos	10.86 ±0.78	10.03 ±0.81	11.23 ±0.64	11.20 ±0.81	10.69 ±0.56	10.97 ±0.51	0.77 ±0.77	0.320
Nacidos Totales	11.56 ±0.65	11.03 ±0.67	12.39 ±0.53	12.67 ±0.68	11.90 ±0.47	11.93 ±0.43	1.24 ±0.06	0.056
Nº Destetados	8.67 ±0.98	8.62 ±1.34	7.67 ±0.65	7.95 ±0.83	8.58 ±0.81	7.87 ±0.55	-0.84 ±0.98	0.403

Medias seguidas de letras minúsculas (intervalo de peso) y mayúsculas (tipo de pienso) en la fila difieren significativamente entre sí a $p < 0.05$. ¹Espesor de la grasa perirenal. ²No significativo a $p < 0.05$. ³Intervalo entre partos.

Tabla 2. Efecto del peso al nacimiento y del tipo de dieta, consumida en la fase de recría, sobre la evolución del peso vivo y a los distintos parámetros reproductivos de los dos primeros ciclos productivos

(Xiccato *et. al.*, 1999; Pascual *et. al.*, 2002; Quevedo *et. al.*, 2005) donde sí se observó dicho retraso. Sin embargo, la administración de un pienso fibroso durante la recría podría reducir la condición corporal de las conejas en su 1ª IA (-0.14 mm en comparación a las conejas del pienso control; $P=0.078$). Sin embargo, al igual que observó Quevedo *et. al.* (2005), la utilización de un pienso rico en fibra durante la recría y primera gestación produjo una reducción del número de nacidos totales al primer parto, aunque en ambos trabajos dicho problema desaparece en los siguientes ciclos. En el presente trabajo se observa una reducción de 1 gazapo nacido total ($P<0.05$) en el primer parto para conejas alimentadas con el pienso fibroso, que además coincide con un menor peso vivo de la coneja alrededor del primer parto (-177 g; $P<0.05$).

Así podemos concluir que aquellas conejas que nacen con un bajo peso (<52-57g) llegan al primer parto con un menor peso vivo y podrían mostrar unos peores índices reproductivos en sus primeros ciclos, poniendo en duda la conveniencia de reservar animales de bajo peso al nacimiento como futuros reproductores. La utilización de piensos fibrosos durante la recría se muestra como posible alternativa de restricción alimentaria sin afectar al desarrollo de las conejas. Sin embargo, hay que seguir trabajando en el adecuado manejo de estos piensos y su efecto sobre la reproducción.

Bibliografía

Pascual J.J., Castella F., Cervera C., Blas E., Fernández-Carmona J. 2000. The use of ultrasound measurement of perirenal fat thickness to estimate changes in body condition of Young female rabbits. *Animal Science*, 70:435-442.

Pascual J.J., Cervera C., Fernández-Carmona J. 2002. Feeding program for Young rabbit does base on lucerne diets. *World Rabbit Science*, 10:7-13.

Pascual J.J., Xiccato G., Fortun-Lamothe L. 2006. Strategies for doe's corporal condition improvement - relationship with litter viability and career length. COST Book 848 (EU). In: L. Maertens and P. Coudert (eds.) *Recent Advances in Rrabbit Science*. ILVO, Melle, Belgium, pp. 247-258.

Poigner J., Szendrő Zs., Lévai A., Radnai I., Biró-Németh E. 2000a. Effect of birth weight and litter size on growth and mortality in rabbits. *World Rabbit Science*, 8:17-21.

Poigner J., Szendrő Zs., Lévai A., Radnai I., Biró-Németh E. 2000b. Effect of birth weight and litter size at suckling age on reproductive performance in does as adults. *World Rabbit Science*, 8:103-109.

Quevedo F., Cervera C., Blas E., Baselga M., Costa C., Pascual J.J. 2005. Effect of selection for litter size and feeding programme on the performance of young rabbit females during rearing and first pregnancy. *Animal Science*, 80:161-168.

Rommers J.M. 2004. Breeding of young females does. In: *Proc. of 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico*, pp.: 1518-1530

SAS. 2002. *SAS/SAT User's Guide (Release 9.1)*. SAS Inst. Inc. Cary NC, USA.

Theilgaard P., Sánchez J.P., Pascual J.J., Friggens N., Baselga M. 2006. Effect of body fatness and selection for prolificacy on survival of rabbit does assessed using a cryopreserved control population. *Livestock Science*, 103:65-73.

Xiccato G. 1996. Nutrition of lactating does. In: *Proc. of 6th World Rabbit Congress, F. Lebas (ed.) Toulouse, France, vol. 1*, pp.: 29-47.

Xiccato G., Bernardin M., Castellini C., Dalle-Zotte A., Queaque P.I., Trocino A. 1999. Effect of postweaning feeding on the performance and energy balance of female rabbits at different physiological states. *Journal of Animal Science*, 77:416-426.

Costes asociados al manejo de la alimentación y al pienso empleado

Effect of feeding management and food on production costs

Heras J., Martínez E., Ródenas L., Martínez-Vallespín B., Fernández C., Blas E., Cervera C.*

ICTA, Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia, Spain

*Dirección de contacto: ccervera@dca.upv.es

Resumen

Para valorar la variación del consumo de pienso cuando se aplican estrategias para mejorar la salud de los conejos jóvenes se han utilizado 162 camadas procedentes de 88 conejas entre el sexto y noveno parto, distribuidas en cuatro grupos en los que variaba la edad al destete (28 y 42 días) y la alimentación desde los 17 a los 49 días de vida (comercial o peridestete). Cada camada se dividió al destete en dos grupos que recibieron alimentación *ad libitum* o restringida hasta los 56 días de vida. Los resultados obtenidos muestran que los tres tratamientos estudiados redujeron la mortalidad en el cebadero, pero solo cuando dicho descenso asociado al tratamiento fue importante (50%) se obtuvo una reducción del 30% en el gasto de pienso por kilo de conejo vendido.

Palabras clave: edad al destete, restricción, peridestete, gasto alimentación.

Abstract

One hundred sixty two litters from six to nine parturition of 88 rabbit does were distributed on four groups, varying on feed from 17 to 56 days of age and weaning time. Litters were divided at weaning, half were feeding *ad libitum* and half restricted until 56 days of life. Feed intake of does and litters were recorded from insemination to the end of fattening period (60 days) and feeding cost of each fattened rabbit was calculated. The use of a specific feed for young rabbits, the delay on weaning time and the feed restriction during fattening period improve the viability of rabbits, but only a great reduction of mortality (50%) had a reduction in feeding cost of 30%.

Key words: weaning time, feeding restriction, feeding cost.

Introducción

En la actualidad, las enfermedades infecciosas del sistema digestivo representan el 71% del total de las enfermedades que afectan al conejo, debido en gran medida a la incidencia de la enteropatía epizoótica del conejo (ERE), que puede llegar a causar hasta un 60% de mortalidad y un relevante aumento de la morbilidad en los animales de engorde (Rosell et al., 2000).

La utilización de antibióticos ha sido la manera habitual de controlar la mortalidad en el cebadero, lo que, además de que pueda ser considerada una práctica poco deseable desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, ha hecho que el coste de tratamientos veterinarios se haya multiplicado por 2,5, lo que incrementa los costes de producción.

Por ello, se han planteado otras alternativas para reducir la mortalidad ligadas con la alimentación y/o con el manejo de ésta en la granja, principalmente, la utilización de piensos especialmente formulados para los animales de peridestete (Soler et al., 2004; Carabaño et al., 2005), prolongar la alimentación láctea retrasando la edad de destete (Gallois et al., 2005; Martínez et al., 2009) y restringir la alimentación durante una parte del periodo de cebo (Boisot et al., 2003; Gidenne et al., 2009). Con las tres estrategias se han logrado mejoras sustanciales de la viabilidad de los gazapos tras el destete, lo que permite aumentar la productividad y reducir costes, pero estas estrategias afectan también a otros parámetros relacionados de forma negativa con el gasto destinado a la alimentación y, por tanto, con el coste de producción. Así, si junto a una mayor supervivencia de los animales de cebo se produce también un descenso de fertilidad o un empeoramiento del estado corporal de las madres por emplear piensos de peridestete (Martínez-Vallespín et al., 2008), o el aumento del intervalo entre partos por retrasar el destete, o un descenso del crecimiento por restringir la alimentación en el cebadero, etc., estas otras variaciones acabarán originando un mayor consumo de pienso y, por tanto, el efecto real de estas alternativas relacionadas con la alimentación sobre el coste final de producción no se ha valorado en su totalidad.

Material y métodos

En una granja afectada por frecuentes brotes de ERE, se han utilizado 162 camadas (1458 gazapos) procedentes de 88 conejas cruzadas multíparas entre el sexto y el noveno parto hasta los 60 días de vida. A cada coneja y sus camadas se les había asignado al inicio de su vida reproductiva uno de los cuatro grupos experimentales, definidos por la alimentación recibida durante la lactación y el cebo, el tiempo transcurrido entre el parto y la siguiente inseminación de la madre (IA) y por la edad de los gazapos al destete, y cuyas características se muestran de forma detallada en la Tabla 1.

	IA	Destete	Alimentación					
			17 d	28 d	42 d	49 d	56 d	60 d
Grupo 1	11	28	L	L	C	C	C	R
Grupo 2	25	42	L	L	L	C	C	R
Grupo 3	11	28	L	PD48	PD48	PD48	C	R
Grupo 4	25	42	L	PD48	PD48	PD48	C	R

Tabla 1. Ritmo de reproducción de las conejas (inseminación, IA, y destete en días post-parto) y alimentación desde el parto al sacrificio en cada uno de los grupos experimentales (L: pienso de lactación, C: pienso de cebo, PD48: pienso peridestete y R: pienso de retirada).

Tras el destete los animales de cada camada fueron separados de forma aleatoria en dos grupos, uno de los grupos pasaba a recibir alimentación a voluntad y el otro alimentación restringida al 70% hasta los 56 días de vida y *ad libitum* a partir de entonces. Durante toda la experiencia se controlaron los consumos de los distintos piensos de la coneja y de los gazapos, la mortalidad y el peso de las camadas y los días transcurridos desde el destete al parto siguiente de la coneja. En cada ciclo productivo la experiencia finalizaba cuando los conejos alcanzaban los 2 kg de peso vivo o a los 60 días de vida, por lo que en los controles de los días 56 y 60 se anotaba también el número y peso de los conejos que no habían alcanzado el peso de matadero, retirando del grupo el día 56 aquellos animales que hubieran finalizado la experiencia.

A partir de los datos medidos en granja se calculó la repercusión de consumo de piensos en la nave de maternidad y en el cebadero por cada conejo vendido (EIG) y los porcentajes de animales que no alcanzan el peso de matadero a los 56 y a los 60 días y se estimó el número de días que habría que prolongar el cebo para conseguir el peso de matadero en los animales que no habían alcanzado los 2 kg de peso a los 60 días (ADS), suponiendo un crecimiento igual al registrado entre 56 y 60 días.

Resultados y discusión

La evolución del tamaño de la camada y de los grupos de cebo mostraron el efecto esperado y descrito por otros autores, y los tres factores (pienso de peridestete, destete tardío y restricción alimentaria) redujeron la mortalidad, sin embargo al analizar la mortalidad registrada en cada grupo se observó que la restricción alimentaria solo fue efectiva cuando se desteta a 28 días y no se emplea pienso de peridestete (grupo 1), y que el empleo de pienso de peridestete cuando se prolonga la lactación fue menos efectivo y no redujo la mortalidad (grupo 4 vs. 2), tal como se muestra en la Figura 1.

Igualmente, tal como se muestra en la Tabla 2, se observó que los animales que destetan a 28 días consumen más pienso y tienen un menor crecimiento que los gazapos que continúan recibiendo leche, efecto también registrado por los demás autores, pero estas diferencias desaparecieron o se invirtieron cuando los segundos fueron destetados; a pesar de ello, el consumo medio durante todo el periodo de cebo de los gazapos destetados a los 28 días fue mayor.

Del mismo modo, la restricción alimentaria afecta de forma importante al crecimiento, dando pesos más bajos al sacrificio y au-

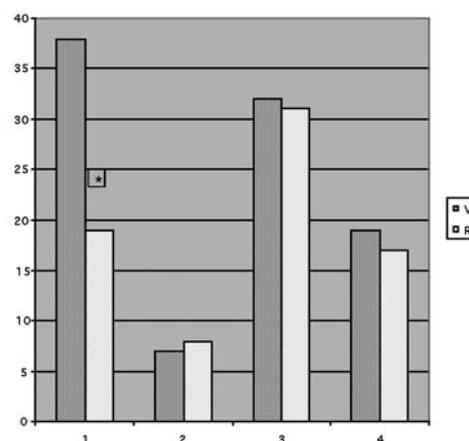


Figura 1. Mortalidad de gazapos durante el cebo según se emplee un pienso de peridestete (grupos 3 y 4) o no (grupos 1 y 2), se destete a 28 días (grupos 1 y 3) o a 42 días (grupos 2 y 4) y se realice restricción alimentaria (R) o no (V) durante el cebo.

mentando el porcentaje de animales que no alcanzan dicho peso a los 60 días de vida, lo que obligaría a prolongar el tiempo de cebo entre 5 y 10 días más, aumentando por tanto el pienso gastado en el cebadero.

Por otro lado, aunque el consumo de pienso de las madres en los distintos grupos varió cuando se empleo pienso de peridestete (aumentó el consumo), su repercusión sobre el gasto de pienso final por gazapo vendido no fue importante y no se produjeron alteraciones importantes de la fertilidad de las madres ni, por tanto, de su consumo durante el periodo seco y/o gestante entre los grupos. La prolongación del destete sí aumenta el consumo de pienso en la nave de lactación, pero su repercusión sobre gazapo vendido se atenúa cuando la reducción de la mortalidad es más importante (grupo 2) y, simultáneamente se reduce el consumo de pienso en el cebadero por el menor tiempo que los animales están allí (grupos 2 y 4).

	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		SE
	V	R	V	R	V	R	V	R	
Ingestión (g/d)	89	79	76	71	92	75	75	70	1.59
Crecimiento (g/d)	44	38	44	41	45	40	42	39	0.66
Peso final (g)	1964	1832	1917	1859	1961	1845	1823	1788	21
Bajo peso a 60 d (%)	8	35	14	14	13	30	24	34	0.04
Días extra-cebo	9	6	9	5	7	5	10	10	1.1
Consumo en maternidad (g)	3810	2927	3810	4101	3639	3201	5147	4384	322
Consumo en cebadero (g)	4339	3500	2072	2011	4144	3625	2242	2039	130
Gasto de pienso (g)	8149	6428	5660	5806	7783	6827	6935	6071	400
IC	4.1	3.5	2.9	3.1	3.9	3.7	3.8	3.4	0.23

V: alimentación a voluntad. R: alimentación restringida al 70% desde el destete hasta los 56 días. SE: Error Standard.

Tabla 2. Repercusiones sobre el crecimiento y la ingestión del conejo de cebo y sobre el gasto de pienso en maternidad y cebadero por cada conejo vendido del empleo de pienso de peridestete (grupos 3 y 4 vs. 1 y 2), del destete tardío (2 y 4 vs. 1 y 3) y de la restricción alimentaria en cebadero (R vs. V)

La restricción de la alimentación en el cebadero redujo la repercusión del pienso consumido por gazapo vendido cuando se destetó a los 28 días, tanto del pienso consumido en la nave de madres como en el cebadero, pero su efecto fue muy limitado o inexistente cuando se destetó a los 42 días.

Así pues, la repercusión del gasto de pienso por kilo de conejo vendido (IC) fue muy alto cuando se destetó a los 28 días frente a lactaciones más prolongadas (grupos 1 y 3 vs. Grupo 2). En estas condiciones, y cuando no se empleó pienso de peridestete, la restricción de alimento en el cebadero mejora sensiblemente el IC, debido, fundamentalmente a una sensible reducción de la mortalidad (50%), pero en el resto de las condiciones de alimentación y/o de manejo alimentario, no se han encontrado mejoras sensibles del gasto asociado a la alimentación.

Bibliografía

- Boisot P., Licois D., Gidenne, T. 2003. Feed restriction reduces the sanitary impact of an experimental reproduction of epizootic rabbit enteropathy syndrome (ERE), in the growing rabbit. 10èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris, pp.: 267-270.
- Carabaño R., Rebollar P.G., Gómez-Conde M.S., Chamorro S., García J., de Blas C. 2005. Nuevas tendencias en la alimentación de conejos: Influencia de la nutrición sobre la salud intestinal. XXI Curso de especialización FEDNA. Madrid, pp.: 113-129.
- Gallois M., Boullier S., Million A., Gidenne, T. 2005. Age au sevrage et sensibilité à une infection expérimentale par une souche d'E.

coli O103. 11èmes Journées Recherche Cunicole, Paris, pp.: 249-252.

Gidenne T., Combes S., Feugier A., Jehl N., Arveux P., Boisot P., Briens C., Corrent E., Fortune H., Montessuy S., Verdelhan S. 2009. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal*, 3:509-515.

Martínez E., Martínez-Vallespín B., Ródenas L., Pascual J.J., Blas E., Cervera C. 2009. Mortalidad de gazapos de cebo en función de la alimentación y de la edad al destete. XXXIV Symposium de Cunicultura. Sevilla, pp.: 133-137.

Martínez-Vallespín B., Cerrillo S., Martínez E., Ródenas L., Cervera C., Pascual J.J., Blas E. 2008. Efecto del mangime da svezzamento sulla coniglia in lattazione. Giornate di Conigliocultura ASIC 2007. Forlì, pp.: 1-4.

Rosell J.M., Cuervo L., Argüello J.L., Badiola J.I., Blas E. 2000. Enteropatía mucoide. En: Enfermedades del conejo. II Enfermedades. (Ed Rosell, J.M.). Ed Mundi-Prensa. Barcelona, pp.: 248-263.

Soler M.D., Blas E., Cano J.L., Pascual J.J., Cervera C., Fernández-Carmona J. 2004. Efecto de la relación fibra digestible/almidón y del contenido en grasa del pienso sobre la mortalidad de los conejos. XXIX Symposium de Cunicultura. Lugo, pp.: 143-146.

Efecto de la restricción alimentaria sobre los parámetros productivos y la viabilidad de gazapos en dos cebos consecutivos

Impact of feed restriction on fattening performances and young rabbit survival in two consecutive fattening periods

Romero C., Cuesta S., Astillero J.R., Nicodemus N., de Blas C.

Departamento de Producción Animal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España

Dirección de contacto: carlibor20@yahoo.es

Resumen

Para realizar este trabajo, se cebaron dos bandas consecutivas de gazapos de cruce Neozelandés Blanco x Californiano en los que se estudió el efecto de la retirada de los comederos desde las 17:30 hasta las 09:30 h, durante los primeros 14 días tras el destete (35 días de edad), sobre los parámetros productivos y sobre la viabilidad de los gazapos. En ambos cebos, durante los primeros 14 días de cebo, la restricción redujo de forma significativa ($P < 0,001$) el consumo y la ganancia de peso de los gazapos. En los siguientes 14 días de cebo, hubo un crecimiento compensatorio de los gazapos restringidos que, sin embargo, terminaron el cebo (63 días) con un peso vivo menor ($P < 0,005$) que el de los gazapos alimentados siempre *ad libitum* e inferior a los 2 kg. En el segundo cebo, los conejos restringidos alcanzaron los 2 kg de peso vivo cuando la edad de sacrificio se pospuso a los 70 días. Por otro lado, en ninguno de los dos cebos, la restricción permitió mejorar de forma significativa el índice de conversión. La mortalidad media fue de un 2,08% en el primer cebo mientras que ascendió a un 15,6% en el segundo. En este último cebo, la restricción alimentaria permitió reducir el porcentaje de mortalidad de 25,6 a 6,34% ($P = 0,017$). Sin embargo, la mayor incidencia de diarreas no sólo aumentó la mortalidad con respecto al primer cebo, sino también la morbilidad, conduciendo así a una mayor heterogeneidad en los resultados productivos y a un índice de conversión real mayor que el índice de conversión técnico, obtenido cuando sólo se tuvo en cuenta el consumo de los animales que estaban vivos al final del cebo (3,62 vs. 2,88).

Palabras clave: gazapos, restricción, mortalidad, morbilidad, índice de conversión.

Abstract

This work consisted of two consecutive studies and aimed to test the effect of a feed restriction (feeders were withdrawn from 17:30 to 09:30 h) during the first 14 days after weaning (35 days of age) on fattening performances and rabbit mortality. In both studies, feed restriction reduced ($P < 0.001$) weight gain and feed intake from day 35 to day 49. In the following 14 days, restricted rabbits had a compensatory growth but, at 63 days of age, weighed less than 2 kg and their mean weight was lower ($P < 0.005$) than that of ad libitum fed rabbits. In the second study, restricted rabbits reached a body weight of 2 kg when slaughter was postponed at 70 days. In none of the studies, feed restriction allowed to improve feed conversion. Mean mortality rate was 2.08% in the first study but amounted to 15.6% in the second one. In the latter study, feed restriction reduced mortality rate (from 25.6 to 6.34%; $P = 0.017$). However, in this study, the higher diarrhea incidence did not only increase mortality rate compared to the first study but also rose number of morbid animals, leading thereby to a larger heterogeneity of productive results and to a real feed conversion ratio (3.62; calculated by taking into account feed intake of rabbits that died afterwards) that was much higher than that determined by solely considering animals that were alive at the end (2.88).

Key words: young rabbits, feed restriction, mortality, morbidity, feed conversion.

Introducción

Los efectos de la restricción alimentaria sobre los humanos (Polivy, 1996) así como su posible interés en especies ganaderas (cerdos: Lovatto et al., 2006; avicultura de carne: Tumova et al., 2002) se conocen desde hace varios años. Asimismo, son

ya numerosos los trabajos de experimentación que estudiaron el efecto de la restricción alimentaria en conejos. La mayoría de esos trabajos pretendía conocer la influencia de la restricción sobre variables como el crecimiento del animal y sus órganos (Lebas y Laplace, 1982), la calidad de la canal (Ledín, 1984; Tumova et al., 2006), la calidad de la carne (Dalle Zotte et al., 2005) o la eficiencia alimenticia (Maertens y Peeters, 1988; Maertens, 2008). No obstante, son pocos los trabajos que presentan resultados de mortalidad y morbilidad en gazapos sometidos a restricción (Boisot et al., 2003; Gidenne et al., 2003). Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de una restricción alimentaria sobre los parámetros productivos y la viabilidad de gazapos en crecimiento.

Material y métodos

Para realizar este estudio, se llevaron a cabo dos cebos consecutivos de gazapos de cruce Neozelandés Blanco y California. Dichos cebos se desarrollaron en una misma nave en las instalaciones experimentales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid. Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de 600 x 250 x 330 mm³, con un programa de luz-oscuridad de 12 horas (la luz se encendía a las 07:30 h) y de acuerdo al R.D. 1201/2005 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Antes del comienzo de cada cebo, las jaulas fueron lavadas con agua a presión y quemadas con un soplete. A continuación, se aplicó sobre las jaulas y el suelo un producto esporicida disuelto en agua (Composición: 15% glutaraldehído, 10% cloruro de didecildimetil-amonio, 10% cipermetrina).

En ambos cebos, se utilizaron pienso (33,0% FND, 15,5% PB, 10,1 MJ ED/kg) y agua no medicados. Tanto en el primer cebo como en el segundo, se utilizaron 96 gazapos (12 camadas) que fueron destetados a los 35 días de edad (el peso medio al destete fue 800 ± 97 y 807 ± 105 g y la edad de sacrificio de 63 y 70 días en el primer y segundo cebo, respectivamente). De cada camada se cogieron al azar 8 gazapos de los cuales 4 recibieron pienso *ad libitum* durante todo el periodo de cebo, mientras que los otros 4 gazapos fueron restringidos durante los 14 primeros días tras el destete mediante una retirada diaria de los comederos desde las 17:30 hasta las 09:30 h. Se controló el crecimiento y el consumo de pienso de los gazapos a los 14, 28 y 35 días post-destete (esta última edad sólo en el segundo cebo). En ambos cebos, la mortalidad y la morbilidad (porcentaje de animales enfermos sobre el total de animales vivos) se controlaron diariamente (dos veces al día).

El efecto del nivel de alimentación sobre los parámetros productivos se analizó según un modelo al azar con la camada como bloque y el peso al destete como covariable, usando el procedimiento GLM de SAS (1991). El análisis estadístico de la mortalidad y la morbilidad se realizó con el procedimiento GENMOD (distribución binomial).

Resultados y discusión

Las Tablas 1 y 2 muestran el efecto del nivel de alimentación sobre los parámetros productivos en los dos cebos estudiados. En el primer cebo, la retirada de comederos durante los 14 primeros días después del destete supuso una restricción cuantitativa del 21,3%. Así, en ese tramo de edad, el nivel de alimentación tuvo un efecto significativo sobre el consumo (94,3 vs. 74,2 g/d; P<0,001), la ganancia de peso (43,6 vs. 27,1 g/d; P<0,001) y el índice de conversión (2,28 vs. 2,92; P<0,001). En los siguientes 14 días de cebo, los conejos, que previamente habían sido restringidos, alcanzaron el consumo de los conejos nunca restringidos (131,0 vs. 133,0 g/d) y tuvieron un crecimiento compensatorio (44,8 vs. 54,8 g/d; P<0,001) que dio lugar a un mejor índice de conversión (3,00 vs. 2,48; P<0,001). No obstante, al concluir el cebo (63 días de edad), los conejos que habían sido restringidos al comienzo del experimento alcanzaron un peso final inferior al objetivo comercial (1989 vs. 1888 g; P=0,0015). En el periodo global de cebo, el índice de conversión de los gazapos restringidos no fue mejor que el de los conejos que estuvieron siempre alimentados *ad libitum* (2,55 vs. 2,56). De forma análoga, en el trabajo de Gidenne y Feugier (2009), tras una restricción efectuada entre los 34 y los 55 días de edad, el peso final de los conejos (a los 69 d) sufrió una caída que dependió del nivel de restricción aplicado (de los 2383 a los 2209 g para una restricción del 40%).

En el segundo cebo, la restricción alimentaria fue del 14,1% y también afectó de manera significativa al consumo (83,9 vs. 72,1 g/d; P<0,001), la ganancia de peso (39,7 vs. 23,2 g/d; P<0,001) y el índice de conversión (2,23 vs. 3,07; P<0,001). Paralelamente al primer cebo, los gazapos restringidos tras el destete tuvieron posteriormente (49-63 días de edad) un crecimiento compensatorio (45,3 vs. 55,7 g/d; P<0,001) que, sin embargo, no impidió que esos animales pesasen menos a los 63 (1997 vs. 1829 g; P=0,002) y a los 70 días de edad (2285 vs. 2101 g; P=0,0014). No obstante, cabe señalar que a esta última edad, sí que se alcanzó el peso óptimo de sacrificio.

La mortalidad media ascendió a 2,08% en el primer cebo, registrándose únicamente una baja en cada uno de los tratamientos. Por el contrario, en el segundo cebo la mortalidad y la morbilidad medias fueron, respectivamente, de un 15,6 y un 26,0%

Nivel de alimentación	<i>Ad libitum</i>	Restringido ²	rsd (n=48)	P _{nivel}
Dos primeras semanas tras el destete (35 – 49 días de edad)				
CMD ³ , g	94,3	74,2	12,3	<0,001
GMD, g	43,6	27,1	8,25	<0,001
IC	2,28	2,92	0,87	<0,001
Últimas dos semanas del cebo (49 – 63 días de edad)				
CMD, g	131,0	133,0	16,9	n.s.
GMD, g	44,8	54,8	8,59	<0,001
IC	3,00	2,48	0,54	<0,001
Periodo total de cebo (35 – 63 días de edad)				
CMD, g	112,1	103,7	12,6	0,0027
GMD, g	44,0	40,4	5,17	0,0013
IC	2,55	2,56	0,20	n.s.
Peso final, g	1989	1888	140,5	0,0015

¹El porcentaje medio de mortalidad fue de 2,08 %.

²Los comederos fueron retirados desde las 17:30 hasta las 09:30 h.

³CMD: Consumo medio diario. GMD: Ganancia media diaria. IC: Índice de conversión.

Tabla 1. Efecto del nivel de alimentación sobre los parámetros productivos en un cebo con baja mortalidad¹.

Nivel de alimentación	<i>Ad libitum</i>	Restringido ²	rsd (n=48)	P _{nivel}
Dos primeras semanas tras el destete (35 – 49 días de edad)				
CMD ³ , g	83,9	72,1	15,7	<0,001
GMD, g	39,7	23,2	9,35	<0,001
IC	2,23	3,07	0,99	<0,001
Últimas dos semanas del cebo (49 – 63 días de edad)				
CMD, g	128,6	130,7	17,5	n.s.
GMD, g	45,3	55,7	9,01	<0,001
IC	2,89	2,36	0,58	<0,001
Periodo total de cebo (35 – 63 días de edad)				
CMD, g	110,7	101,9	13,9	0,0035
GMD, g	43,0	40,1	6,93	0,090
IC técnico 35-63	2,58	2,55	0,31	n.s.
IC técnico 35-70	2,96	2,81	0,40	n.s.
IC real 35-70	3,77	3,48	-	-
Peso final a 63 d, g	1997	1829	232,1	0,0020
Peso final a 70 d, g	2285	2101	246,0	0,0014

¹El porcentaje medio total de mortalidad fue 15,63 %.

²Los comederos fueron retirados desde las 17:30 hasta las 09:30 h.

³CMD: Consumo medio diario. GMD: Ganancia media diaria. IC: Índice de conversión.

Tabla 2. Efecto del nivel de alimentación sobre los parámetros productivos en un cebo con mortalidad media-alta¹.

(Tabla 3). Para ambas variables, la interacción del nivel de alimentación por el periodo de cebo (0-14 d ó 14-28 d post-destete) resultó significativa, puesto que la mortalidad y la morbilidad fueron más altas en el primer periodo para los gazapos alimentados *ad libitum* (22,9 vs. 2,70% y 33,3 vs. 8,11%), mientras que no hubo diferencias entre periodos para los conejos restringidos. De media, la mortalidad de los animales restringidos fue menor (25,6 vs. 6,34%; P=0,017) y, en general, la mortalidad fue mayor en los 14 primeros días tras el destete (27,1 vs. 4,87%; P=0,0060). Esta distribución de las bajas ya fue observada en trabajos anteriores (Romero et al., 2009a,b). La mayor incidencia de trastornos digestivos en el segundo cebo no só-

lo supuso unas mayores tasas de mortalidad y morbilidad sino que también llevó a una mayor heterogeneidad reflejada en los valores de la desviación residual estándar (rsd), que fueron mayores en el segundo cebo con respecto al primero, y a diferencias entre el índice de conversión técnico y el económico (Maertens, 2008). Así, aunque no se muestra el valor del índice económico o real para el primer cebo, se asume que, dada la mortalidad, es muy similar al valor técnico, mientras que en el segundo cebo el índice económico medido a los 70 días es, de media, un 25,6% superior al índice técnico. Romero et al. (2009b) también observaron un efecto negativo, asociado a una mayor proporción de animales mórbidos, sobre el crecimiento de los animales cebados y, especialmente, sobre la homogeneidad de los pesos.

Nivel de alimentación	<i>Ad libitum</i>		Restringido ¹		P _{nivel}	P _{periodo}	Int.
	0-14 d	14-28 d	0-14 d	14-28 d			
Mortalidad, %	22,9 ^a	2,70 ^b	4,17 ^b	2,17 ^b	0,017	0,0060	0,024
Morbilidad, %	33,3 ^a	8,11 ^b	8,33 ^b	4,35 ^b	0,0042	0,0036	0,033

¹Los comederos fueron retirados desde las 17:30 hasta las 09:30 h.
Medias de una misma fila con letras distintas difieren significativamente.

Tabla 3. Efecto del nivel de alimentación y del periodo de cebo sobre la viabilidad de los gazapos (n=48) en un cebo con mortalidad media-alta.

El efecto de la restricción sobre la mortalidad encontrado en este trabajo coincide con los resultados de Boisot et al. (2003) y Gidenne et al. (2003), poniendo de manifiesto el interés de restringir en cebos no medicados cuando la incidencia de trastornos digestivos es alta. De hecho, Tudela (2008) apuntaba que el 80% de los cunicultores franceses hacen uso de la restricción alimentaria. No obstante, en este trabajo se ha visto que era necesario alargar el cebo hasta los 70 días de edad para alcanzar un peso superior a los 2 kg en gazapos restringidos. Así, los estudios realizados por otros autores europeos (Ledín, 1984; Boisot et al., 2003; Tumova et al., 2006; Gidenne y Feugier, 2009) presentan datos de animales sacrificados con 70, 84 o, incluso, 160 días de edad. En conclusión, el interés práctico de la restricción en España queda limitado por la edad convencional de sacrificio y, por tanto, la restricción pierde interés como estrategia preventiva de la aparición de enfermedades digestivas. No obstante, sí podría usarse como recurso para mitigar el efecto de un brote importante de diarreas en la granja.

Bibliografía

- Boisot P., Licois D., Gidenne T. 2003. Une restriction alimentaire permet de réduire l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. 10èmes Journées de la Recherche Cunicole, pp.: 267-270.
- Dalle Zotte A., Régnon H., Ouhayoun J. 2005. Effect of feed rationing during post-weaning growth on meat quality, muscle energy metabolism and fibre properties of Biceps femoris muscle in the rabbit. *Meat Science*, 70:301-306.
- Gidenne T., Feugier A. 2009. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 1. Impact on digestion, rate of passage and microbial activity. *Animal*, 3:501-508.
- Gidenne T., Feugier A., Jehl N., Arveux P., Boisot P., Briens C., Corrent E., Fortune H., Montessuy S., Verdelhan S. 2003. Un rationnement alimentaire quantitatif post-sevrage permet de réduire la fréquence des diarrhées, sans dégradation importante des performances de croissance: résultats d'une étude multi-site. 10èmes Journées de la Recherche Cunicole, pp.: 29-32.
- Lebas F., Laplace J.P. 1982. Mesurations viscérales chez le lapin. 4. Effets de divers modes de restriction alimentaire sur la croissance corporelle et viscérale. *Annales de Zootechnie*, 31:391-430.
- Ledín I. 1984. Effect of restricted feeding and realimentation on compensatory growth, carcass composition and organ growth in rabbit. *Annales de Zootechnie*, 33:33-50.
- Lovatto P.A., Sauvart D., Noblet J., Dubois S., van Milgen J. 2006. Effects of feed restriction and subsequent refeeding on energy utilization in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 84:3329-3336.
- Maertens L. 2008. Estrategias para reducir el índice de conversión. XXXIII Symposium de ASESCU, pp.: 6-13.
- Maertens L., Peeters J.E. 1988. Effect of feed restriction after weaning on fattening performances and caecal traits of early weaned rabbits. *Deutsche Veterinarmedizinische Gesellschaft*, pp.: 158-169.
- Polivy J. 1996. Psychological consequences of food restriction. *Journal of the American Dietetic Association*, 96:589-592.
- Romero C., Nicodemus N., García-Rebollar P., García-Ruiz A.I., Ibáñez M.A., de Blas C. 2009a. Dietary level of fibre and age at weaning affect the proliferation of *Clostridium perfringens* in the caecum, the incidence of Epizootic Rabbit Enteropathy and the performance of fattening rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, 153:13-140.
- Romero C., Nicodemus N., Chamorro S., García-Ruiz A.I., Ibáñez M.A., de Blas C. 2009b. Estudio del efecto de la enteropatía epi-

- zoótica del conejo sobre los rendimientos productivos en dos cebos consecutivos. XIII Jornadas ITEA, pp.: 188-190.
- Tudela F. 2008. Producción de conejos con restricciones alimentarias. XXXIII Symposium de ASESCU, pp.: 14-21.
- Tumova E., Skrivan M., Skrivanova V., Kacerovska L. 2002. Effect of early feed restriction on growth in broiler chickens, turkeys and rabbits. Czech Journal of Animal Science, 47:418-428.
- Tumova E., Zita L., Stolc L. 2006. Carcass quality in restricted and ad libitum fed rabbits. Czech Journal of Animal Science, 51:214-219.

Efecto del grado de molienda de la cebada y el heno de alfalfa sobre los parámetros productivos y la digestión en gazapos de cebo

Effect of type of grinding of barley and lucerne hay on performance and digestion of growing rabbits

Romero C.¹, Nicodemus N.¹, Rodríguez J.D.¹, García A.I.², de Blas C.¹

¹ Departamento de Producción Animal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España

² Poultry and Rabbit Research Centre, Nutreco, 45950 Casarrubios del Monte (Toledo), España

Dirección de contacto: carlibor20@yahoo.es

Resumen

Este trabajo consistió en tres cebos consecutivos (destete a los 35 días y sacrificio a los 63 días) de gazapos Neozelandés Blanco x Californiano en los que se usaron 4 piensos formulados de acuerdo con un diseño factorial 2 x 2 con el grado de molienda (grosero, 4,5 mm vs. fino, 1,5 mm) y el ingrediente molido (cebada vs. heno de alfalfa) como efectos principales. La molienda fina de la cebada sólo supuso una bajada de la velocidad de crecimiento (de 43,7 a 42,1 g/d; $P < 0,05$) cuando también el heno de alfalfa había sido molido a 1,5 mm. Hubo un efecto significativo ($P < 0,0001$) del experimento sobre la tasa de mortalidad que fue, de media, 5,90, 7,00 y 16,00% para los experimentos 1, 2 y 3, respectivamente. Sin embargo, no hubo efecto significativo de los tratamientos sobre la mortalidad. Los coeficientes de digestibilidad ileal aparente de la MS y el almidón se incrementaron en un 19,1 ($P = 0,037$) y 5,33% ($P = 0,065$), respectivamente, en los conejos que recibían el heno de alfalfa grosero cuando la cebada era molida a 1,5 mm. No hubo efecto significativo de los tratamientos sobre los coeficientes de digestibilidad fecal. Éstos fueron de media 0,596, 0,370, 0,687 y 0,609 para la MS, la FND, la PB y la energía, respectivamente, y el contenido medio de energía digestible fue de 10,8 MJ/kg MS.

Palabras clave: gazapos, tamaño de partícula, crecimiento, digestibilidad.

Abstract

This work consisted of three consecutive fattening periods (from weaning -35 d- to slaughter -63 d-) in which four treatments arranged in a factorial structure 2 x 2 with grinding (coarse, 4.5 mm vs. fine, 1.5 mm) and ingredient (barley vs. lucerne hay) were tested. Fine grinding of barley only implied a decrease of weight gain (from 43.7 to 42.1 g/d; $P < 0.05$) when also lucerne hay was ground at 1.5 mm. Mortality rate was significantly influenced ($P < 0.0001$) by the fattening period, being on average 5.90, 7.00 and 16.00% for the first, second and third periods. However, none of the treatments did affect mortality rate. Apparent ileal digestibility coefficients of dry matter and starch increased by 19.1 ($P = 0.037$) and 5.33% ($P = 0.065$), respectively, in rabbits fed a diet containing coarse lucerne hay when barley was finely ground. Apparent faecal digestibility coefficients were not influenced either by type of grinding of barley or that of lucerne hay and measured on average 0.596, 0.370, 0.687 and 0.609 for dry matter, neutral detergent fibre, crude protein and energy, respectively and the average digestible energy content amounted to 10.8 MJ/kg DM.

Key words: young rabbits, particle size, growth, digestibility.

Introducción

En los últimos años, los resultados productivos en el sector cunícola de carne han mejorado notablemente. Para alcanzar esos niveles productivos y sin olvidar que el conejo es un animal herbívoro (el nivel de FND para gazapos en crecimiento es de 37% MS), los piensos actuales incorporan como principales materias primas la cebada y el heno de alfalfa (De Blas y Mateos, 1998). La molienda de estos ingredientes permite modificar su tamaño de partícula y por tanto sus características físicas (Morisse, 1982; Heidenreich, 1992). Aunque algunos autores recomiendan el uso de tamices de 2-2,5 mm (Mateos y Rial, 1989; Lebas, 2000), otros grados de molienda podrían conferir a los ingredientes propiedades físicas con posible repercusión sobre los índices productivos. Así, el tamaño de partícula de los ingredientes fibrosos afecta al tránsito de la digesta (Gidenne

et al., 1991), la digestión (García et al., 1999; Nicodemus et al., 2006) y el consumo de alimento (Auvergne et al., 1987). Por otro lado, el tamaño de partícula de la cebada puede facilitar la adhesión de las enzimas al gránulo de almidón (Svihus et al., 2005), contribuyendo así a una mejora de la digestión del mismo (Blas y Gidenne, 1998). Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del grado de molienda de la cebada y el heno de alfalfa en un pienso de gazapos en crecimiento sobre los parámetros productivos y la digestión de los nutrientes.

Material y métodos

Se formuló una dieta no medicada (27,5% heno de alfalfa, 24,0% cebada, 19,9% harina de girasol y 15,0% pulpa de remolacha) en base a las recomendaciones de De Blas y Mateos (1998) que dio lugar a cuatro piensos (Tabla 1) utilizando un diseño factorial 2 x 2 con el grado de molienda (molienda grosera, 4,5 mm vs. molienda fina, 1,5 mm) de los dos ingredientes principales (cebada vs. heno de alfalfa). En este trabajo, se cebaron tres bandas consecutivas de gazapos Neozelandés Blanco x Californiano nacidos en las instalaciones experimentales de la UPM. Los animales fueron alojados en jaulas de 60 x 250 x 330 mm³, con un programa de luz-oscuridad de 12 horas, con acceso libre al pienso y al agua de bebida y tratados de acuerdo con el R.D. 1201/2005 sobre protección de animales. En el primer experimento, se usaron 44 gazapos destetados a los 35 días de edad (851 ± 91,3 g) que fueron alojados individualmente para determinar la digestibilidad fecal aparente de la materia seca (MS), la energía, la proteína bruta (PB) y la fibra neutro detergente (FND). Esos 44 gazapos así como otros 44 gazapos alojados de dos en dos y destetados a la misma edad fueron sacrificados a los 46 días de edad para determinar la digestibilidad ileal aparente de la MS, la PB y el almidón (el pienso incluía 0,5% de heno de alfalfa marcado con iterbio). Asimismo, en el primer experimento se usaron otros 440 gazapos para controlar la mortalidad desde los 35 hasta los 63 días de edad. En el segundo y tercer experimento, se cebaron respectivamente 120 (806 ± 139 g) y 76 (811 ± 109 g) gazapos para la determinación de los índices productivos (destete a los 35 días y controles a los 49 y 63 días) y 320 y 212 gazapos para el control de la mortalidad (desde el destete -35 días- hasta los 63 días).

El tamaño de partícula de las dietas se determinó según describen García et al. (1999). Los análisis se realizaron según la AOAC (2000), salvo la fibra (Van Soest et al., 1991).

Los datos de crecimiento y las digestibilidades fueron analizados estadísticamente con el procedimiento GLM de SAS (1990) según un diseño completamente al azar con el grado de molienda de la cebada y el heno de alfalfa como principales efectos. Para los datos productivos, se usó la camada como bloque y el peso al destete como covariable. La mortalidad se analizó con el procedimiento GENMOD (distribución binomial).

Cebada Heno de alfalfa	Grosero (4,5 mm)		Fino (1,5 mm)	
	Grosero	Fino	Grosero	Fino
Nutrientes, g/kg MS				
Energía bruta, MJ/kg MS	17,99	17,71	17,58	17,84
PB	184	180	182	180
Almidón	152	154	152	150
FND	426	426	422	422
LAD	68,0	67,0	66,0	67,0
Tamaño de partícula, g/kg MS				
< 0,160 mm	366,1	388,3	370,5	397,8
0,160-0,315 mm	93,0	107	99,0	114
0,315-0,630 mm	159	172	167	174
0,630-1,250 mm	92,9	91,7	90,5	87,2
> 1,250 mm	289	241	273	227
> 0,315 mm	541	505	530	488

Tabla 1. Composición química de los piensos.

Resultados y discusión

En la Tabla 2, se presentan conjuntamente los datos de los experimentos 2 y 3 porque no hubo efecto significativo del experimento sobre los parámetros productivos. Durante las dos primeras semanas tras el destete (35-49 días de edad), el grado de molienda de la cebada y del heno de alfalfa no afectaron a la ganancia de peso, al consumo de pienso ni al índice de conversión, siendo las respectivas medias iguales a 44,9 g/d, 98,7 g/d y 2,28. En las dos semanas siguientes (49-63 días de edad), la inclusión en el pienso de cebada fina (molida a 1,5 mm) sólo hizo bajar el consumo (de 137 a 130 g/d; $P < 0,05$) cuando los gazapos consumieron la dieta que contenía heno de alfalfa molido a 1,5 mm, mientras que no hubo diferencias significativas (136 g/d de media) debidas al grado de molienda de la cebada cuando el heno de alfalfa incluido en el pienso había sido molido a 4,5 mm. En el conjunto del periodo de cebo, la molienda fina de la cebada sólo supuso una bajada de la velocidad de crecimiento (de 43,7 a 42,1 g/d; $P < 0,05$) cuando también el heno de alfalfa había sido molido a 1,5 mm. Algunos autores como Lambertini et al. (2000) y Díaz Arca et al. (1989) no encontraron ninguna influencia del grado de molienda del alimento o de sus principales componentes sobre los parámetros productivos. No obstante, los resultados de este trabajo concuerdan con los de Lebas y Franck (1986) y, en menor medida, con los de otros estudios (Morisse, 1982; Auvergne et al., 1987; Nico-demus et al., 2006).

Cebada	Grosero (4,5 mm)		Fino (1,5 mm)		SEM ¹ (n = 48)	P ²			
	Heno de alfalfa	Grosero	Fino	Grosero		Fino	Cebada (C)	Alfalfa (A)	C × A
Dos primeras semanas tras el destete (35 – 49 días de edad)									
GMD ³ , g		45,1	45,4	44,8	44,3	1,52	n.s.	n.s.	n.s.
CMD, g		98,8	99,8	100	96,3	2,73	n.s.	n.s.	n.s.
IC		2,28	2,24	2,34	2,25	0,060	n.s.	n.s.	n.s.
Últimas dos semanas del cebo (49 – 63 días de edad)									
GMD, g		43,1	42,7	42,8	40,2	1,40	n.s.	n.s.	n.s.
CMD, g		139 ^a	133 ^{ab}	137 ^{ab}	130 ^b	3,05	n.s.	0,025	0,067
IC		3,28	3,26	3,26	3,40	0,095	n.s.	n.s.	n.s.
Periodo total de cebo (35 – 63 días de edad)									
GMD, g		45,2 ^a	43,7 ^{ab}	43,9 ^{ab}	42,1 ^b	0,963	n.s.	0,047	0,10
CMD, g		119	115	117	114	2,67	n.s.	n.s.	n.s.
IC		2,67	2,64	2,73	2,85	0,082	n.s.	n.s.	n.s.
Mortalidad ⁴ , %		9,32	11,3	8,81	9,12	-	n.s.	n.s.	n.s.

¹Salvo para la mortalidad donde n = 273. ²n.s.: $P > 0,05$ para grado de molienda de la cebada y el heno de alfalfa. $P > 0,15$ para la interacción. ³CMD: Consumo medio diario. GMD: Ganancia media diaria. IC: Índice de conversión. ⁴El experimento tuvo un efecto significativo sobre la mortalidad ($P < 0,0001$). Medias de una misma fila con letras distintas difieren significativamente.

Tabla 2. Efecto del grado de molienda de la cebada y el heno de alfalfa sobre los rendimientos productivos.

Hubo un efecto significativo ($P < 0,0001$) del experimento sobre la tasa de mortalidad que fue, de media, 5,90, 7,00 y 16,0% para los experimentos 1, 2 y 3, respectivamente. Sin embargo, los tratamientos no tuvieron efecto sobre la mortalidad. Teniendo en cuenta que tanto el pienso como el agua estaban exentos de antibióticos, se puede considerar que la mortalidad del primer experimento (5,90%) no fue excesivamente alta, sobre todo si además lo comparamos con otros trabajos (Feugier et al., 2006; Chamorro et al., 2007) en los que el riesgo sanitario (mortalidad + morbilidad) y la mortalidad fueron respectivamente 22,5% y 25,0%.

Los coeficientes de digestibilidad ileal aparente de la MS y el almidón (Tabla 3) se incrementaron en un 19,1 ($P = 0,037$) y 5,33% ($P = 0,065$), respectivamente, en los conejos que recibían el heno de alfalfa grosero cuando la cebada se molió a 1,5 mm. Así, moler la cebada a 1,5 mm permitió reducir el flujo ileal de MS de 67,9 a 59,3 g/d ($P = 0,0073$) cuando los conejos recibían una dieta basada en heno de alfalfa grosero. Por otro lado, la interacción entre el grado de molienda de la cebada y el del heno de alfalfa sobre el flujo ileal del almidón resultó significativa ($P < 0,0001$) puesto que se obtuvo una reducción del 57,2% del flujo ileal del almidón moliendo la cebada a 1,5 mm cuando el heno de alfalfa había sido molido a 4,5 mm, mientras que esa reducción fue sólo del 15,6% cuando el heno de alfalfa había sido molido a 1,5 mm. Ni la digestibilidad ni el flujo ileal de PB estuvieron influidos por los tratamientos, siendo respectivamente 0,606 y 8,17 g/d, de media.

Cebada	Grosero (4,5 mm)		Fino (1,5 mm)		SEM ¹	P ²		
	Heno de alfalfa Grosero	Fino	Grosero	Fino		Cebada (C)	Alfalfa (A)	C × A
Coeficientes de digestibilidad ileal aparente								
MS	0,408 ^b	0,456 ^a	0,486 ^a	0,465 ^a	0,016	0,011	n.s.	0,037
PB	0,617	0,622	0,596	0,590	0,019	n.s.	n.s.	n.s.
Almidón	0,899 ^b	0,923 ^{ab}	0,947 ^a	0,937 ^a	0,009	0,0014	n.s.	0,065
Flujo ileal, g/d								
MS	67,9 ^a	60,0 ^b	59,3 ^b	62,7 ^{ab}	1,94	n.s.	n.s.	0,0073
PB	7,94	8,21	8,21	8,32	0,24	n.s.	n.s.	n.s.
Almidón	1,66 ^a	1,35 ^b	0,71 ^d	1,14 ^c	0,039	<0,0001	n.s.	<0,0001

¹Digestibilidad ileal aparente: n = 13. Consumo de alimento, flujo ileal y digestibilidad fecal aparente: n = 11. ²n.s.: P>0,05 para grado de molienda de la cebada y el heno de alfalfa. P>0,15 para la interacción. Medias de una misma fila con letras distintas difieren significativamente.

Tabla 3. Efecto del grado de molienda de la cebada y el heno de alfalfa sobre la digestibilidad ileal de los nutrientes en gazapos de 46 días de edad

No hubo efecto significativo de los tratamientos sobre el consumo individual de pienso (114 g MS/d, de media) ni sobre los coeficientes de digestibilidad fecal. Éstos fueron de media 0,596, 0,370, 0,687 y 0,609 para la MS, la FND, la PB y la energía, respectivamente, y el contenido medio de energía digestible fue de 10,8 MJ/kg MS.

Ni Lambertini et al. (2000) ni Díaz Arca et al. (1989) obtuvieron diferencias para la digestibilidad fecal de la MS, la PB o el extracto etéreo debidas a un cambio en el grado de molienda del alimento. Nicodemus et al. (2006) observaron un empeoramiento de la digestibilidad fecal de la PB cuando se redujo el tamaño de partícula de la dieta. No obstante, este efecto podría ser más bien debido a las propias características de los ingredientes usados (torta de pimentón, cascarilla de soja y pulpa de remolacha) que al tamaño de partícula. De todas formas, Lebas (2000) concluyó que era muy difícil mejorar la digestión del nitrógeno o de la fibra modificando únicamente el grado de molienda de los ingredientes.

Bibliografía

- Association of Official Analytical Chemists. 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed. AOAC, Washington, DC, USA.
- Auvergne A., Bouyssou T., Pairet M., Bouillier Oudot M., Ruckebusch Y., Candau M. 1987. Diet type, grinding size and anatomical and functional characteristics of the proximal digestive tract in rabbits. *Reproduction, Nutrition and Development*, 27:755-768.
- Blas E., Gidenne T. 1998. Digestion of starch and sugars. En: De Blas, J.C., Wiseman, J. (Eds.), *The Nutrition of the Rabbit*. Commonwealth Agricultural Bureau, Wallingford, UK, pp.: 17-38.
- Chamorro S., Gómez-Conde M.S., Pérez de Rozas A.M., Badiola I., Carabaño R., de Blas J.C. 2007. Effect on digestion and performance of dietary protein content and of increased substitution of lucerne hay with soya-bean protein concentrate in starter diets for young rabbits. *Animal*, 1:651-659.
- De Blas J.C., Mateos G.G. 1998. Feed formulation. En: De Blas, J.C., Wiseman, J. (Eds.), *The Nutrition of the Rabbit*. Commonwealth Agricultural Bureau, Wallingford, UK, pp.: 241-253.
- Díaz Arca J.F., Pérez Alba L.M., Cejas Molina M.A., Pérez Hernández M. 1989. Grado de molienda y utilización del alimento por conejos en crecimiento. I. Efecto del uso de tamices de 3 y 8 mm de diámetro. *Archivos de Zootecnia*, 38:73-78.
- Feugier A., Smit M.N., Fortun-Lamothe L., Gidenne T. 2006. Fibre and protein requirements of early weaned rabbits and the interaction with weaning age: effects on digestive health and growth performance. *Animal Science*, 82:493-500.
- García J., Carabaño R., De Blas J.C. 1999. Effect of fiber source on cell wall digestibility and rate of passage in rabbits. *Journal of Animal Science*, 77:898-905.
- Gidenne T., Carré B., Segura M., Lananouse A., Gomez J. 1991. Fibre digestion and rate of passage in the rabbit: effect of particle size and level of lucerne meal. *Animal Feed Science and Technology*, 32:215-221.
- Heidenreich E. 1992. The feed meal in the year 2002. *Advances in Feed Technology*, 8:4-16.
- Lambertini L., Cavani C., Zucchi P., Vignola G. 2000. Effect of different feed grinding fineness on the performances and digestive efficiency of growing rabbits. *Annales de Zootechnie*, 49:141-150.
- Lebas F. 2000. *Granulométrie des aliments composés et fonctionnement digestif du lapin*. INRA Productions Animales, 13:109-116.
- Lebas F., Franck T. 1986. Incidence du broyage sur la digestibilité de quatre aliments chez le lapin. *Reproduction, Nutrition and Development*, 26:335-336.

Mateos G.G., Rial E. 1989. *Tecnología de la fabricación de piensos compuestos para conejos*. En: *Alimentación del conejo*, 2nda ed. Mundi-Prensa, Madrid, pp.: 99-132.

Morisse J.P. 1982. *Taille des particules de l'aliment utilisé chez le lapin*. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 133:635-642.

Nicodemus N., García J., Carabaño R., De Blas. C. 2006. *Effect of a reduction of dietary particle size by substituting a mixture of fibrous by-products for lucerne hay on performance and digestion of growing rabbits and lactating does*. *Livestock Science*, 100:242-250.

Svihus B., Uhlen A.K., Harstad O.M. 2005. *Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review*. *Animal Feed Science and Technology*, 122:303-320.

Van Soest, J.P., Robertson J.B., Lewis B.A. 1991. *Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition*. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597.

Efecto de la inclusión de ácidos orgánicos de cadena corta sobre el crecimiento, la mortalidad y el tejido linfoide del intestino en gazapos

Effect of dietary inclusion of short-chain organic acids on rabbit growth, fattening mortality and development of gut associated lymphoid tissue

Romero C.¹, Rebollar P.G.¹, Dal Bosco A.², Castellini C.², Cardinali R.²

¹Departamento de Producción Animal, ETS Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España

²Dipartimento di Biologia Applicata, Università degli Studi di Perugia, 06121 Perugia, Italia

Dirección de contacto: carlibor20@yahoo.es

Resumen

Para realizar este trabajo se cebaron 120 gazapos, desde los 28 hasta los 56 días de edad, distribuidos en 3 grupos homogéneos que recibieron respectivamente una dieta control, esa misma dieta control con 150 ppm de bacitracina de zinc y 120 ppm de colistina y la dieta control con 0,40% de una premezcla de ácidos orgánicos de cadena corta y 120 ppm de colistina. A los 35 días, se administró a todos los gazapos un bolo de 2 ml infectado con 10⁹ UFC de *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli*. La inclusión en la dieta control de antibióticos o ácidos orgánicos no supuso una mejora de los rendimientos productivos, siendo de media el consumo de alimento de 102 g/d. La dieta control exenta de aditivos dio lugar a una tasa de mortalidad mucho más elevada que para el resto de los tratamientos (62,0 vs. 0,00%; P=0,005). Las vellosidades intestinales midieron, de media, 597 µm en los animales del grupo control mientras que crecieron 108 y 201 µm, entre los 35 y 56 días de edad, en los animales tratados con bacitracina y ácidos orgánicos, respectivamente. El área media de los folículos linfoides de la placa de Peyer no fue mayor después de la infección para los animales que recibieron ácidos orgánicos de cadena corta (59500 µm² de media) mientras que los folículos fueron más grandes en los otros grupos (un aumento del 55,7 y 57,0% en el área media de los folículos para los grupos control y bacitracina, respectivamente).

Palabras clave: gazapos, ácidos orgánicos, consumo, tejido linfoide.

Abstract

*In this work, three homogeneous groups of 40 rabbits were assigned to three different diets consisting of a basal diet, this same diet added 150 ppm of zinc bacitracin and 120 ppm of colistin and the basal diet with 0.4% of a premix of short-chain organic acids and 120 ppm of colistin. At 35 days of age, all rabbits were given a 2-ml bolus containing 10⁹ cfu of *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli*. Neither dietary inclusion of antibiotics nor that of organic acids improved fattening performances. Feed intake was 102 g/d, on average. Animals receiving the basal diet had the highest mortality rate compared to the rest of treatments (62.0 vs. 0.00%; P=0.005). Villi measured, on average, 597 µm for rabbits fed the basal diet but grew 108 and 201 µm, respectively, for rabbits receiving bacitracin and organic acids from 35 to 56 days. Mean area of lymphoid follicles of Peyer's patch was not greater after the infection for rabbits fed the diet containing organic acids (59500 µm² on average) whereas follicles became larger in the other groups (follicle area increased, respectively, 55.7 and 57.0% for rabbits receiving the basal and the bacitracin diets).*

Key words: young rabbits, organic acids, feed intake, lymphoid tissue.

Introducción

Hasta ahora la forma más habitual de prevenir las enfermedades digestivas en conejos de engorde ha sido recurrir a los antibióticos. No obstante, el uso reiterado de antibióticos supone un incremento de un 25% de los costes de alimentación (Carabaño et al., 2005) y, experimentalmente, se ha comprobado que algunos productos tienen efectos secundarios perjudiciales como una menor ganancia de peso y desequilibrios en la microflora intestinal (Lafargue-Hauret et al., 1994; Licois, 1996). Por tanto, el precio de los antibióticos, la escasa diversidad de moléculas permitidas en cunicultura y las limitaciones legales

de su uso animan a investigar en otros campos para hallar soluciones alternativas al empleo de los mismos. Entre los aditivos con potencial aplicación práctica, destacan los ácidos orgánicos de cadena corta. Partanen y Mroz (1999) encontraron que los ácidos fórmico y fumárico tenían un efecto beneficioso sobre el crecimiento y el índice de conversión en lechones destetados y cerdos de engorde. Dibner y Buttin (2002) también estudiaron el efecto de los ácidos fórmico, propiónico y láctico sobre los parámetros productivos en avicultura. Por último, Cherrington et al. (1990) observaron un efecto bactericida de los ácidos fórmico y propiónico sobre *Escherichia coli*. Antes de 1997, *E. coli* destacaba como bacteria patógena implicada en más del 70% de las diarreas (Peeters et al., 1984) mientras que, en fechas recientes, se ha vinculado la proliferación de *Clostridium perfringens* con los síntomas de la enteropatía epizoótica (Dewrée et al., 2007).

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de una inclusión de ácidos orgánicos en el pienso sobre los parámetros productivos, la mortalidad y la morfología intestinal de gazapos en crecimiento infectados con *E. coli* y *C. perfringens*.

Material y métodos

Para llevar a cabo este trabajo, se usaron 120 gazapos alojados en la sección de Ciencias Zootécnicas de la Universidad de Perugia que fueron transferidos al destete (28 días de edad) a las instalaciones experimentales del Instituto Zootécnico de Umbria y Marche. Los gazapos fueron divididos en tres grupos homogéneos en peso (40 gazapos por grupo). Un grupo recibió una dieta control, formulada para cubrir las necesidades de los gazapos, que sirvió como control negativo. Otro grupo recibió esa misma dieta control a la cual se añadieron 150 ppm de bacitracina de zinc y 120 ppm de colistina. Por último, se estableció un tercer grupo que recibió la dieta control con 0,40% de una premezcla de ácidos orgánicos de cadena corta y 120 ppm de colistina. Al destete, se pesaron todos los gazapos así como el pienso distribuido en cada jaula. Tras una semana de adaptación a las dietas, se sacrificaron 3 animales por grupo para determinar algunos parámetros cecales (pH, materia seca y peso, longitud y diámetro del apéndice vermiforme) y algunas medidas histológicas (longitud de vellosidades intestinales, área y número de foliculos linfoides). El procesado de las muestras y la observación de los cortes histológicos se hicieron de acuerdo con la metodología descrita por Castellini et al. (2007). Así, para cada uno de los gazapos sacrificados, se tomaron muestras de yeyuno, placa de Peyer en el tramo final del ileon y apéndice vermiforme. Ese mismo día (35 días de edad), se administró a todos los gazapos restantes un bolo de 2 ml infectado con 10^9 UFC de *Clostridium perfringens* toxinotipo A y 10^9 UFC de *Escherichia coli* O-103. La concentración del bolo se determinó mediante densidad óptica en la escala Mac Farland. A los 56 días de edad, se pesaron todos los gazapos y el pienso restante para conocer algunos parámetros productivos (ganancia de peso, consumo de alimento e índice de conversión). A continuación, se sacrificaron 9 animales por grupo para determinar los mismos parámetros cecales e histológicos (para histología sólo se usaron 3 animales por grupo). A lo largo de todo el cebo (28-56 días) se hizo un seguimiento diario de la mortalidad.

El efecto del tratamiento sobre los rendimientos productivos y los parámetros cecales se analizó según un modelo completamente al azar con el procedimiento GLM de SAS (1991). El análisis estadístico de la mortalidad se realizó con el procedimiento CATMOD mientras que las medidas histológicas se compararon con un análisis estadístico de medidas repetidas (MIXED).

Resultados y discusión

La inclusión en la dieta control de antibióticos o ácidos orgánicos no supuso una mejora de los rendimientos productivos (Tabla 1). A los 56 días de edad el peso medio de los conejos de todos los grupos fue de 1216 g y en el periodo 28-56 d, el índice medio de conversión fue de 3,34. La suplementación con ácidos orgánicos de cadena corta no empeoró significativamente la ingesta de alimento (102 g/d, de media). Con la dieta control exenta de aditivos se observó una tasa de mortalidad mucho más elevada que en el resto de los tratamientos (62,0 vs. 0,00%; $P=0,005$). La infección con un bolo enriquecido en bacterias patógenas no supuso un empeoramiento de los resultados productivos ni una baja en el consumo. No obstante, la alta incidencia de trastornos entéricos en los gazapos del grupo control podría deberse a la inoculación de las bacterias que, sin embargo, no afectó negativamente a los gazapos que consumieron piensos suplementados con antibióticos y/o ácidos orgánicos de cadena corta. Los datos productivos están por debajo de los rendimientos alcanzables por la genética animal usada. En otro trabajo (Romero et al., 2010), en el que también hubo una alta incidencia de problemas digestivos, hubo un elevado porcentaje de animales mórbidos que, si bien no mueren, no alcanzan los óptimos productivos y empeoran los resultados medios.

La Tabla 2 muestra el efecto de los tratamientos sobre los parámetros cecales antes de la infección experimental. A esa edad, el único parámetro afectado significativamente por el tratamiento fue el peso del apéndice vermiforme que fue mayor

	n	Control	Bacitracina	Ácidos	SEM	P _{trat}
Peso 28 d, g	40	606	605	606	13,9	n.s.
Peso 56 d, g	29	1210	1217	1220	19,8	n.s.
CMD ¹ , g	29	104	103	99,2	2,53	n.s.
IC	29	3,44	3,36	3,23	0,29	n.s.
Mortalidad, %	40	62,0 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	3,5	0,005

¹CMD: Consumo medio diario. IC: Índice de conversión. Medias de una misma fila con letras distintas difieren significativamente.

Tabla 1. Efecto de la adición de bacitracina o ácidos orgánicos a una dieta control sobre los parámetros productivos.

	n	Control	Bacitracina	Ácidos	SEM	P _{trat}
pH	3	6,45	6,48	6,56	0,06	n.s.
Materia seca, %	3	22,8	22,4	22,7	0,58	n.s.
Apéndice vermiforme						
Peso, g	3	1,22 ^b	1,69 ^a	1,75 ^a	0,39	0,012
Longitud, cm	3	7,50	7,50	7,80	0,31	n.s.
Diámetro, cm	3	0,70	1,00	0,90	0,12	n.s.

Medias de una misma fila con letras distintas difieren significativamente.

Tabla 2. Efecto de la adición de bacitracina o ácidos orgánicos a una dieta control sobre los parámetros cecales a los 35 días de edad.

	n	Control	Bacitracina	Ácidos	SEM	P _{trat}
pH	9	6,21	6,21	6,19	0,05	n.s.
Materia seca, %	9	18,1 ^b	20,8 ^a	21,7 ^a	0,57	0,030
Apéndice vermiforme						
Peso, g	9	4,01	4,29	4,05	0,41	n.s.
Longitud, cm	9	10,3	10,8	10,7	0,47	n.s.
Diámetro, cm	9	1,30	1,37	1,27	0,13	n.s.

Medias de una misma fila con letras distintas difieren significativamente.

Tabla 3. Efecto de la adición de bacitracina o ácidos orgánicos a una dieta control sobre los parámetros cecales a los 56 días de edad.

en el caso de los gazapos que consumieron dietas con antibióticos y ácidos orgánicos en comparación con los animales que consumieron la dieta control (1,72 vs. 1,22 g; $P=0,001$). Tras la infección (Tabla 3), sólo el porcentaje de materia seca medido a los 56 días de edad estuvo influenciado significativamente por los tratamientos, siendo el valor más bajo el de los gazapos de la dieta control (18,1 vs. 21,3%; $P=0,01$). Un contenido cecal más líquido suele ser un síntoma frecuente de la enteropatía epizootica y otros procesos entéricos que cursan con diarrea (Licois et al., 2006). Por tanto, podría existir una relación entre el contenido cecal más líquido de los gazapos que consumieron la dieta control y su alto porcentaje de mortalidad.

La Tabla 4 presenta el efecto de los tratamientos y la edad sobre las distintas medidas histológicas consideradas en este trabajo. Hubo una interacción significativa ($P<0,0001$) entre el tratamiento y la edad sobre la longitud de las vellosidades del yeyuno. Así, la longitud media de las vellosidades fue de 597 μm en los animales del grupo control mientras que crecieron, de media, 108 y 201 μm ($P<0,0001$) en los animales tratados con bacitracina de zinc y ácidos orgánicos, respectivamente, entre los 35 y los 56 días de edad. La longitud de las vellosidades de los animales tratados con bacitracina o ácidos fue mayor que la de los gazapos que recibieron la dieta control (597^c vs. 629^b vs. 690^a μm ; $P=0,0002$). Esas diferencias podrían deberse al esta-

Tratamiento	Control		Bacitracina		Ácidos		SEM	P _{trat}	P _{edad}	Int.
Edad, d	35	56	35	56	35	56	n=3			
Longitud villi, μm	599 ^c	595 ^c	575 ^c	683 ^b	589 ^c	790 ^a	85,1	0,0002	<0,0001	<0,0001
Placa de Peyer										
Área media del folículo, $\times 10^3 \mu\text{m}^2$	61,8 ^b	96,2 ^a	54,2 ^b	85,1 ^a	54,4 ^b	64,6 ^b	9,03	0,011	<0,0001	0,10
Área de la placa, $\times 10^3 \mu\text{m}^2$	790	1464	544	2166	650	1852	373	n.s.	0,050	n.s.
Apéndice vermiforme										
Área media del folículo, $\times 10^3 \mu\text{m}^2$	50,4	111	57,8	125	62,7	112	10,6	n.s.	<0,0001	n.s.
Número de folículos	35,0	40,5	36,0	36,3	41,0	34,7	1,78	n.s.	n.s.	n.s.

Medias de una misma fila con letras distintas difieren significativamente.

Tabla 4. Efecto de la adición de bacitracina o ácidos orgánicos a una dieta control sobre las medidas histológicas.

do sanitario intestinal de los animales puesto que los valores obtenidos en los animales tratados corresponden con los de animales completamente sanos (Chamorro et al., 2007). El área media de los folículos linfoides de la placa de Peyer no fue mayor después de la infección en los animales que recibieron ácidos orgánicos de cadena corta en la dieta (59500 μm^2 de media) mientras que los folículos fueron más grandes en los otros grupos (un aumento del 55,7 y 57,0%, $P < 0,0001$, en el área media de los folículos para los grupos control y bacitracina, respectivamente). Castellini et al. (2007) sugieren que un mayor desarrollo de los folículos linfoides puede estar asociado a una mayor respuesta antigénica en el intestino. En este trabajo podría tratarse de una respuesta inmunitaria frente a las bacterias patógenas inoculadas puesto que no hay diferencias significativas, entre tratamientos, en el área media de los folículos antes de la infección (a los 35 días de edad), siendo la media de 56800 μm^2 . El área global de la placa no estuvo influenciada significativamente por los tratamientos pero sí aumentó con la edad (661 vs. 1827 x 103 μm^2 ; $P = 0,050$). Del mismo modo, el área media de los folículos linfoides del apéndice vermiforme sólo estuvo afectada por la edad (57,0 vs. 116 x 10³ μm^2 ; $P < 0,0001$) ya que el efecto del tratamiento no llegó a ser significativo. Por último, el número medio de folículos linfoides en los cortes del apéndice vermiforme fue de 37,2 sin que hubiese efecto significativo de ninguna de las variables estudiadas. En conjunto, se puede considerar que las medidas realizadas en este trabajo concuerdan con las de Castellini et al. (2007) si bien hay pequeñas diferencias atribuibles a la diferencia de edad de los animales. Los resultados de este trabajo permiten concluir que una adición del 0,4% de ácidos orgánicos de cadena corta en la dieta tiene efectos similares a 150 ppm de bacitracina de zinc a nivel histológico y porcentaje de mortalidad sin que por ello empeoren los rendimientos productivos.

Bibliografía

- Carabaño R., Rebollar P.G., Gómez-Conde M.S., Chamorro S., García J., de Blas C. 2005. Nuevas tendencias en la alimentación de conejos: influencia de la nutrición sobre la salud intestinal. XXI Curso de Especialización FEDNA, pp.: 113-129.
- Castellini C., Cardinali R., Rebollar P.G., Dal Bosco A., Jimeno V., Cossu M.E. 2007. Feeding fresh chicory (*Chicoria intybus*) to young rabbits: Performance, development of gastro-intestinal tract and immune functions of appendix and Peyer's Patch. *Animal Feed Science and Technology*, 134:56-65.
- Chamorro S., Gómez-Conde M.S., Pérez de Rozas A.M., Badiola I., Carabaño R., de Blas J.C. 2007. Effect on digestion and performance of dietary protein content and of increased substitution of lucerne hay with soya-bean protein concentrate in starter diets for young rabbits. *Animal*, 1:651-659.
- Cherrington C.A., Hinton M., Chopra I. 1990. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 68:69-74.
- Dibner J.J., Buttin P. 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism.

Journal of Applied Poultry Research, 11: 453-463.

Dewrée R., Meulemans L., Lassence C., Desmecht D., Ducatelle R., Mast J., Licois D., Vindegovel H., Marlier D. 2007. Experimentally induced epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Science*, 15:91-102.

Lafargue-Hauret P., Javrin D., Ricca V., Rouillere H. 1994. Toxicité de l'amoxicilline chez le lapin. 6èmes Journées de la Recherche Cunicole, pp.: 81-84.

Licois D. 1996. Risques associés à l'utilisation des antibiotiques chez le lapin: une mini revue. *World Rabbit Science*, 4:63-68.

Licois D., Coudert P., Marlier D. 2006. Epizootic rabbit enteropathy. En: Maertens L. y Coudert P. (Eds.), *Recent Advances in Rabbit Sciences*, pp.: 163-170.

Partanen K.H., Mroz Z. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews*, 12:117-145.

Peeters J.E., Pohl P., Charlier G. 1984. Infectious agents associated with diarrhoea in commercial rabbits: a field study. *Annales Recherches Vétérinaires*, 15:335-340.

Romero C., Cuesta S., Astillero J.R., Nicodemus N., de Blas C. 2010. Efecto de la restricción alimenticia sobre los parámetros productivos y la viabilidad de gazapos en dos cebos consecutivos. XXXV Symposium de Cunicultura, Segovia.

Influencia de un suplemento alimenticio líquido a base de minerales, vitaminas y aminoácidos sobre la mortalidad y el crecimiento de los conejos al engorde

Influence of a liquid alimentary supplement containing minerals, vitamins and amino acids on the mortality and the growth of growing fattening rabbits

Colin M.¹, Camino Callarías A.², Teillet B.¹, Varella E.^{2*}, Prigent A.Y.³

¹ Copri, Coat Izella, 29830 Ploudalmézeau, Francia

² Tecnovit, Pol. Ind. Les Sorts, 43365 Alforja (Tarragona), España

³ EARL 3L, Coat Izella, 29830 Ploudalmézeau, Francia

*Dirección de contacto: formula@tecnovit.net

Resumen

Existen pocos trabajos relacionados con la aportación de nutrientes en el agua de bebida en los conejos. Hemos estudiado los efectos de la distribución en el agua de bebida de un suplemento líquido comercial, el Nutrireidrovit, asociando electrolitos, vitaminas y aminoácidos sobre la mortalidad y el crecimiento de los conejos. En general, un aporte de Nutrireidrovit en el agua de bebida presenta efectos positivos disminuyendo la mortalidad y aumentando el crecimiento a principios del engorde. Sin embargo, la disminución de la mortalidad se observa principalmente cuando esta es superior al 5 % y la mejora del crecimiento se produce únicamente en el comienzo del engorde. Se aconseja la utilización sistemática de este producto en granjas cuya mortalidad es superior al 5% o también después del destete, con la finalidad de estimular el crecimiento.

Palabras clave: Agua, electrolitos, aminoácidos, vitaminas, engorde, mortalidad.

Abstract

Few experimentations have deal with the distribution of nutriments through drinking water for rabbits. Particularly, few researches have studied the effects of such a way of electrolyte distribution. For these reasons, the consequences of the distribution of a liquid alimentary supplement containing minerals, vitamins and amino acids, the Nutrireidrovit on the mortality and the growth of growing fattening rabbits have been studied. Globally, the Nutrireidrovit distribution has positive effects by decreasing the mortality in growing - fattening and by increasing the growth during the first part of fattening. Nevertheless, the mortality decrease is mainly observed when the mortality is up than 5 % and the growth is improved only during the first part of growing - fattening. Consequently, the use of the product is advised in farms with mortality higher than 5 % or after weaning to boost the growth.

Key words: Water, electrolytes, amino acids, vitamins, fattening, mortality.

Introducción

Existen numerosas publicaciones relacionadas con el contenido de nutrientes de los piensos para conejos (Cheeke, 1987; De Blas, 1989; Lebas, 1989), sin embargo, hay pocos trabajos relacionados con la aportación de estos nutrientes en el agua de bebida. Autores como Colin et al. (1975) y Colin (1977) señalan los efectos positivos de las aportaciones de lisina y metionina en el agua de bebida y Selim et al. (2008) realizan las mismas observaciones para la vitamina C. Por otro lado, Licois y Mongin (1980) pusieron en evidencia la estrecha relación existente entre ciertas patologías y los déficits de absorción de electrolitos en el ternero (Vallet et al., 1985) o en el cerdo (Patience et al., 1987); en el caso de los conejos la utilización de rehidratantes a base de electrolitos ha sido objeto de pocos estudios sistemáticos. Por estas razones, hemos estudiado los efectos de la distribución en el agua de bebida del producto Nutrireidrovit, como suplemento líquido comercial que asocia electrolitos, vitaminas y aminoácidos, sobre la mortalidad y crecimiento de los conejos al engorde.

Material y métodos

Generalidades

Las 5 pruebas realizadas en 3 sitios diferentes totalizan 2.390 conejos Hyplus (Tabla 1). En cada prueba, los conejos han sido repartidos en dos grupos: el grupo Testigo y el grupo Nutrireidrovit en el cual los conejos reciben 1,3 g/L de Nutrireidrovit en el agua de bebida.

Essai	Granjas	Fecha del destete	Genética	Edad a la primera pesada	Edad a la última pesada	TESTIGO	NUTRIREIDROVIT	TOTAL
n°1	EARL 3L	11/12/2006	Hyplus PS39	35	69	482	484	966
n°2	Elevage commercial n°1 (France)	18/04/2008	Hyplus PS119	34	68	188	188	376
n°3	Elevage commercial n°1 (France)	11/07/2008	Hyplus PS119	34	69	168	168	336
n°4	Elevage commercial n°2 (France)	26/04/2008	Hyplus PS39	36	71	210	210	420
n°5	EARL 3L	11/01/2010	Hyplus PS40	36	69	145	147	292
TOTAL				35	69	1 193	1 197	2 390

Tabla 1. Descripción de las pruebas.

Nutrientes	Unidad	Cantidad / litro
Minerales		
Sodio	g/l	6,2
Potasio	g/l	1,8
Magnesio	g/l	0,11
Calcio	g/l	0,54
Vitaminas		
Vitamina B ₁₂	mg/l	100
Vitamina C	mg/l	2 000
Aminoácidos		
L-lisina	mg/l	3 000
DL-metionina	mg/l	600
L-treonina	mg/l	1 000
L-triptófano	mg/l	40

Tabla 2. Contenido en nutrientes de Nutrireidrovit

Nutrireidrovit

Nutrireidrovit es un suplemento alimenticio líquido que se distribuye en el agua de bebida a una dosis de 1,3 g/L. Contiene minerales, vitaminas y aminoácidos cuyas concentraciones se indican en la tabla 2. En las 5 pruebas, NUTRIREIDROVIT se añade en el agua de bebida durante todo el periodo del engorde a razón de 1,3 g/litro.

Desarrollo de las pruebas: generalidades

En las cinco pruebas, los conejos se reparten en 2 grupos según su peso al destete. Reciben alimento sin medicar.

Desarrollo de las pruebas: pruebas 1 y 5

Las pruebas 1 y 5 son realizadas a EARL 3L. Los conejos son alojados en grupos de 5 animales por jaula, en una nave ventilada por extracción. Los 966 conejos de la prueba 1 realizada en 2006 son alimentados según el programa ya presentado (Colin et al., 2008) y los 292 de la prueba 5 según el plan indicado en la Figura 1.

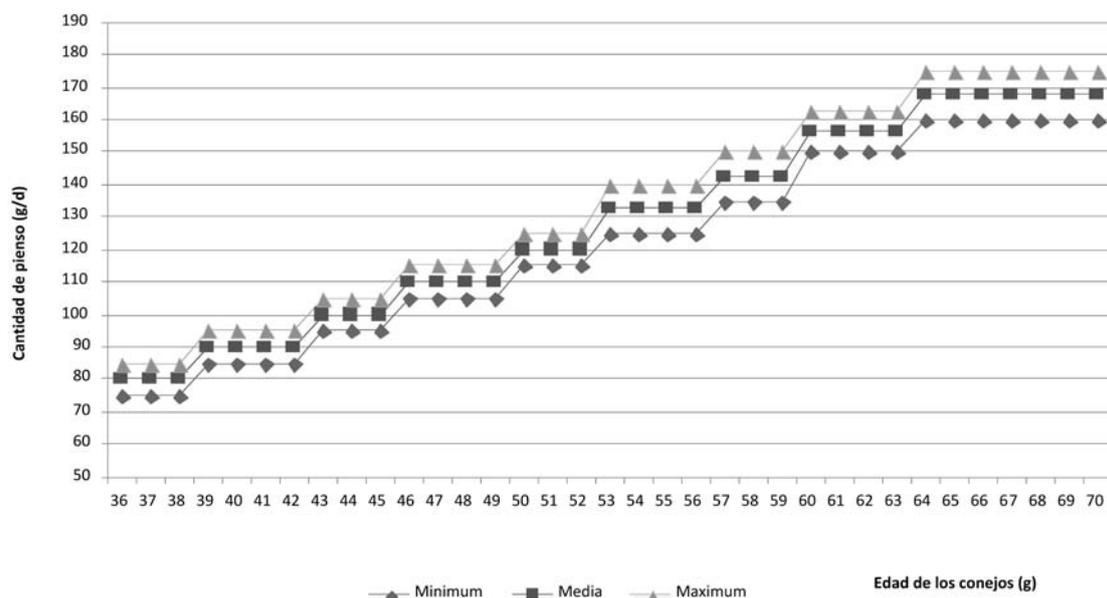


Figura 1. Programa de racionamiento practicado en la prueba 5 (Programa destinado a Hyplus PS40).

Desarrollo de las pruebas: pruebas 2 y 3

Las pruebas 2 y 3 realizadas en 2008 en granjas comerciales implicaron 376 y 336 conejos, alojados en jaulas de 4 animales, en un edificio abierto no ventilado. El pienso se racionó a razón de 75 gramos/conejo el día del destete, aumentando luego la cantidad de 2 g/por día.

Desarrollo de las pruebas: prueba 4

La prueba 4 realizada también en 2008 en otra granja comercial implicó 420 conejos, alojados en jaulas de 2 animales, una parte en un edificio abierto no ventilado y la otra parte en un edificio cerrado y ventilado. El pienso se racionó como en las pruebas 2 y 3.

Criterios medidos

Los conejos se pesaron al principio, a la mitad y al final de la prueba y las mortalidades se anotaron diariamente.

Métodos estadísticos

Las mortalidades, los pesos y los crecimientos son tratados por análisis de variancia (Colin et al., 2007). Las relaciones entre desviaciones de mortalidad o de crecimiento observadas por una parte y las mortalidades promedias del grupo por otra parte, son estudiadas por regresión lineal (Dagnelie, 1969).

Resultados

Análisis de la mortalidad

Globalmente, el descenso de la mortalidad en las 5 pruebas se observa de forma significativa a favor del grupo Nutrireidrovit (-3,1 puntos - P = el 0,8 %). Esta disminución de mortalidad se detecta tanto al principio como al final del engorde (Tabla 3). Los resultados en cada prueba son más concretos. En efecto, los efectos de Nutrireidrovit sobre la mortalidad dependen del nivel de ésta en el grupo testigo (Tabla 4). Así, observamos:

- Una reducción fuerte de la mortalidad (7,9 %) en la prueba 1 donde la mortalidad del grupo testigo es del 19,5 %.
- Una reducción de mortalidad menor (2,2 % - P=0,287) considerando las pruebas 3 y 5, para las cuales la mortalidad del grupo testigo es del 8,9 %.
- Un ligero aumento de la mortalidad (2,0 % - P=0,147) considerando las pruebas 2 y 4, para las cuales la mortalidad del grupo testigo es del 3,0 %.

Existe, por otra parte, una correlación estadísticamente significativa entre el nivel de mortalidad en el grupo testigo y la desviación de mortalidad que resulta de la utilización de Nutrireidrovit (Figura 2).

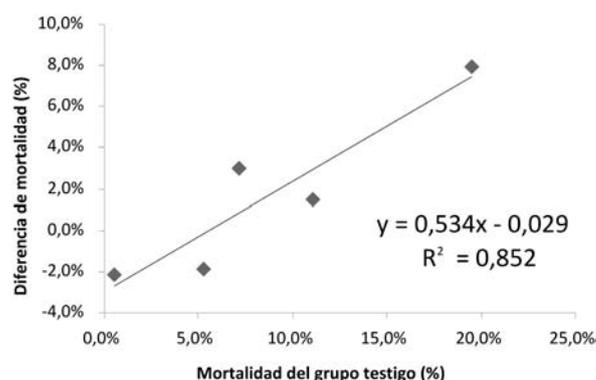


Figura 2. Relación entre la mortalidad del grupo testigo y la disminución de mortalidad en respuesta a una distribución de Nutrireidrovit.

TRATAMIENTOS		CONTROL	NUTRIREIDROVIT	TOTAL	F / ÷	P
Numero de conejos al destete		1 193	1 197	2 390		
Numero de conejos muertos	Destete - 55 días	59	38	97	4,62	3,2%
	55 días - ventas	75	59	134	1,96	16,1%
	Total	134	97	231	6,05	1,4%
Mortalidad	Destete - 55 días	4,9%	3,2%	4,1%	4,87	2,7%
	55 días - ventas	6,3%	4,9%	5,6%	2,15	14,2%
	Total	11,2%	8,1%	9,7%	6,95	0,8%

Tabla 3. Resultados de la mortalidad por períodos de las 5 pruebas.

TRATAMIENTOS	CONTROL	NUTRIREIDROVIT	TOTAL	F	P
Numero de conejos al destete	1 193	1 197	2 390		
Prueba 1	19,5%	11,6%	15,5%	11,70	0,1%
Prueba 2	0,5%	2,7%	1,6%	2,72	10,0%
Prueba 3	7,1%	4,2%	5,7%	1,39	23,9%
Prueba 4	5,2%	7,1%	6,2%	0,65	41,9%
Prueba 5	11,0%	9,5%	10,3%	0,18	67,2%
TOTAL	11,2%	8,1%	9,7%	6,95	0,8%

Tabla 4. Resultados de la mortalidad total por pruebas.

Análisis del crecimiento

Los pesos a 55 días de edad y el crecimiento a principios del engorde son globalmente favorables al grupo Nutrireidrovit (Peso a 55 días: 30 gramos - P = el 4,2 %; Crecimiento a principios del engorde: 1,7 g/d - P = el 0,6 %) (Tabla 5). Nutrireidrovit mejora el crecimiento a principios del engorde en dos de tres experimentos, el tercero no muestra ninguna diferencia (Tabla 6). Por el contrario, Nutrireidrovit disminuye el crecimiento al final del engorde (1,8 g/d - P = el 3,7 %) en los tres experimentos; esta disminución es significativa solamente en uno de los grupos (Tabla 7).

TRATAMIENTOS		CONTROL	NUTRIREIDROVIT	TOTAL	F / ÷	P
Numero de conejos al destete		1 193	1 197	2 390		
Peso (g)	Destete	898	899	899	0,00	94,6%
	55 días	1 650	1 680	1 665	4,16	4,2%
	Final	2 288	2 292	2 290	0,11	74,3%
Aumento de peso (g / día)	Destete - 55 días	38,9	40,6	39,8	7,65	0,6%
	55 días - ventas	41,4	39,6	40,5	4,35	3,7%
	Total	40,2	40,3	40,3	0,08	78,1%

Tabla 5. Resultados ponderales de las 5 pruebas.

TRATAMIENTOS	CONTROL	NUTRIREIDROVIT	TOTAL	F	P
EARL 3L	34,6	37,0	35,8	4,58	3,3%
Granja comercial 1	42,4	42,5	42,5	0,02	90,2%
Granja comercial 2	41,1	43,4	42,2	7,86	0,6%
TOTAL	38,9	40,6	39,8	7,65	0,6%

Tabla 6. Crecimientos diarios a principios del engorde en los 3 sitios.

TRATAMIENTOS	CONTROL	NUTRIREIDROVIT	TOTAL	F	P
EARL 3L	42,0	41,4	41,7	0,21	65,0%
Granja comercial 1	40,3	39,7	40,0	0,12	72,5%
Granja comercial 2	41,6	37,3	39,4	7,86	0,6%
TOTAL	41,4	39,6	40,5	4,35	3,7%

Tabla 7. Crecimientos al final del engorde en los 3 sitios.

Al final, las desviaciones observadas en peso a la venta son débiles y no significativas. Por otra parte, existe una relación entre la mortalidad del grupo testigo y el desvío de crecimiento como resultado de la utilización de Nutrireidrovit, pero esta relación es más débil que para la mortalidad (Figura 3).

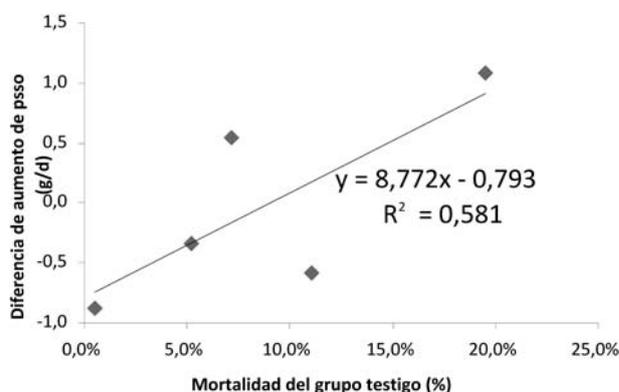


Figura 3. Relación entre mortalidad y mejora de crecimiento en respuesta a una distribución de Nutrireidrovit.

Conclusiones

Generalmente, la distribución sistemática de Nutrireidrovit en el agua de bebida disminuye la mortalidad y aumenta el crecimiento a principios del engorde. Sin embargo existen grandes diferencias entre los resultados obtenidos de las distintas pruebas: la distribución de Nutrireidrovit es claramente positiva en términos de mortalidad cuando ésta es superior al 5 % pero no tiene ningún efecto o incluso tiene efectos ligeramente negativos cuando esta mortalidad es inferior al 5 %, este fenómeno está probablemente relacionado con las modificaciones inducidas a nivel del metabolismo de los electrolitos (Licois y Mongin, 1980). De igual manera, el crecimiento mejora significativamente sólo a principios del engorde, probablemente como consecuencia de una aportación suplementaria de aminoácidos por parte de este producto (Colin et al., 1975; Colin, 1977). La utilización sistemática de un producto tipo Nutrireidrovit debe ser aconsejada para granjas que poseen mortalidades superiores al 5%, o para otras granjas al principio del engorde con el fin de estimular el crecimiento después del destete.

Bibliografía

- Colin M. 1977. Effect of adding methionine to drinking water on growth of rabbits. *Nutr. Rep. Int.*, 17:397-402.
- Colin M., Atkari T., Prigen A.Y. 2008. Efectos de la incorporación de una mezcla de extractos vegetales en los piensos por engorde: resultados en granja experimental y en granjas comerciales. XXXIII Symposium de Cunicultura, Calahorra (España), 30 y 31 de Octubre 2008, pp.: 111-116.
- Colin M., Binet E., Prigent A.Y. 2007. Influence de l'incorporation d'un concentré de fibres brutes riche en lignine sur la mortalité, la croissance et le rendement à l'abattage des lapins. 12ème Journ. Rech. cunicole, Le Mans (France), 27-28 Novembre 2007, pp.: 62-64.
- Colin M., Lebas F., Delaveau A. 1975. Influence d'un apport de lysine dans l'alimentation solide ou dans l'eau de boisson sur les performances de croissance du Lapin. *Ann. Zootech.*, 24:315-321.
- Cheeke P.R. 1987. Rabbits feeding and nutrition. Academic Press Inc., Orlando, Florida. 328887, 376 páginas.
- Dagnelie P. 1970. Théorie et méthode statistiques, Volume 2, Ed Duculot S.A, Gembloux, 451 pp.
- De Blas C. 1989. Alimentación del conejo. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (España), 174 páginas.
- Lebas F. 1989. Alimentation des lapins. In: L'alimentation des animaux monogastriques, pp. 77-84. Institut National de la Recherche Agronomique. 75341. Paris (Francia).
- Licois D., Mongin P. 1980. Hypothèse sur la pathogénie de la diarrhée chez le Lapin à partir de l'étude des contenus intestinaux. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 20:1209-1216.
- Patience J.F., Austic R.E., Boyd R.D. 1987. Effect of dietary electrolyte balance on growth and acid-base status in swine. *J. Anim. Sci.*, 64:457-466.
- Selim N.A., Abdal-Khalek A.M., Nada S.A., El-Medany S.A. 2008. Response of growing rabbits to dietary antioxidant vitamins E and C. 1 Effect on performances. *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona (Italy)*, p. 231.
- Vallet A., Grenet N, Gauthier D. 1985. Influence of rearing conditions on the frequency of diarrhea in newborn calves and the efficiency of oral treatment. *Ann. Rech. Vet.*, 16:297-303.

MORFOFISIOLOGÍA Y COMPOSICIÓN CORPORAL

Evolución con la edad de los mecanismos de barrera intestinal.

1. Tracto digestivo y microbiota cecal

Evolution with age of gut barrier mechanisms. 1. Digestive tract and caecal microbiota

Delgado R.¹, Menoyo D.¹, Badiola I.², Pérez de Rozas A.², Carabaño R.¹, García J.^{1*}

¹Departamento de Producción Animal. ETSIA. Universidad Politécnica de Madrid.

²CRESA-UAB

*Dirección de contacto: javier.garcia@upm.es

Resumen

Se destetaron 106 gazapos de 20 camadas a los 26 d de edad con un peso de 429 ± 57 g y se sacrificó 1 animal por camada a los 26, 31, 38, 45 y 52 d de edad. El peso relativo del aparato digestivo y del ciego con respecto al peso vivo aumentaron ($P < 0,001$) desde los 26 hasta los 38 d. Hubo un mayor incremento del ciego en relación al total del aparato digestivo entre los 26 y los 31 d (5,2 a 7,1% vs. 20,8 a 23,3%, respectivamente) y desde los 31 hasta los 38 d el crecimiento del ciego fue paralelo al del tracto digestivo, alcanzándose su mayor peso relativo a los 38 d (8,5 y 28,1%, respectivamente). Desde esta edad hasta los 45 d ambos pesos descendieron (7,6 y 24,9%, respectivamente) y se estabilizaron entre los 45 y los 52 d (7,6 y 24,3%, respectivamente a los 52 d). El grado de similitud de la microbiota cecal entre animales de la misma edad (que varió entre un 89,1 y un 95,3%) fue superior al grado de similitud entre animales de diferentes edades (que varió entre un 82,3% y un 92,5%). La variabilidad en la composición de la microbiota fue menor a los 45 y 52 d de edad (mostrando un grado de similitud del 92,5% entre ambas edades) en comparación con la observada entre las primeras edades (26, 31 y 38 d, que varió entre 82,3 y 86,7%). Los menores grados de similitud se observaron entre los animales lactantes y los animales de 31 y 38 d de edad.

Palabras clave: edad, ciego, microbiota, conejo.

Abstract

One hundred and six rabbits from 20 litters were weaned at 26 d of age weighing 429 ± 57 g. One rabbit per litter were slaughtered at 26, 31, 38, 45 and 52 d of age. The weight of the digestive tract and caecum (% body weight) increased from 26 to 38 d ($P < 0.001$). Development of caecum was higher from 26 to 31 d of age compared to total digestive tract (5.2 to 7.1% vs. 20.8 to 23.3%, respectively), whereas the evolution from 31 to 38 d was similar, showing maximum values at 38 d (8.5 and 28.1%, respectively). From 38 to 52 d of age weight of total digestive tract and caecum decreased and remained stable from 45 d onwards (7.6 and 24.3%, respectively at 52 d). The similarity rate (SR) of caecal microbiota was higher among animals of the same age (varied between 89.1 and 95.3%) than among animals differing in age (varied between 82.3 and 92.5%). The variability in caecal microbiota composition was lower at 45 and 52 d of age (showing a SR of 92.5% between them) compared to younger animals (26, 31 and 38 d, showing a SR between 82.3 and 86.7 among them). The greater differences in SR were detected between suckling rabbits and rabbits just after weaning (31 and 38 d of age).

Key words: age, caecum, microbiota, rabbit.

Introducción

El destete es un periodo de estrés para el gazapo, lo que unido a un desarrollo incompleto de su capacidad digestiva y a la inmadurez de su respuesta inmune frente a los patógenos, dan lugar a una mayor susceptibilidad para contraer enfermedades digestivas que se convierten en la principal causa de mortalidad y morbilidad de los gazapos alrededor del destete (De Blas et al., 1999; Gallois et al., 2005). Esto se refleja en una menor ganancia de peso post-destete en comparación con los conejos lactantes de su misma edad, siendo esta tendencia más acusada cuanto más temprano se realice el destete, aunque estas diferencias son compensadas durante el periodo total del cebo (Méndez et al., 1986). Sin embargo, el destete también da lugar a una maduración más rápida del ciego y el colon, se produce la colonización microbiana tanto en cantidad como en tipo de bacterias y da comienzo la actividad fermentativa. La colonización del tracto digestivo por la microbiota es esencial para mantener la salud intestinal, porque junto al sistema inmune ayuda a prevenir la proliferación de las bacterias patógenas (Carabaño et al., 2006). Por tanto, es de gran importancia caracterizar adecuadamente los cambios que se producen en el animal

alrededor del destete para desarrollar estrategias que mejoren su salud y estimulen su crecimiento. El objetivo de este trabajo fue estudiar la evolución del desarrollo del ciego y de la microbiota cecal con la edad.

Materiales y métodos

Gazapos de 20 camadas se destetaron con 26 d de edad con un peso medio de $429 \pm 56,6$ g y se alojaron individualmente. Los gazapos tuvieron acceso ad libitum al agua y a un pienso comercial (Cunilactal, Nanta, S.A.), también suministrado a sus madres, con un 15,8% de PB, un 35,7% de FND, un 16,7% de FAD y un 3,3% de LAD y sin antibióticos. El contenido estimado en energía digestible fue de 11,0 MJ/kg MS. Para realizar los experimentos se sacrificaron un total de 106 gazapos por dislocación cervical de forma que se sacrificó 1 conejo de cada camada a los 26, 31, 38, 45 y 52 d de edad. Todos los animales fueron sacrificados entre las 10 y las 13 horas. Para los análisis de microbiología se recogió 1 g de contenido cecal de 8 gazapos de cada edad y la biodiversidad de la microbiota se determinó mediante RFLP de acuerdo con Chamorro et al. (2009). El efecto de la edad sobre los parámetros de crecimiento y los pesos del aparato digestivo y del ciego se analizó mediante un análisis de varianza en donde la edad y la camada fueron las principales fuentes de variación. Las medias se compararon mediante un test t-student protegido.

Resultados y discusión

El peso de los animales, su velocidad de crecimiento e ingestión aumentaron con la edad ($P < 0,001$; Tabla 1). La edad también afectó la eficacia alimenticia ($P = 0,043$) aunque la evolución fue errática con la edad (Tabla 1). La ingestión y la velocidad de crecimiento de los gazapos de este experimento fueron en el periodo de 26 a 30 d de edad un 20 y 45% inferiores a lo que por edad y tipo genético les correspondería (Gutiérrez et al., 2003). En este periodo estos animales están ingiriendo de media 816 kJ/kg $PV^{0,75}$, valor que se encuentra por encima de las necesidades de mantenimiento pero que es aproximadamente un 18% inferior a la cantidad de energía necesaria para alcanzar velocidades de crecimiento normales (Parigi-Bini y Xiccato, 1998). Esta menor ingestión tras el destete también fue observada por Gallois et al. (2005) en animales destetados a 21 y 35 d de edad. Pese a que la ingestión aumentó con la edad, los animales mostraron un peso a 51 d en torno a un 20% inferior a lo esperado. A pesar de estos resultados no hubo mortalidad en la prueba. El peso relativo del aparato digestivo y del ciego con respecto al peso vivo aumentó ($P < 0,001$) desde los 26 hasta los 38 d de edad (Tabla 2). Desde los 38 a los 45 d de edad ambos pesos descendieron, estabilizándose entre los 45 y los 52 d de edad. Estos resultados reflejan que especialmente entre los 26 y 31 d de edad se produce una mayor acumulación de digesta en el ciego en relación al total del aparato digestivo que se traduce en un incremento en que la proporción del ciego respecto al total del aparato digestivo, que se incrementa desde un 25 a un 30% en este periodo. Entre los 31 y 38 d de edad el ciego continúa incrementando su peso relativo, en paralelo al del tracto digestivo, alcanzando su peso relativo máximo. Desde los 38 d de edad en adelante se observa una estabilización de los pesos del tracto digestivo y ciego. Esta evolución ha sido previamente observada por Padilha et al. (1995) y Gallois et al. (2005). En la Figura 1 se muestra el dendograma que ilustra el grado de similitud (SR, %) correspondiente a la microbiota cecal, mientras que en la Tabla 3 se recoge la media del grado de similitud dentro de cada edad y entre las distintas edades. La agrupación de los animales en los diferentes clusters indica que el grado de similitud dentro de cada edad (que varió entre un 89,1 y un 95,3%) fue superior al grado de similitud entre distintas edades (que varió entre un 82,3 y un 92,5%. Tabla 3). La variabilidad en la composición de la microbiota cecal fue menor a los 45 y 52 d de edad (SR del 92,5% entre ambas) en comparación con edades más tempranas (26, 31 y 38 d. Tabla 3). Estos resultados coinciden con la estabilización del llenado del ciego y del tracto digestivo observada a partir de los 45 d de edad. Los menores grados de similitud se observan entre los animales lactantes (26 d) y los animales de 31 y 38 d de edad, lo cual estaría relacionado con el mayor desarrollo del ciego observado y la colonización microbiana que tiene lugar a estas edades (Padilha et al., 1995). No se observó efecto de la camada ($P > 0,10$) ni en el desarrollo del aparato digestivo ni en la composición de la microbiota.

	Periodo, d				rsd	P_{periodo}^2
	26-30	30-37	37-44	44-51		
N	86	63	42	21		
Velocidad crecimiento, g/d	22,2 ^a	32,1 ^b	37,9 ^c	40,5 ^d	11,2	0,001
Consumo, g/d	50,8 ^a	61,8 ^b	84,4 ^c	96,5 ^d	16,0	0,001
Eficacia alimenticia, g/g	0,421 ^a	0,520 ^b	0,367 ^a	0,522 ^b	0,284	0,043

Medias con letras diferentes indican que difieren con $P < 0,050$.

Tabla 1. Evolución con la edad de los rendimientos productivos de gazapos destetados a 26 d de edad.

	Edad					rsd	P _{edad} ²
	26 d	31 d	38d	45d	52d		
Peso aparato digestivo, %PV	20,8 ^a	23,3 ^b	28,1 ^c	24,9 ^b	24,3 ^b	3,44	0,001
Peso ciego, %PV	5,2 ^a	7,1 ^b	8,5 ^c	7,6 ^{b,c}	7,6 ^{b,c}	1,87	0,001

Medias con letras diferentes indican que difieren con P < 0,050.

Tabla 2. Evolución con la edad del peso del aparato digestivo y del ciego con respecto al peso vivo del animal.

	26 d		31 d		38 d		45 d		52 d	
	media	sd								
26 d	90,5	2,4								
31 d	84,8	1,0	89,1	2,6						
38 d	82,3	1,2	86,7	2,0	90,6	1,8				
45 d	86,2	1,5	87,1	1,4	84,4	1,4	93,5	0,8		
52 d	86,0	2,2	86,1	2,1	84,3	1,4	92,5	0,4	95,3	1,2

Tabla 3. Media y desviación estándar de la similitud de la microbiota del ciego dentro de cada edad y entre las distintas edades.

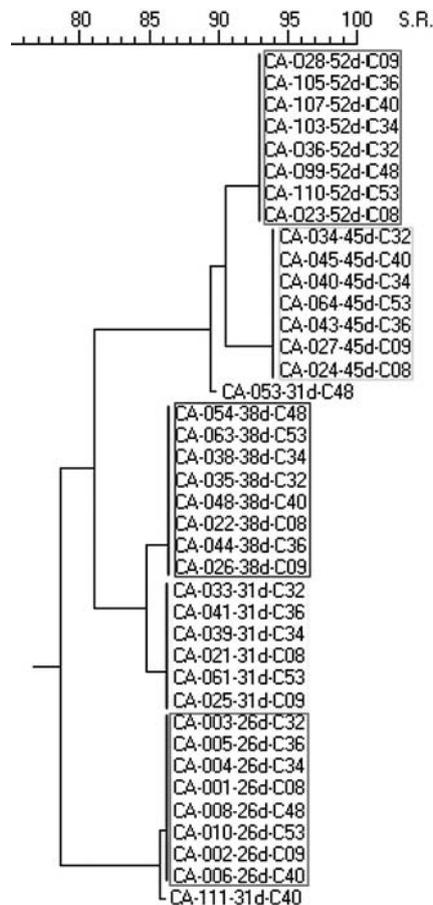


Figura 1. Dendrograma que muestra el grado de similitud (S. R.) de los patrones de las bandas de PCR-RFLP del ciego (Para cada animal se muestra: identificación animal – edad sacrificio – identificación de la camada).

Bibliografía

Carabaño R, Badiola I, Licois D., Gidenne T. 2006. *The digestive ecosystem and its control through nutritional or feeding strategies*. In: *Recent advances in rabbit sciences* (Maertens L., Coudert P., ed). Ilvo, Merelbeke, Belgium. pp. 221-227.

Chamorro S, De Blas C., Grant G., Badiola I, Menoyo D., Carabaño R. 2009. *Effect of dietary supplementation with glutamine and combination of glutamine-arginine on intestinal health in twenty-five day old weaned rabbits*. *J. Anim. Sci.*, 88:170-180.

De Blas J.C., Gutiérrez I, Carabaño R. 1999. *Destete precoz en gazapos. Situación actual y perspectivas*. In: *XV Curso de Especialización FEDNA. Avances en Nutrición y Alimentación Animal*. pp 67-80.

Gallois M., Gidenne T, Fortun-Lamothe L., Le Huerou-Luron I, Lalles J.P. 2005. *An early stimulation of solid feed intake slightly influences the morphological gut maturation in the rabbit*. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45:109-122.

Gutiérrez I, Espinosa A, García J, Carabaño R, De Blas J.C. 2003. *Effect of protein source on digestion and growth performance of early-weaned rabbits*. *Anim. Res.*, 52:461-471.

Méndez J, De Blas J.C., Fraga M.J. 1986. *The effects of diet and remating interval alter parturition on the reproductive performance of the commercial doe Rabbit*. *J. Anim Sci.*, 62:1624-1634.

Padilha M.T.S., Licois D., Gidenne T, Carré B, Fonty G. 1995. *Relationship between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning*. *Reprod. Nutr. Develop.*, 35:375-386.

Parigi Bini R, Xiccato G. 1998. *Energy metabolism and requirements* (De Blas C., Wiseman J., ed), *The Nutrition of the rabbit*. Wallingford Oxon, UK: CABI Publishing. CAB International. pp 103-132.

Evolución con la edad de los mecanismos de barrera intestinal.

2. Morfología intestinal y sistema inmune

Evolution with age of gut barrier mechanisms. 2. Mucosa morphology and immune

Delgado R.¹, Menoyo D.¹, Badiola I.², Pérez de Rozas A.², Carabaño R.¹, García J.^{1*}

¹Departamento de Producción Animal. ETSIA. Universidad Politécnica de Madrid.

²CReSA-UAB

Dirección de contacto: javier.garcia@upm.es

Resumen

Se destetaron 100 gazapos de 20 camadas a los 26 d de edad con un peso de 429 ± 57 g y se sacrificó 1 animal por camada a los 26, 31, 38, 45 y 52 d de edad. Se tomaron muestras de mucosa intestinal y apéndice para determinar la morfología intestinal (yeyuno, n entre 16 y 20 animales por edad) y distintas citocinas (íleon y apéndice, n= 6) La longitud de las vellosidades intestinales y la profundidad de las criptas en el yeyuno se redujeron entre los 26 y los 31 d en un 26 y 9% respectivamente. De los 31 a los 38 días se observó un aumento tanto de la longitud de las vellosidades como de la cripta. A partir de esta edad no se observaron cambios en las vellosidades, que mostraron valores similares a los determinados en el destete, mientras que las criptas siguieron aumentando ligeramente (9%). En cuanto al sistema inmune ligado a la mucosa intestinal, se observó una mayor expresión en el apéndice que en íleon, alcanzando las citocinas IL-10, IL-8 y TNF- α los mayores niveles de expresión con valores de ciclo umbral (Ct) de 19,8, 20,6 y 20,7 respectivamente. La expresión del IFN- γ en el apéndice vermiforme aumentó de manera significativa con la edad ($P < 0,05$). Por su parte, en el íleon se produjo un aumento significativo con la edad de la expresión de la IL-2 ($P < 0,05$) y una tendencia ($P = 0,06$) al aumento de la expresión del IFN- γ .

Palabras clave: edad, sistema inmune, morfología mucosa, conejo.

Abstract

One hundred rabbits from 20 litters were weaned at 26 d of age weighing 429 ± 57 g. One rabbit per litter were slaughtered at 26, 31, 38, 45 and 52 d of age. Samples of intestinal mucosa and appendix were processed to determine mucosa morphology (jejunum, n from 16 to 20 per age) and the expression of several cytokines (ileum and appendix, n=6 per age). Villi length and crypt depth in the jejunum were reduced ($P < 0.05$) between 26 and 31 days 26 and 9%, respectively. However from 31 to 38 days we observed an increase in both traits. From 38 to 52 days of age, villi length did not change, showing similar values that those observed at 26 days, however the crypt depth increased ($P < 0.05$). The expression of cytokines were higher in the vermiform appendix than in the ileum, corresponding the highest expression levels to IL-10, IL-8 and TNF- α with values of threshold cycle (Ct) of 19.8, 20.6 and 20.7, respectively. The expression of IFN- γ in the appendix significantly increased with age ($P < 0.05$). In the ileum, the expression of IL-2 was significantly increased with age ($P < 0.05$) and the expression of IFN- γ show at tendency ($P = 0.06$) to increased.

Key words: age, immune system, mucosa morphology, rabbit.

Introducción

El destete es un periodo de estrés para el gazapo, lo que unido a un desarrollo incompleto de su capacidad digestiva da lugar a una mayor susceptibilidad para contraer enfermedades digestivas que se convierten en la principal causa de mortalidad y morbilidad de los gazapos alrededor del destete. La "barrera intestinal", es la encargada de impedir la colonización de la mucosa y la translocación de las bacterias y las toxinas a través de ella. Dicha barrera intestinal está formada por una barrera física constituida por propia estructura del epitelio intestinal y la capa de mucus y una barrera inmunológica que está formada por el sistema inmune asociado a la mucosa intestinal (GALT) (Knight et al., 2000; Carabaño et al., 2008). Distinto trabajos (Gutiérrez et al., 2002; Campín et al., 2003; Gómez Conde et al., 2007) han detectado una atrofia de las vellosidades tras el destete, sin embargo Gallois et al. (2005) no observaron dicha reducción de las vellosidades. La transición de leche a pienso va a dar lugar a una maduración del sistema inmune del animal debido a la mayor colonización por la microbiota intestinal que es esencial para la proliferación y diversificación de los linfocitos del GALT (Lanning et al., 2004; Mage et al., 2006). Sin embargo, para que el sistema inmune proteja al animal de enfermedades, éste tiene que ser inmuno-competente, es decir, te-

ner capacidad suficiente de respuesta ante los patógenos y a la vez permitir el asentamiento de una microbiota saprófita. Por ello el objetivo de nuestro trabajo fue determinar el efecto de la edad sobre la maduración de la barrera intestinal en animales sanos.

Material y métodos

El manejo de los animales se realizó de acuerdo con lo descrito por Delgado et al. (2010). Para realizar los experimentos se sacrificaron 100 animales por dislocación cervical, de forma que se sacrificó 1 conejo de cada camada, a los 26, 31, 38, 45 y 52 d de edad. Para la prueba de histología se utilizaron un total de 89 gazapos ya que se descartaron las muestras de aquellos animales cuya morfología intestinal estaba dañada después del procesado de las muestras y no permitía realizar las mediciones pertinentes. Las mediciones se realizaron de acuerdo a la metodología utilizada por Gómez-Conde et al. (2007). De los 20 gazapos sacrificados cada semana se eligieron 6 gazapos (en total 30 gazapos) para los ensayos de inmunidad de forma que perteneciesen a las mismas camadas. Las expresiones de las interleucinas se determinaron por PCR a tiempo real, para la IL-10, TNF- α , IFN- γ se usaron los cebadores publicados en Godornes et al. (2007), para GADPH, IL6, iNOS los utilizados por Gutiérrez (2009) y para la IL-2 e IL-8 (Delgado, 2010). El efecto de la edad sobre la morfología de la mucosa y parámetros inmunitarios se analizaron mediante un análisis de varianza en donde la edad fue la principal fuente de variación. El efecto camada se incluyó en el modelo para el análisis de la morfología de la mucosa. Las medias se compararon mediante un test t-student protegido.

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la evolución con la edad de la morfología de la mucosa del yeyuno. La longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas se redujeron un 26% y un 9%, respectivamente, en animales de 31 d respecto a los animales lactantes de 26 d de edad. Esta aparente atrofia intestinal post destete concuerda con el reducido consumo de pienso observado en este periodo (Gallois et al., 2005; Delgado et al., 2010) Distintos autores en porcino indican que un consumo reducido en los días siguientes al destete es la causa de la atrofia intestinal observada en esta especie que puede llegar a reducir la longitud de las vellosidades hasta en un 50% (Van der Klis y Jansman, 2002). En conejos también se ha observado reducciones de las vellosidades 10 días post destete aunque la magnitud de este efecto es menor y variable (28 - 13%) con el tipo de dieta, llegándose a observar hasta incrementos del 28% con dietas con contenidos moderados en fibra soluble (Gutiérrez et al., 2002; Gallois et al., 2005; Gómez-Conde et al., 2007). Sin embargo, al contrario de lo observado en los trabajos anteriores, en este trabajo también se redujo la profundidad de las criptas (10%) a los 31 días, si bien la cripta aumenta de los 31 a los 38 días. A igual de lo que ocurre en cerdos la proliferación de células de la cripta lleva un retraso respecto al daño causado en las vellosidades. De cualquier modo, parece que el posible daño en la vellosidad es transitorio. A partir de los 38 d y hasta los 52 d, la profundidad de la cripta (9%, $P < 0,05$) y la longitud de la vellosidad (7%, $P > 0,05$) aumentaron, haciendo que la relación vellosidad/cripta permaneciera constante.

En la Figura 1 se muestran los niveles de expresión de la citocinas seleccionadas en íleon y apéndice vermiforme. Como se puede observar la expresión en apéndice es mayor ($P < 0,05$) que la del íleon a cualquier edad y en especial para la IL10 indicaría que el apéndice como órgano linfoide primario responde desde muy temprano y con respuestas tendentes a la tolerancia (Dasso et al., 2000). Sin embargo la expresión en un órgano efector como el íleon es baja ya que se trata de animales sanos. Además, en el caso del apéndice vermiforme también hay una alta expresión de IL8 y TNF- α (valores de Ct de 20,6 y 20,7 respectivamente) que se corresponden con citocinas del complejo proinflamatorio.

	Edad					rsd	P	
	26d	31 d	38 d	45 d	52d		Edad	Camada
n	18	20	18	16	17			
Longitud vellosidad, μm	595 ^b	441 ^a	564 ^b	579 ^b	603 ^b	114,8	0,001	0,015
Profundidad cripta, μm	85,1 ^b	76,6 ^a	96,3 ^c	99 ^{c,d}	105 ^d	8,86	0,001	0,43
Relación vellosidad/cripta	6,98 ^a	5,87 ^b	5,80 ^b	5,85 ^b	5,71 ^b	1,14	0,021	0,035

^{a, b, c, d} En cada edad las letras minúsculas diferentes indican que los valores difieren con $P < 0,05$.

Tabla 1. Evolución con la edad de la longitud de las vellosidades, profundidad de las criptas y relación entre ambos en el yeyuno.

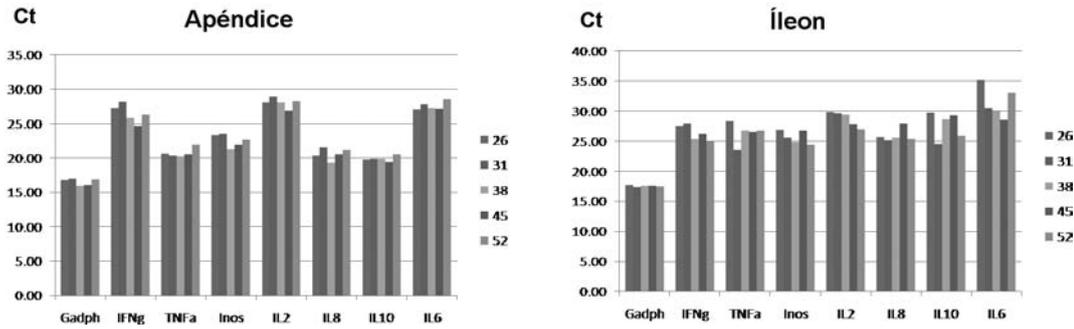


Figura 1. Patrón de expresión de los genes a estudio en el apéndice vermiforme y la mucosa ileal con la edad. El Ct es el valor de ciclo umbral de forma que un menor valor de Ct indica una mayor cantidad de expresión.

Incrementos de Ct \pm ds = 1,14; n=6 normalizados por el gen control (GADPH).
^{a, b, c, d} En cada edad las letras minúsculas diferentes indican que los valores difieren con P < 0,05.

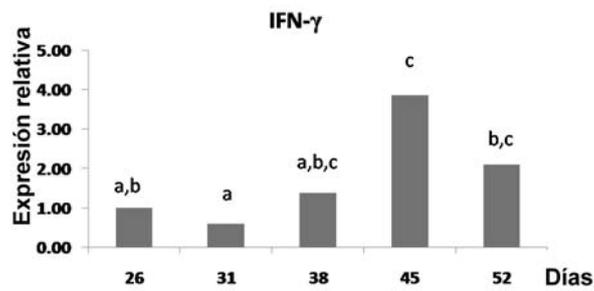
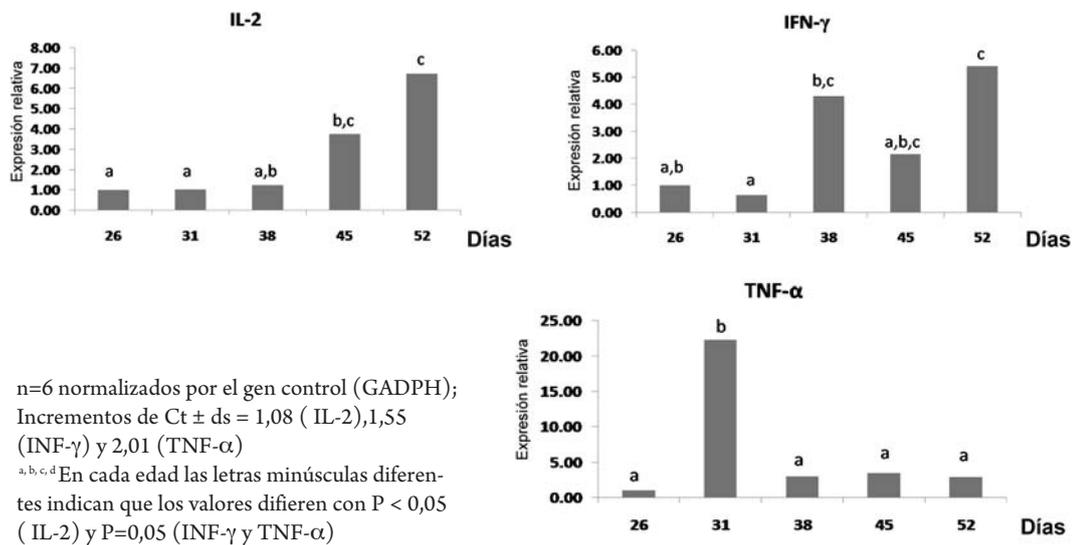


Figura 2. Efecto de la edad sobre la expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando como control el día 26 del IFN γ en apéndice vermiforme.



n=6 normalizados por el gen control (GADPH);
 Incrementos de Ct \pm ds = 1,08 (IL-2),1,55 (INF- γ) y 2,01 (TNF- α)
^{a, b, c, d} En cada edad las letras minúsculas diferentes indican que los valores difieren con P < 0,05 (IL-2) y P=0,05 (INF- γ y TNF- α)

Figura 3. Efecto de la edad sobre la expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando como control el día 26 del IL-2, IFN γ y TNF- α en íleon.

En la Figura 2 podemos observar que en el apéndice vermiforme la expresión del IFN- γ aumenta de manera significativa con la edad (P < 0,05). Del mismo modo en la Figura 3 se observa un aumento significativo de la expresión de la IL2 en íleon (P < 0,05) y una tendencia (P = 0,06) al aumento de la expresión del IFN- γ . La síntesis de IL-2 e IFN- γ está relacionada con una respuesta Th1 a través de la cual tiene lugar la activación de las células fagocíticas esenciales para incrementar la actividad microbicida (Zhu y Paul, 2009). Por lo tanto los cambios de expresión observados se podrían relacionar como una respuesta normal del animal ante el aumento de la complejidad bacteriana que tiene lugar en el período de transición leche-pienso y comienzo de alimentación sólida.

Bibliografía

Campín J, Eiras P, Rebollar P.G, Carabaño R. 2003. Estudio del tejido linfoide asociado a intestino en gazapos en torno al destete. ITEA, 24:660-662.

Carabaño R, Badiola I, Chamorro S, García J, García-Ruiz A, García Rebollar P, Gómez-Conde M.S, Gutiérrez I, Nicodemus N, Villamide M.J, De Blas J.C. 2008. Review. New trends in Rabbit feeding: influence of nutrition on intestinal health. Span. J. Agric. Res., 6:15-25.

Dasso J.F, Obiakor H, Bach H, Anderson A.O, Mage R.G. 2000. A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. *Developmental and Comparative Immunology*, 24:797-814.

Delgado R. 2010. Maduración de los mecanismos de defensa intestinal en gazapos tras el destete. Trabajo fin de carrera. Departamento de Producción Animal, ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid.

Delgado R, Menoyo D, Badiola I, Pérez de Rozas A, Carabaño R, García J. 2010. Evolución con la edad de los mecanismos de barrera intestinal. Morfología intestinal y sistema inmune. XXXV Symposium de Cunicultura. Segovia (en prensa).

Gallois M, Gidenne T, Fortun-Lamothe L, Le Huerou-Luron I, Lalles JP. 2005. An early stimulation of solid feed intake slightly influences the morphological gut maturation in the rabbit. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45:109-122.

Godornes C, Leader B.T, Molini B.J, Centurion-Lara A, Lukefahr S.A. 2007. Quantitation of Rabbit Cytokine mRNA by Real-Time RT-PCR. *Cytokine*, 38:1-7.

Gómez-Conde M.S, García J, Chamorro S, Eiras P, García-Rebollar P, Pérez de Rozas A, Badiola I, De Blas J.C., Carabaño R. 2007. Neutral detergent-soluble fiber improves gut barrier function in twenty-five-day-old weaned rabbits. *J. Anim. Sci.*, 85:3313-3321.

Gutiérrez I, Espinosa A, García J, Carabaño R, De Blas J.C. 2002. Effect of the levels of Starch, fibre and lactose on digestion and growth performance of early weaned rabbits. *J. Anim. Sci.*, 80:1029-1037.

Gutiérrez M. 2009. Desarrollo de nuevos criterios inmunitarios de la barrera intestinal en conejos. Trabajo fin de carrera. Departamento de Producción Animal, ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid.

Knight P.A, Wright S.H, Lawrence C.E, Paterson Y.Y.W, Miller H.R.P. 2000. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J. Exp. Med.*, 192:1894-1856.

Lanning D, Osborne B, Knight K.L. 2004. Immunoglobulin genes and generation of antibody repertoires in higher vertebrates: a key role for GALT. In: Alt, F. W., Honjo, T., Neuberger, M. S., (eds) *Molecular Biology of B Cells*. Elsevier Science Ltd. Amsterdam, The Netherlands, pp. 433-448.

Mage R.G., Lanning D, Knight K.L. 2006. B cell and antibody repertoire development in rabbits: The requirement of gut-associated lymphoid tissues. *Dev. Comp. Immunol.*, 30:134-153.

Van Der Klis J.D., Jansman A.J.M. 2002. Optimising nutrient digestion, absorption and gut barrier in monogastric. Reality or illusion? En: *Nutrition and Health of the Intestinal Tract*. (Black M.C., Vahl H.A., De Lange L., Van De Braak A.E., Hemke G., Hensing M., eds). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands. pp 15-36.

Zhu J.F., Paul W. 2009. CD4 T cells: fates, functions and faults. *Blood*, 112:1557-1569.

Contenido de hueso de la canal de conejos de monte cazados en Andalucía (España)

Carcass bone content in wild rabbits hunted in Andalusia (Spain)

González-Redondo P.*, Camacho T., González-Sánchez C., Ramírez-Reina M.C.

Departamento de Ciencias Agroforestales, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Sevilla, Carretera de Utrera km 1, 41013 Sevilla, España

Dirección de contacto: pedro@us.es

Resumen

Para caracterizar el contenido de hueso de la canal del conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus algirus*) procedente de la caza, se analizaron 53 canales encorrambradas adquiridas en mercados de abastos de Sevilla (España) con un peso medio de 767,8 g. Las canales encorrambradas se desollaron y prepararon para obtener las canales de referencia, que tuvieron un peso medio de 551,2 g. Se realizó el despiece tecnológico propuesto por la World Rabbit Science Association, que rindió un 14,3% de patas delanteras, un 38,0% de patas traseras, un 32,1% de pieza lomo y un 11,4% de caja torácica. El contenido de hueso fue del 16,3% en las patas delanteras, 13,4% en las patas traseras, 9,4% en la pieza lomo, 22,5% en la caja torácica y 13,0% en el conjunto de la canal de referencia. El contenido de hueso de la pata trasera fue un predictor fiable del contenido de hueso de la canal de referencia, pues se obtuvo una $R^2=0,737$ ($p<0,001$). No se encontró dimorfismo sexual en el contenido de hueso ni correlación entre el peso de la canal y el contenido de hueso de la canal del conejo de monte. En comparación con los valores publicados para razas y líneas de aptitud cárnica a la edad de sacrificio habitual en España, el contenido de hueso de la canal del conejo de monte es moderado.

Palabras clave: Conejo de monte, *Oryctolagus cuniculus algirus*, canal, contenido de hueso, carne de caza.

Abstract

With the aim to characterise the carcass bone content of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*) obtained from hunting, 53 specimens (unskinned, eviscerated rabbits) bought in markets of Seville (Spain) were analysed. The specimens weighed 767.8 g. The reference carcass, obtained by flaying the specimens, weighed 551.2 g, and after carrying out the technological division according to the method proposed by the World Rabbit Science Association, 14.3% of fore leg, 38.0% of hind part, 32.1% of loin, and 11.4% of thoracic cage were obtained. Bone percentage was 16.3% in the fore leg, 13.4% in the hind part, 9.4% in the loin, 22.5% in the thoracic cage, and 13.0% in the reference carcass. Bone percentage of the hind leg gave a reliable prediction of the bone percentage of the carcass, because $R^2=0,737$ ($p<0,001$) was achieved. No sexual dimorphism was found for the bone content, nor correlation between carcass weight and bone content of the carcass of the wild rabbit. When compared to figures published for meat breeds and lines at the usual age of slaughtering in Spain, the bone content of the wild rabbit carcass is moderate.

Key words: Wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus algirus*, carcass, bone content, game meat.

Introducción

En algunas regiones españolas, principalmente en el sur y centro peninsular, todavía es tradicional el consumo de carne de conejo de monte procedente de la caza. Parte de los conejos son consumidos en el círculo social y familiar de los cazadores (González-Redondo et al., 2007b, 2010) y el resto se comercializa en mercados de abastos y carnicerías (González-Redondo et al., 2008), tras ser procesados en establecimientos de manipulación de caza (Reglamento CE 853/2004). Son relativamente pocos los estudios que han caracterizado la canal y carne de los conejos de monte cazados en España (Cambero et al., 1991; Cobos et al., 1995; González-Redondo et al., 2007a, 2008). En particular, para los conejos de monte de la subespecie *O. c. algirus* que se cazan en Andalucía se han caracterizado recientemente las piezas comerciales (González-Redondo et al., 2008), el pH y capacidad de retención de agua (González-Redondo et al., 2007a) y la composición química de la carne (datos pendientes de publicación). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre el contenido de hueso de las canales de conejo de monte, aspecto que, por el contrario, es bien conocido en el conejo doméstico (Pla et al., 1998; Piles et al., 2000; Pas-

cual y Pla, 2007). Dado que ambos tipos de conejos difieren en cuanto a su genética (Branco et al., 2000), medio y modo de vida, calidad de la carne (González-Redondo et al., 2007a y datos pendientes de publicación) y presentación comercial (González-Redondo et al., 2008), y puesto que el contenido de hueso condiciona el rendimiento en carne de las piezas y además es esgrimido por algunas personas como motivo para no comer carne de conejo por opinar, equivocadamente, que es elevado (González-Redondo et al., 2009, 2010), se realizó un estudio cuyo objetivo fue analizar el contenido de hueso de canales de conejos de monte cazados en Andalucía (España) que se comercializan en mercados de abastos.

Material y métodos

Durante el verano de 2006 se adquirieron en mercados de abastos de Sevilla (España) 53 conejos de monte maduros (49% machos), que procedían de varios cotos de Andalucía (España) y cuya presentación comercial era en forma de canal encorambada (con piel pero eviscerada). Mediante análisis de marcadores del cromosoma X (Geraldés et al., 2006), realizados en el Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (Vairão, Portugal), se constató su pertenencia a la subespecie *O. c. algirus* típica del sudoeste de la Península Ibérica (Branco et al., 2000). Los conejos se conservaron congelados (-20 °C) hasta su manipulación, y tras descongelarlos se desollaron, se retiraron las vísceras torácicas y abdominales y la cabeza y se seccionaron los pies y manos a la altura de los tarsos y carpos para obtener la canal de referencia. En dicha canal de referencia se realizó el despiece tecnológico recomendado por la World Rabbit Science Association (WRSA) para obtener las piezas caja torácica, lomo, patas traseras (parte trasera) y patas delanteras (Blasco y Ouhayoun, 1996). Se deshuesaron las patas traseras y delanteras y el lomo de la semicanal izquierda. La caja torácica se deshuesó completa. Para cada parte del despiece tecnológico y para la canal de referencia, se calculó el contenido de hueso como porcentaje del peso de hueso respecto al peso total de la pieza o de la canal. La relación carne/hueso se calculó como el cociente entre el peso de la carne y el peso del hueso. El peso del hueso incluyó cartílagos y pequeñas porciones de carne que permanecía entre las vértebras, costillas y otras partes de las que era difícil retirarla al diseccionar las piezas con un bisturí (Blasco y Ouhayoun, 1996). Usando el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., 2006), se calcularon estadísticos descriptivos de las variables medidas, pruebas t de Student para determinar la influencia del sexo sobre el contenido de hueso de la canal de referencia y de las piezas resultantes de su despiece tecnológico, y correlaciones de Pearson para estudiar la relación entre el peso de la canal encorambada, el peso de la canal de referencia y la proporción de hueso de la canal de referencia sobre el contenido de hueso de las mencionadas piezas.

Resultados y discusión

La Tabla 1 muestra el peso de la canal encorambada, el peso de la canal de referencia, la composición regional de la canal de referencia y la proporción de hueso de las piezas de la canal de los conejos de monte analizados.

La composición regional obtenida, en términos de proporción de peso de las piezas del despiece tecnológico respecto al peso de la canal de referencia (Tabla 1), fue similar a la descrita por Pla et al. (1998), Piles et al. (2000), Hernández et al.

<i>Variable</i>	<i>Media±ET</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>CV (%)</i>
Peso canal encorambada (g)	767,8±10,9	612,6	987,7	10,3
Peso canal de referencia (g)	551,2±8,1	380,7	713,4	10,7
Pieza lomo (%)	32,1±0,3	27,4	37,6	6,5
Patas delanteras (%)	14,3±0,1	12,4	17,6	6,6
Patas traseras (%)	38,0±0,3	33,2	42,1	5,3
Caja torácica (%)	11,4±0,2	7,0	15,3	12,3
Hueso de la pieza lomo (%)	9,4±0,3	2,9	18,9	23,3
Hueso de patas delanteras (%)	16,3±0,4	10,9	28,3	19,0
Hueso de patas traseras (%)	13,4±0,3	9,7	17,6	14,8
Hueso de caja torácica (%)	22,5±0,6	13,9	33,3	18,5
Hueso de canal de referencia (%)	13,0±0,3	9,6	19,1	14,7

ET: Error típico. CV: Coeficiente de variación.

Tabla 1. Peso de la canal encorambada, peso de la canal de referencia, composición regional de la canal de referencia y proporción de hueso de las piezas de la canal en conejos de monte (n=53).

(2004) y Pascual y Pla (2007) para conejos de líneas cárnicas sacrificados con nueve semanas de edad. Las canales presentaron un 70% de partes más nobles (pieza lomo más patas traseras).

El contenido de hueso (Tabla 1) expresado en su equivalente relación carne/hueso es de 6,7, 9,6, 5,1, 3,4, 5,1 y 6,5 para la canal de referencia y para las piezas lomo, caja torácica, pata delantera y pata trasera, respectivamente. Al igual que en conejos domésticos, en conejos de monte la caja torácica mostró el mayor contenido de hueso y la pieza lomo el menor (Pla et al., 1996). La relación carne/hueso de la pata trasera, que suele tomarse como representativa de toda la canal (Blasco y Ouha-youun, 1996), en razas y líneas de conejos de aptitud cárnica aumenta con la edad, adoptando valores inferiores a 5,0 en animales sacrificados a los 63 días (Pla et al., 1998; Piles et al., 2000; Pascual y Pla, 2007), de 5,6-6,1 en sacrificados a los 79 días (Lambertini et al., 2004), de 6,8 cuando se sacrifican con 82 días (Lambertini et al., 2006), aumentando notablemente en conejos Rex de Poitou sacrificados a los 126 días de edad, cuando alcanza valores de 7,6 a 8,0 (Larzul et al., 2004). Es posible que el relativamente bajo contenido de hueso de la canal de los conejos de monte encontrado por nosotros se deba en parte al mayor grado de madurez de los animales silvestres analizados, en comparación con los conejos domésticos, que se sacrifican a muy temprana edad (en torno a nueve semanas en España), usualmente antes de la pubertad. En efecto, en conejos domésticos el tejido óseo muestra una típica alometría negativa, y el coeficiente de alometría concentra su incremento de valor en el corto intervalo de tiempo (4 a 8 semanas) comprendido entre el destete y el punto de inflexión de la curva de crecimiento coincidiendo con la pubertad (Deltoro y López, 1985). Los conejos de monte de la muestra, aunque de edades heterogéneas y desconocidas por no poder controlarse la edad de los animales abatidos en el lance cinegético, eran todos maduros, tal como se justificó en González-Redondo et al. (2007a) y (2008). Esto se debe a que los cazadores procuran no abatir gazapos demasiado jóvenes y también a que los establecimientos de manipulación de caza evitan adquirir y comercializar conejos de monte con pesos demasiado bajos.

La Tabla 2 muestra la influencia que tienen, sobre el contenido de hueso de las piezas y de la canal de referencia, el peso de la canal encorrambrada, el peso de la canal de referencia y el contenido de hueso de la canal de referencia.

No se encontró dimorfismo sexual para el contenido de hueso de la canal de referencia ni para las piezas resultantes del despiece tecnológico (Tabla 2), pues la pata delantera fue la única pieza en que mostró ligeras diferencias entre sexos (15,4% en machos y 17,1% en hembras) pero el p-valor era próximo al límite de la no significatividad ($p \approx 0,05$). Estos resultados coinciden con lo descrito en general para el contenido de hueso en razas y líneas domésticas (Pla et al., 1998; Piles et al., 2000; Larzul et al., 2004; Lambertini et al., 2006).

En consonancia con el hecho de que la muestra de conejos de monte estaba compuesta por animales maduros con poca variabilidad de peso (Tabla 1), apenas se encontró correlación entre el peso de la canal (tanto encorrambrada como de referencia) y el contenido de hueso de las piezas y de la canal de referencia (Tabla 2). Sólo se encontraron correlaciones negativas

<i>Contenido de hueso (%)</i>	<i>Diferencia entre sexos</i>	<i>Correlación con Peso de canal encorrambrada (g)</i>	<i>Correlación con Peso de canal de referencia (g)</i>	<i>Correlación con Hueso de canal de referencia (%)</i>
Pieza lomo	t=0,505 p=0,616	r=-0,025; p=0,860	r=-0,167; p=0,232	r=0,763; p<0,001
Patas delanteras	t=2,039 p=0,047	r=0,006; p=0,965	r=0,005; p=0,990	r=0,619; p<0,001
Patas traseras	t=0,760 p=0,451	r=-0,117; p=0,404	r=-0,210; p=0,132	r=0,859; p<0,001
Caja torácica	t=0,119 p=0,906	r=-0,303; p=0,027	r=-0,341; p=0,012	r=0,769; p<0,001
Canal de referencia	t=0,573 p=0,596	r=-0,177; p=0,204	r=-0,308; p=0,025	-

Tabla 2. Relación del sexo de los conejos, del peso de la canal encorrambrada, del peso de la canal de referencia y de la proporción de hueso de la canal de referencia con la proporción de hueso de las piezas de la canal en conejos de monte (n=53).

débiles ($p < 0,05$) del peso de la canal encorabrada y del peso de la canal de referencia con la proporción de hueso de la caja torácica, así como del peso de la canal de referencia con la proporción de hueso de la canal de referencia.

La proporción de hueso de todas las piezas de la canal, pero en particular la de la pata trasera, mostraron correlaciones positivas fuertes y altamente significativas (Tabla 2) con la proporción de hueso de la canal de referencia. La ecuación predictora de la proporción de hueso de la canal de referencia ($\%H_{\text{canal de referencia}}$) en función de la proporción de hueso de la pata trasera ($\%H_{\text{pata trasera}}$), que se muestra a continuación,

$$\%H_{\text{canal de referencia}} = 1,922 + 0,825 \times \%H_{\text{pata trasera}}; \quad R^2=0,737, p<0,001, Se=0,989,$$

mostró un elevado coeficiente de determinación (R^2) y un bajo error típico de la estimación (Se). Por tanto, el contenido de hueso de la pata trasera proporcionó una buena predicción del contenido de hueso de la canal de referencia en conejos de monte, al igual que sucede en conejos domésticos de aptitud cárnica (Blasco y Ouhayoun, 1996), e incluso superando ligeramente el coeficiente de determinación descrito en éstos ($R^2=0,6$, Varewyck y Bouquet, 1982; $R^2=0,69$, Hernández et al., 1996). Para el contenido de hueso, por tanto, es también válida en conejos de monte la recomendación de la WRSA (Blasco y Ouhayoun, 1996) para razas y líneas domésticas cárnicas de utilizar la pata trasera como pieza representativa de toda la canal.

Es posible que las diferencias en el contenido de hueso de la canal del conejo de monte respecto a los conejos domésticos se deban también, en parte, a las diferencias genéticas entre la subespecie *O. c. algirus* a la que pertenecen los conejos silvestres estudiados y la *O. c. cuniculus* a la que pertenecen las razas y líneas domésticas de aptitud cárnica. De hecho, en conejos domésticos se han descrito diferencias de contenido de hueso debidas al tipo genético (Lukefahr et al., 1982; Pla et al., 1996), causadas en parte por un diferente grado de madurez (Pla et al., 1996), y que disminuyen con la selección por velocidad de crecimiento (Hernández et al., 2004; Pascual y Pla, 2007). Sería interesante comparar el contenido de hueso de la canal del conejo de monte y del doméstico mediante una investigación ad hoc en la que los animales se mantuvieran en las mismas condiciones de alojamiento y alimentación y se sacrificaran con el mismo grado de madurez.

Cabe concluir que, en comparación con los valores publicados para razas y líneas de aptitud cárnica a la edad de sacrificio habitual en España, el contenido de hueso de la canal del conejo de monte es moderado. Este puede ser uno más de los atributos que hacen que la carne de conejo de monte sea apreciada por los consumidores familiarizados con las carnes de caza (González-Redondo et al., 2007b, 2010).

Bibliografía

- Blasco A., Ouhayoun J. 1996. Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised proposal. *World Rabbit Sci.*, 4:93-99.
- Branco M., Ferrand N., Monmerot M. 2000. Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. *Heredity*, 85:307-317.
- Cambero M.L., De La Hoz L., Sanz B., Ordóñez J.A. 1991. Seasonal variations in lipids composition of Spanish wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) meat. *J. Sci. Food Agric.*, 56:351-362.
- Cobos A., De La Hoz L., Cambero M.L., Ordóñez J.A. 1995. Chemical and fatty acid composition of meat from Spanish wild rabbits and hares. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 200:182-185.
- Deltoro J., López A.M. 1985. Allometric changes during growth in rabbits. *J. Agr. Sci.*, 105:339-346.
- Geraldes A., Ferrand N., Nacham M.W. 2006. Contrasting patterns of introgression at X-linked loci across the hybrid zone between subspecies of the European Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Genetics*, 173:919-933.
- González-Redondo P., Camacho T., Alcalde M.J. 2007a. Capacidad de retención de agua y pH de la carne de conejos de monte procedentes de la caza. II Congreso Ibérico de Cunicultura, Vila Real, Portugal, pp. 3-8.
- González-Redondo P., Payá-López R., Delgado-Núñez A. 2007b. Comparación de los hábitos de consumo de carne de conejo entre consumidores jóvenes y compradores tradicionales de Sevilla. IV Jornadas Ibéricas de Razas Autóctonas y sus Productos Tradicionales: Innovación, Seguridad y Cultura Alimentarias, Sevilla, España, pp. 275-281.
- González-Redondo P., Ramírez-Reina M.C., González-Sánchez C. 2008. Caracterización de las piezas de conejos de monte comercializadas en mercados de abastos. XXXIII Symposium de Cunicultura, Calahorra, España, pp. 32-35.
- González-Redondo P., Delgado-Núñez A., Payá-López R. 2009. Comparación de opiniones sobre la composición y propiedades de la carne de conejo entre compradores tradicionales y consumidores jóvenes. XXXIV Symposium de Cunicultura, Sevilla, España, pp. 221-228.
- González-Redondo P., Mena Y., Fernández-Cabanás V.M. 2010. Factors affecting consumption of rabbit meat among Spanish university students. *Ecol. Food Nutr.*, 49: en prensa.
- Hernández P., Pla M., Blasco A. 1996. Prediction of carcass composition in the Rabbit. *Meat Sci.*, 44:447-457.

- Hernández M., Aliaga S., Pla M., Blasco A. 2004. The effect of selection for growth rate and slaughter age on carcass composition and meat quality traits in rabbits. *J. Anim. Sci.*, 82:3138-3143.
- Lambertini L., Vignola G., Beone G.M., Zaghini G., Formigoni A. 2004. Effects of chromium yeast supplementation on growth performances and meat quality in rabbits. *World Rabbit Sci.*, 12:33-47.
- Lambertini L., Vignola G., Badiani A., Zaghini G., Formigoni A. 2006. The effect of journey time and stocking density during transport on carcass and meat quality in rabbits. *Meat Sci.*, 72:641-646.
- Larzul C., Thébault R.G., Allain D. 2004. Effect of feed restriction on rabbit meat quality of the Rex du Poitou. *Meat Sci.*, 67:479-484.
- Lukefahr S., Hohenboken W.D., Cheeke, P.R., Patton N.M., Kennick W.H. 1982. Carcass and meat characteristics of Flemish Giant and New Zealand White purebreed and terminal-cross rabbits. *J. Anim. Sci.*, 54:1169-1174.
- Pascual M., Pla M. 2007. Changes in carcass composition and meat quality when selecting rabbits for growth rate. *Meat Sci.*, 77:474-481.
- Piles M., Blasco A., Pla M. 2000. The effect of selection for growth rate on carcass composition and meat characteristics of rabbits. *Meat Sci.*, 54:347-355.
- Pla M., Hernández P., Blasco A. 1996. Carcass composition and meat characteristics of two Rabbit breeds of different degrees of maturity. *Meat Sci.*, 44:85-92.
- Pla M., Guerrero L., Guardia D., Oliver M.A., Blasco A. 1998. Carcass characteristics and meat quality of Rabbit lines selected for different objectives: I. Between lines comparison. *Livest. Prod. Sci.*, 54:115-123.
- Reglamento (CE) 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DOCE L139, de 30 de abril de 2004, pp.: 55.
- SPSS Inc. 2006. *Manual del Usuario de SPSS Base 15.0*. SPSS Inc. Chicago, Estados Unidos.
- Varewyck H., Bouquet Y. 1982. Relations entre la composition tissulaire de la carcasse lapins de boucherie et celle des principaux morceaux. *Ann. Zootech.*, 31:257-268.

MW NANTA

LA TRANQUILIDAD DE QUE TODO VA BIEN



Gama completa de piensos para conejos.
Productos adaptados a los requerimientos
del momento productivo del animal.

**CUNILACTAL MATER · CUNILACTAL SÚPER
CUNILACTAL · CUNIUNIC · CUNILAP
CUNICEBIAL · CUNICEBIAL TRANSICIÓN
CUNIREX · CUNIGÉN**

NANTA S.A. · Ronda de Poniente nº9 · 28760 Tres Cantos (Madrid)
Tel. 918 075 410 · Fax 918 032 515 · www.nanta.es

R



Hermi, líder nacional en cunicultura, inicia una nueva fase de desarrollo dirigida a incrementar el consumo de carne de conejo en España. Estrenamos a la vez **nueva imagen**, un **crecimiento en ventas sostenido**, el desarrollo de **nuevos productos** y una **ilusión** por atender a nuestro **clientes cada día mejor.**



HERMI
CARNE DE CONEJO

BOZANO SL
c/ La Plata, 10
45500 Torrijos (Toledo)
Tfno: 925-760534

MATADERO EL JUCAR S.L
c/ Morron, 2
02210 Las Eras-Alcalá del Jucar (Albacete)
Tfno: 967-473117

CUNICOLA DEL MAESTRAZGO S.L
Poligono I'algarr s/n
12160 Benasal (Castellón)
Tfno: 964-431041

HERMI VALLADOLID
Pol. Ind. La Mora, parc 50-51
47193 La Cistèrniga (Valladolid)
Tfno: 983-403028
Fax: 983-403029
hermi@hermisl.com

HERMI GALICIA
Arborelle, 17
15168 Soñeiros Sada (A Coruña)
Tfno: 981-648114
Fax: 981-610194
romerorumbosl@telefonica.net

GESTORA CUNÍCOLA NORTE
Kipuzti Bidea, 5
48100 Mungia (Bizkaia)
Tfno: 946-156595
Fax: 946-740212
untxi@euskaltel.net