

**RESÚMENES TRABAJOS  
FIN DE GRADO  
2016-2017**



## PUESTA A PUNTO DEL CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR MARC-145 Y DISEÑO DE INFECCIÓN CON *NEOSPORA CANINUM*

**Aguilella, A; Arcenillas, I.; Ruiz de Ybáñez, M.R.**

\***Autor para correspondencia:** Irene Arcenillas Hernández. Email: irene.arcenillas@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

### RESUMEN

La neosporosis es una de las enfermedades parasitarias que provoca mayores pérdidas económicas en el sector ganadero bovino, asociadas principalmente a abortos. Su agente etiológico, *Neospora caninum*, presenta elevadas tasas de seroprevalencia en este sector. A pesar de ser una parasitosis de reciente aparición, existen muchos estudios sobre ella, sobre todo, debido a la ausencia de tratamientos y de vacunas efectivas y al conocimiento limitado de sus mecanismos de invasión y proliferación a nivel molecular. El estudio de *Neospora caninum* en la línea celular MARC-145, considerada la más apropiada por su elevada resistencia al parásito, es fundamental para llevar a cabo gran variedad de ensayos, siendo el objetivo principal de este trabajo el diseño experimental para la optimización de esta infección en nuestro laboratorio. En primer lugar se realizó la caracterización y optimización del cultivo in vitro de la línea celular MARC -145 para plantear posteriormente el diseño experimental de su infección con *Neospora caninum*. Se realizó un ensayo para la selección de la concentración de suero fetal bovino más adecuada, ya que la bibliografía respalda la concentración al 10% pero existen evidencias del correcto funcionamiento al 2%. Los resultados demostraron que no existían diferencias significativas entre ambas concentraciones ( $p=0,58 >0,05$ ). No obstante, se decidió mantener la línea al 10% de suero fetal bovino para que los resultados del estudio pudieran ser comparables con otros similares. Una vez establecido el porcentaje de suero fetal bovino se determinó la densidad celular más adecuada para el subcultivo, presentando la mayor tasa de proliferación en el menor tiempo posible la densidad de siembra de 6.000 células/cm<sup>2</sup>. Finalmente se llegó a la conclusión que para el mantenimiento de la línea celular MARC-145 en las condiciones del Servicio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Murcia, es recomendable emplear una concentración inicial de 6.000 células/cm<sup>2</sup> en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) enriquecido con suero fetal bovino al 10%, glutamina a 3,5 mM, penicilina a 100 UI/mL y estreptomycin a 100 µg/mL, que se incubará a 37°C, con una humedad relativa del 90% y una concentración de CO<sub>2</sub> del 5-9%. En estas condiciones, el subcultivo se establece cada 4 días, permitiendo una buena rutina de trabajo. Para establecer la cinética de crecimiento de la línea celular MARC-145 se empleó el método colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Inicialmente se estableció la curva patrón, que sirvió para estimar los límites de sensibilidad del ensayo colorimétrico del MTT, es decir el rango en el que la absorbancia del MTT es proporcional al número de células presentes en el cultivo celular, que en nuestro trabajo corres-

pondió a las absorbancias de 0,5 a 2,8, presentando su aproximación lineal una buena correlación ( $r=0,996$ ). El amplio rango que abarca el ajuste lineal implica una sensibilidad alta del ensayo MTT para la línea celular MARC-145. La cinética de crecimiento establecida por las curvas de crecimiento del ensayo colorimétrico con MTT, evidenció que a densidades iniciales elevadas ( $> 200.000$  células/cm<sup>2</sup>) se alcanzaba la confluencia en las primeras 24h, mientras que en densidades menores como 12.500 y 6.250 células/cm<sup>2</sup>, se llegaba a ella a las 96h y a las 120h respectivamente. Posteriormente, en base a las curvas de crecimiento, se evaluó cuál era el momento más adecuado para realizar las infecciones, sirviendo las curvas para determinar que densidad inicial era la ideal para alcanzar la confluencia deseada en el momento de la inoculación del patógeno, establecida en el diseño experimental a las 48h. Finalmente, en el diseño del experimento de optimización de la infección de la línea MARC-145 con *Neospora caninum*, se contemplaron tres variables: el momento de la infección, la dosis y la duración de la infección experimental. El momento de infección se asoció al grado de confluencia celular ideal en el momento de la inoculación del patógeno, siendo lo más habitual el uso de cultivos con la monocapa confluyente. Para el diseño experimental se escogieron tres momentos de infección, representados por cultivos en monocapas a un 10-20%, 40-50% y 90-100% de confluencia. Para determinar la dosis de infección se ensayaron tres razones de infección (1:2, 1:1 y 1:0,5). Por último la duración de la infección se estableció en 3 y 4 días post infección.

**Palabras clave:** *Neospora caninum*; MARC-145; cultivo celular; infección *in vitro*.

## ABSTRACT

Neosporosis is one of the parasitic diseases linked to abortion which globally causes bigger economic losses in the bovine livestock sector. Its etiological agent, *Neospora caninum*, presents high seroprevalence rates in this sector. Despite being a new parasitic disease, there are a high number of associated studies, because there is mainly a lack of treatments and effective vaccines, and a limited knowledge about its invasion and proliferation mechanisms at a molecular level. For this reason, the study of *Neospora caninum* on the MARC-145 cellular line, considered the most appropriate because of its resistance to the parasite, is essential to carry out a great variety of tests. The main objective of this study consists on an experimental design in order to optimise this infection in our laboratory. Firstly, the characterisation and optimisation of the *in vitro* culture of the MARC-145 cellular line in DMEM medium was carried out. Subsequently, the experimental design of its infection with *Neospora caninum* was set out. A test to select the most appropriate concentration of bovine foetal serum was made, since the bibliography supports 10% concentration, but there is not any evidence of the proper functioning at 2%. The results evidenced that there was not any significant difference between both concentrations ( $p=0,58 >0,05$ ). However, the 10% bovine foetal serum line was maintained in order that results were comparable to other similar studies. Once the percentage of bovine foetal serum was established, the most suitable cellular density was determined for the subculture. The 6.000 cells/cm<sup>2</sup> sowing density gave the best proliferation rate regarding time. Finally, we could conclude that, in order to maintain the MARC-145 cellular line under the conditions of the Tissue Culture Service of Murcia University, the initial concentration which should be used was 6.000 cells/cm<sup>2</sup> in Eagle medium modified by Dulbecco (DMEM), enriched by bovine foetal serum at 10%, glutamine at 3,5 mM, penicillin at 100 UI/mL and streptomycin at 100 µg/mL; which is incubated at 37°C, with a 90% relative humidity and a 5-9% CO<sub>2</sub> concentration. Under these conditions, subculture is established every 4 days, allowing a great working routine. With the goal of establishing the growth kinetics of the MARC-145 cellular, the colorimetric method with 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazol bromide (MTT) was used. The calibration curve was initially done, which was used to assess the sensitivity limits of the colorimetric assay of the MTT. That is to say, the range in which MTT absorbance is proportional to the number of cells present in the cellular culture. In our study, this range was established between 0,5 and 2,8 absorbance, which presents a good correlation ( $r=0,996$ ) in its linear approximation. The wide range that encompasses the lineal adjustment implies a high sensitivity of the MTT assay for the MARC-145 cellular line. The kinetics established by the MTT colorimetric assay growth curves showed that in high initial densities ( $> 200.000$  cells/cm<sup>2</sup>) the convergence was reached in the first 24h. Nevertheless, the convergence was reached in lower densities, such as 12.500 and 6.250 cells/cm<sup>2</sup>, in 96h and 120h, respectively. Then, based on the growth curves,

the adequate time of infection was assessed. Thus, the curves were used to determine the ideal initial density to achieve the desired convergence at the moment of the pathogenic inoculation, which was established at 48h in the experimental design. Finally, three variables (the time, dose and duration of the experimental infection) were taken into account in the design of the optimisation experiment for the MARC-145 cellular line's infection with *Neospora caninum*. The time of infection was connected to the degree of ideal cellular convergence when the pathogen is inoculated. Hence, confluent monolayer is the most common use for cultures. Three times of infection were chosen in the experimental design, represented by cultures in monolayers at 10-20%, 40-50% and 90-100% of convergence. The dose of infection was set regarding the assay of three infection reasons (1:2, 1:1 and 1:0,5). Finally, the duration of the infection was established in 3 and 4 days post infection.

**Key words:** *Neospora caninum*; MARC-145; cell culture; *in vitro* infection.



## ESTUDIO DE PROPIEDADES TECNOLÓGICAS EN YOGURT ELABORADO CON EXTRACTOS DE GRANADA

Alcaraz, A.; Álvarez, D.; López, M.B.

\***Autor para correspondencia:** Daniel Álvarez. Email: dalvarez@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

### RESUMEN

El yogurt es una de las leches fermentadas más consumidas en el mundo por sus propiedades nutricionales, funcionales y sensoriales, por lo que la calidad final del producto será de gran importancia para satisfacer las necesidades del consumidor y obtener un posicionamiento destacado en el mercado. En este estudio se evaluó el efecto de la aplicación de diferentes concentrados de extracto de granada (10%, 20% y 30%) sobre el pH, color, viscosidad, sinéresis, contenido de vitamina C y compuestos fenólicos de yogures elaborados con leche de vaca, comparados con un yogurt patrón elaborado sin extractos. Los resultados se obtuvieron utilizando los métodos de análisis adecuados para cada parámetro. El procesado estadístico de los datos se realizó mediante el uso del paquete informático Statistix 8.0, para establecer un estudio diferencial de medias (ANOVA). Los resultados obtenidos permitieron observar que los yogures elaborados con extracto de granada presentaron una coloración distinta a la de los yogures patrón, teniendo éstos una coloración más amarillenta. El contenido de vitamina C es mayor ( $P < 0,05$ ) en yogures en los que se les ha añadido extracto de granada que en yogures que no lo contienen y existe una tendencia clara a aumentar el contenido de compuesto fenólicos a mayor concentración de extracto. Esto nos demuestra que los yogures enriquecidos con extracto de granada tienen mayor capacidad antioxidante y, en consecuencia, mayores beneficios para la salud, que los yogures control. Se evaluaron diferentes parámetros sensoriales (agrado general, aceptación en olor y sabor) tanto en los yogures control como en aquellos elaborados con distintas concentraciones de extracto de granada (10%, 20% y 30%) por panelistas sensoriales entrenados. Se pudo comprobar que no existen casi diferencias en las características organolépticas entre el yogurt control y los yogures que contienen extracto, resultado positivo porque será bien aceptado por el consumidor. La muestra de mayor agrado global es el yogurt con una concentración de granada al 30%, que en promedio alcanzó un valor de 6,58 en una escala hedónica. Se puede concluir que el extracto de granada es un subproducto alimenticio innovador y aprovechable para combinar con el yogurt, obteniendo alternativas válidas e interesantes para aplicar en la industria alimentaria, reportar beneficios para la salud y ser aceptados por el consumidor.

**Palabras clave:** Yogurt, extracto de granada, compuestos fenólicos, sinéresis, vitamina C.

## ABSTRACT

Yogurt is one of the most consumed fermented in the world for its nutritional, functional and sensorial properties, so the final quality of the product will be of great importance to satisfy the needs of the consumer and obtain a prominent position in the market. The natural extract of pomegranate (Nutragranate®) is composed of punicalagins  $\alpha + \beta$  at 27.9%, total polyphenols at 88.7% and a small percentage of ellagic acid. It has been shown in scientific studies that this extract has important anti-inflammatory, antibacterial properties and a high antioxidant capacity that slows down the aging, even has been discovered that can help to slow down cancer of prostate and breast. Because of its many health benefits, there is a greater tendency to use these antioxidant products and their addiction to other foods such as yogurt. In this study the effect of the application of different pomegranate extract concentrates (10%, 20% and 30%) on pH, color, viscosity, syneresis, vitamin C content and phenolic compounds of yogurts made from milk of Cow, compared to a patterned yogurt made without extracts. The results were obtained using the appropriate analysis methods for each parameter. Statistical processing of the data was performed using the Statistix 8.0 software package to establish a mean differential study (ANOVA). The results obtained showed that the yogurts made with pomegranate extract had a different color than the standard yogurts, which had a more yellowish coloration. Vitamin C content is higher ( $P < 0.05$ ) in yogurts in which pomegranate extract has been added than in yogurt that does not contain it and there is a clear tendency to increase the phenolic compound content at higher concentration of extract. This demonstrates that the yogurts enriched with pomegranate extract have a greater antioxidant capacity and, consequently, greater health benefits than the control yogurts. Different sensory parameters (general gratification, acceptance in odor and taste) were evaluated in both control yogurts and those elaborated with different concentrations of pomegranate extract (10%, 20% and 30%) by trained sensorial panelists. It was verified that there are almost no differences in organoleptic characteristics between control yogurt and yogurt containing extract, a positive result because it will be well accepted by the consumer. The most popular sample is yogurt with a 30% pomegranate concentration, which on average reached a value of 6.58 on a hedonic scale. It can be concluded that pomegranate extract is an innovative and useful food byproduct to combine with yogurt, obtaining valid and interesting alternatives to apply in the food industry, to report health benefits and to be accepted by the consumer.

**Key words:** Yogurt, extract of pomegranate, phenolic compounds, syneresis, vitamin C.



## ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN FERMENTATIVA Y NUTRITIVA DEL ENSILADO DE BRÓCOLI (*BRASSICA OLERACEA L., VAR. ITÁLICA*) CON PAJA DE CEBADA

Cánovas-Arenas, F.J., Megías-Rivas, M.D.\*, Martínez-Teruel, A.

\***Autor de correspondencia:** María Dolores Megías. Email: mdmegias@um.es Departamento de Producción Animal. Campus de Espinardo. Universidad de Murcia. 30100 Murcia. España. Tel: 34 868884748 Fax: 34 868884147

### RESUMEN

La superficie cultivada de brócoli está sufriendo un gran aumento en el sudeste de España, lo que genera un incremento en la gran cantidad de subproducto, ya sea en el campo o en la industria como resultado de las diferentes presentaciones y/o transformaciones del producto. La acumulación de esto subproductos provocan gran cantidad de biomasa lo que genera un grave problema medioambiental. El objetivo de este estudio es conocer la capacidad del ensilaje como método de conservación del subproducto de brócoli cuando se realizan diferentes tratamientos. Se ha estudiado la evolución de indicadores fermentativos y químico-nutritivos durante 28 días de ensilaje en el subproducto agroindustrial de brócoli crudo (*Brassica oleracea L. var. Itálica*) realizándose tres réplicas de los siguientes tratamientos: brócoli (100%) (B); brócoli más paja de cebada (75+25%) (BP); brócoli más ClNa (97,5+2,5%) (BS) y brócoli más paja de cebada más subproducto de mandarina (70+20+10%) (BM), ajustándose a 600g de peso final y sellándose al vacío. Todas las muestras fueron almacenadas durante 28 días a una temperatura de 9°C. Los resultados obtenidos en los distintos lotes mostraron que los parámetros organolépticos no presentaron diferencias significativas. Para los carbohidratos solubles en agua encontramos diferencias significativas entre los tratamientos B y BP ( $P<0,01$ ) y en las de BM y BS ( $P<0,05$ ). El ácido láctico presentó un nivel de significación ( $P<0,05$ ) en el que despunta el alto contenido del lote B y el bajo contenido en el BM. En cuanto a los ácidos grasos volátiles encontramos diferencias significativas ( $P<0,05$ ), siendo interesante destacar la baja producción de ácido acético en el lote B. La proteína bruta arroja unas diferencias significativamente más elevadas entre las muestras B y BM con las muestras BP y BS ( $P<0,01$ ). De los resultados obtenidos se puede afirmar que todos los lotes del subproducto de brócoli pueden ser considerados aptos para el ensilado, pero los tratamientos con paja (BP y BM) presentaron una mejor la capacidad de retención del agua, eliminando los efluentes, por los que son una mejor opción para controlar el impacto al medio ambiente.

**Palabras clave:** brócoli, *Brassica oleracea*, ensilado, fermentación, subproducto, paja.

## ABSTRACT

A great increase of the broccoli arable area is happening in the Southeast of Spain, which generates an increase in the large quantity of by-product, either in the field or in the industry, as a result of the different presentations and/or transformations of the product. The accumulation of these by-products causes a large amount of biomass, which generates serious environmental problems. The objective of this study is to know the capacity of silage as a method of conservation of the broccoli by-product when different treatments are carried out. The evolution of fermentative and chemical-nutritive indicators has been studied during 28 days of silage in the agroindustrial by-product of raw broccoli (*Brassica oleracea L. var. Itálica*). Three replications of the following treatments were made: broccoli (100%) (B); broccoli plus barley straw (75 + 25%) (BP); broccoli plus ClNa (97.5 + 2.5%) (BS) and broccoli plus barley straw plus mandarin byproduct (70 + 20 + 10%) (BM) Adjusting to 600g of final weight and sealing *in vacuum*. All samples were stored for 28 days at temperature of 9 ° C. The results obtained in the different batches showed that the organoleptic parameters did not show significant differences. For water-soluble carbohydrates we found significant differences between treatments B and BP ( $P < 0.01$ ) and those of BM and BS ( $P < 0.05$ ). The lactic acid presented a level of significance ( $P < 0.05$ ) in which the high content of lot B and the low content of BM stand out. Regarding volatile fatty acids, we found significant differences ( $P < 0.05$ ), being interesting to note the low production of acetic acid in lot B. Crude protein shows significantly higher differences between samples B and BM with samples BP and BS ( $P < 0.01$ ). The results obtained show that all the lots of the broccoli by-product can be considered suitable for silage, but straw treatments (BP and BM) presented a better water retention capacity, eliminating the effluents, for which they are better option to control the impact on the environment.

**Key words:** broccoli, *Brassica oleracea*, silage, fermentation, by-product, straw.

## EFECTO DE LA INTENSIFICACIÓN DE ORDEÑO SOBRE EL ESTATUS NUTRICIONAL DE NOVILLAS ALIMENTADAS CON RACIONES UNIFEED

Cazorla, M.; Martínez, S.\*

\***Autor para correspondencia:** Silvia Martínez. Email: silviamm@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34868884934

### RESUMEN

Recientemente, se ha mostrado un gran interés por aumentar el número de ordeños diarios de las vacas en sistemas de explotación intensiva como herramienta para maximizar la producción lechera, ya que está descrito un aumento de producción debido a la intensificación del número de ordeños diarios. Este aumento de producción irá acompañado de nuevas necesidades y posibles consecuencias sobre el metabolismo animal. Sin embargo, las repercusiones que esta intensificación puede conllevar más allá de la producción de leche no son conocidas. Por eso surge la necesidad de evaluar el impacto de un aumento del número de ordeños sobre el balance energético del animal. En este estudio estudiamos la concentración de leptina sérica y el consumo de materia seca (CMS) a lo largo de toda la lactación en 95 novillas lecheras de alto rendimiento mantenidas bajo dos ritmos de ordeño: un grupo sometido al ritmo de ordeño habitual de la explotación, tres veces al día toda la lactación (3X, n=49), y otro grupo sometido a un ritmo intensificado, cuatro veces al día durante los primeros 42 días de lactación para a continuación, pasar a ser ordeñadas tres veces al día (4X, n=46). Los días 0, 10, 21, 42, 72, 102, 162 y 300 de lactación fue obtenida una muestra de sangre de 9 vacas de cada grupo para determinar la concentración de leptina sérica. Para ello se utilizó un kit multiespecie comercial de radioinmunoanálisis. Para la estimación de la ingestión de materia seca se consideró la cantidad diaria de ración ofrecida y rehusada, el número de vacas presentes en cada parque y el número de días en leche de cada una de ellas. Los resultados mostraron que el incremento de un cuarto ordeño no afectó significativamente a los niveles de leptina sérica, a pesar de que la concentración de leptina fue numéricamente menor en las vacas 4X. Además, no observamos diferencias significativas ( $P>0,05$ ) en el CMS entre los dos grupos durante los primeros 100 días de estudio. Esto contrasta con el resto de la lactación, donde el CMS en el grupo 4X fue mayor que el grupo 3X ( $P<0,001$ ), lo que nos lleva a suponer la existencia de una limitación física de la ingesta durante el primer tercio de lactación. Por último, hayamos una alta correlación positiva ( $r^2=0,85$ ) entre los niveles de leptina y el CMS. Por lo tanto, concluimos que, el aumento de un cuarto ordeño produjo un aumento de ingestión en los dos tercios finales de lactación, además, el CMS parece influir en la concentración de leptina sérica, mostrando una correlación positiva, que, al principio de la lactación, esta correlación podría ser permitida por una reducción de la insulinoresistencia cuya existencia era anteriormente presumida en todas las vacas lecheras de alto rendimiento.

**Palabras claves:** ordeño, leptina, consumo de materia seca, vaca de leche

## ABSTRACT

As of lately, the dairy industry and many research groups have turned their focus to increasing the number of daily milking as a method used to maximize production in high yielding dairy cows. In our study, we chose to compare cows milked at what is considered a standard frequency in the industry, three times daily, with cows milked at the more intensive rate of four daily milking. The first group was milked three times daily during the whole lactation (3X) whereas the second group was only milked four times daily during the first 42 days in milk (DIM), followed by three daily milking for the remainder of lactation (4X). It has been demonstrated that an increase in milking frequency results in increased production, therefore we hypothesized the cows in the 4X group would have greater energy requirements than their 3X counterparts. Throughout the course of a full lactation, our research group measured and compared serum leptin concentrations and dry matter intake (DMI) in order to assess the impacts of intensified milking on energy balance in the study population. Furthermore, the correlation between leptin concentration and DMI was also explored. The study was conducted for the duration a full lactation on ninety-five Holstein-Friesian high yielding dairy cow on a dairy farm in Murcia, Spain. Calving took place in winter over three months and the cows were sequentially allocated to either the control group (3X, n=49) or the intensive milking group (4X, n= 46). Cows were fed ad libitum with total mixed ration twice daily and housed in yards, grouped by treatment lot. Leptin serum concentrations were obtained from nine cows in each group for 0, 10, 21, 42, 72, 102, 162 and 300 and were measured with a multispecies leptin RIA kit. DMI was estimated by obtaining feed intake of each lot and dividing it by the mean DIM of the lot. The first part of this paper analysed and compared the serum levels in both the 3X and 4X groups. To begin, when leptin serum levels were compared in the two treatment groups throughout lactation, no significant differences were observed in the hormone's concentration ( $P>0,05$ ). Nonetheless, without being significant, 3X cows maintained numerically higher leptin concentrations than the 4X group during practically the whole study period. This indicates that 3X cows could be maintaining a less negative energy balance during lactation than the 4X cows, which can be assumed to be due to lesser milk production in the 3X cows (unpublished data from our research group). With regards to DMI, three separate periods were analysed for significant differences: first third of lactation, second + last third of lactation, and lactation as a whole. There were no significant differences in DMI between the two groups during the first third of lactation ( $P>0,05$ ). In comparison, there were strong statistical differences between DMI after the first third of lactation ( $P<0,001$ ) as cows in the 4X group had a higher DMI than the 3X group. We propose that this notable difference in feed intake could be explained by the fact that, after the first third of lactation, dairy cows can adjust intake to match the metabolic requirements imposed by needs such as milk production and maintaining body condition score, as the cows have already surpassed peak yield. Finally, when comparing the evolution of DMI and leptin through lactation in each group separately, a high correlation between the two parameters becomes apparent ( $r^2= 0,85$  for both 3X and 4X groups). In early lactation, leptin concentrations drop as a result of insulin resistance or, more specifically because of an absence of glucose metabolism in adipocytes. Thus, we hypothesize that a reduction in insulin resistance in our cows could cause leptin concentrations to rise prematurely in early lactation and would allow its concentration to vary with the amount of ingested feed. We recommend evaluating insulin resistance in these cows in further research. In brief, we found no significant differences in serum leptin concentrations between the 3X and 4X groups. Serum leptin increased rapidly in postpartum in both groups and was maintained at a steady concentration throughout the rest of lactation. Furthermore, we found no significant differences in DMI during the first third of lactation due to the reduced ruminal capacity, occurring post-partum, which physically limits feed intake, however, cows in which milking was intensified ingested more feed than 3X cows during the rest of lactation. Finally, we found a high correlation between leptin levels and DMI during all of lactation. The high correlation between these parameters in early lactation could be due to an decreased insulin-resistance in our cows.

**Keywords:** milking, leptin, dry matter intake, dairy cow.

## ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE MICROSPORIDIOS EN EL COLMENAR DEL CAMPUS DE ESPINARDO MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Del Pino, V.; Serrano, J.; De la Rúa, P.

\***Autor para correspondencia:** Pilar De la Rúa. Email: pdelarua@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34 868 884908

### RESUMEN

Las poblaciones de abejas se encuentran en declive al nivel mundial desde las últimas décadas, siendo varios los factores que conllevan a ello. Este estudio se ha centrado en la detección de los microsporidios patógenos *Nosema ceranae* y *Nosema apis*, cuya presencia en las colmenas se ha relacionado con la disminución mundial del censo de abejas. Para el estudio se han seleccionado seis colmenas situadas en el Campus de Espinardo de la Universidad de Murcia, consideradas como representativas del estado general de salud del apiario. La detección de los patógenos se realizó mediante amplificación por PCR de dos fragmentos del ADN mitocondrial de dichos patógenos y la caracterización del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa. Los resultados indicaron que *N. ceranae* se halla en todas las colmenas, mientras que *N. apis* se halló también (infección mixta) en tres de ellas, es decir, que este último patógeno se halla con una frecuencia claramente inferior a la de *N. ceranae*. Estos datos son similares a los descritos de colmenares de otras zonas de España, y por ello vienen a corroborar la prevalencia elevada de dichos patógenos a escala peninsular.

**Palabras clave:** apicultura, declive, patógenos, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Apis mellifera iberiensis*

### ABSTRACT

Honey bee populations have been worldwide declining since the last decades. The decline supposes a direct impact on pollination, since honey bees carry out the pollination service for more than 60% of the plants. This decline involves several factors affecting pollinators in general, and honey bees in particular, such as land use, contamination by heavy metals, excess of pesticides, introduction of foreign plants and foreign pollinators into natural habitats, and management intensity among others. One of the most determining factors involved in this decline are pathogens, namely different bacteria, the mite *Varroa destructor* and its associated viruses, and microsporidia of the genus *Nosema*. *Nosema* is a microscopidium that parasites the epithelial cells of the ventricle of worker, drones, and queen honey bees. The transmission of the pathogen is carried out by orofecal route through the propagation of spores. Once inside the cells, it takes place the destruction of them

and the infection of other honey bees nearby. At the individual level, this causes a symptomatology ranging from the general weakness of honey bees to the death of them, insects with inflated abdomen, inability to fly, tremors and paralysis; sometimes the nosemosis is not symptomatic. At the colony level, *Nosema* infection causes an increase in the mortality of the forager honey bees and a premature forage activity of younger honey bees, causing a reduction in the life expectancy of the colony and ending, ultimately, with the collapse of the colony. Two species of *Nosema* infect honey bees: *N. apis* and *N. ceranae*, being this last more virulent. Both pathogens also differ in the optimal temperature for their development: while *N. apis* develops at moderate temperature, *N. ceranae* prefers warmer temperature. This means that in Spain, the prevalence of *N. ceranae* is greater than that of *N. apis* and, therefore, honey bees in Spain are seriously affected by this microsporidium. In this study, it was tested whether the type of hive (Layens or Perfection) influences the prevalence of both *Nosema* species. Layens hives are composed of 12 frames in which the brood is usually laid in the central ones. In Perfection hives there may be several suppers, and the brood is laid in bottom ones whereas honey is stored in upper ones. A higher prevalence of *Nosema* in Layens hives was expected as there is no physical separation between frames, and inner and forager honey bees share the same space and consequently, are more in contact with the pathogen. In addition, we expected a higher incidence of *N. ceranae* due to the warm climate in Murcia. To perform this study, a total of 300 worker honey bees from six beehives located at the Campus of Espinardo of the University of Murcia were analysed. Of these six hives, three of them are of type Layens and the other three of type Perfection. In turn, the distinction was made between honey bees from the outer and the inner frames. The samples were maintained in ethanol and at a temperature of -20 °C until their analysis. DNA extractions were performed from the individual midguts where the microsporidia are located. A triplex PCR was then performed for the amplification of the DNA fragments of the microsporidia and the honey bee using the following primers: APIS-F and APIS-R amplifying DNA of *N. apis*, MITOC-F and MITOC-R that amplify the DNA of *N. ceranae* and COI-F and COI-R that amplify the DNA of *Apis mellifera*. PCR products were then characterized by gel electrophoresis, using positive and negative controls for a clear interpretation of the results. Presence of an electrophoretic band corresponding to the positive control of each *Nosema* species in one individual worker honey bee was scored as presence of the pathogen in the colony. Results suggested a lack of a marked pattern of *Nosema* incidence, as in some colonies a higher prevalence of *Nosema* was found in honey bees from the interior frames, while in other colonies the prevalence of *Nosema* was higher in those located in the exterior frames (forager honey bees). The same occurred when comparing the type of hive since some colonies in Perfection hives had higher *Nosema* prevalence, while other colonies in Layens hives had a higher prevalence. In coincidence with previous studies, a higher prevalence of *N. ceranae* versus *N. apis* or mixed infection was observed. This situation can be explained according to the cycle of activity of the honey bees throughout the year, in which two stages are distinguished: the hibernation from autumn to the beginning of spring, and the beekeeping season throughout spring and early summer. The collection of samples was carried out in February, when the colonies are right starting the new season after the hibernation. During hibernation, honey bees reduce their activity and focus on maintaining the colony temperature by grouping together forming a large compact ball. Probably this is the reason why inner and foraging honey bees in this study did not show a different pattern of *Nosema* prevalence, and the same could be applied to explain why there is no distinction between the colonies inhabiting Layens or Perfection hives. Finally, the presence of *N. apis* has been lower than expected, as only co-infection with *N. ceranae* was observed. This is due to the seasonal nature of *N. apis*, since favorable conditions for *N. apis* are reached in spring and autumn and this study was carried out at the end of winter.

**Key words:** beekeeping, decline, pathogens, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Apis mellifera iberiensis*.

## EVALUACIÓN DE DOS TÉCNICAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO ANTE-MORTEM DE LA TUBERCULOSIS CAPRINA.

De Los Santos, L.; Buendía, A.J\*.; Navarro, J.A.

\***Autor para correspondencia:** Antonio J. Buendía. [abuendia@um.es](mailto:abuendia@um.es). Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

### RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa de curso crónico, provocada por bacilos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enfermedad puede afectar a varios hospedadores entre los que se encuentran el hombre y los animales domésticos; en bóvidos y caprino, las principales especies que provocan la enfermedad son *M. bovis* y *M. caprae*, respectivamente. La principal vía de entrada de los bacilos tuberculosos es la vía aerógena, por lo que el pulmón es el primer órgano afectado normalmente. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en los órganos afectados, y en los estadios finales puede observarse una sintomatología inespecífica con la aparición de tos, fiebre, pérdida de peso y letargia. La tuberculosis bovina está sujeta a un programa de erradicación (RD 2611/1996 y Directiva 64/432/CEE) que incluye la realización de pruebas diagnósticas en las explotaciones españolas para la detección precoz de los rebaños infectados. Este programa contempla el sacrificio de los animales positivos a las pruebas diagnósticas y su correspondiente indemnización, estando prohibidos los tratamientos y las vacunas profilácticas. La tuberculosis caprina no está sometida a un programa de erradicación, pero deben acogerse a él animales que convivan con ganado vacuno, pasten junto al mismo o aprovechen sus pastos. En algunas comunidades autónomas sí existe un programa de erradicación de tuberculosis caprina. La enfermedad comienza con la aparición de un complejo primario (CP), que es un granuloma que puede asentarse en el órgano afectado y también en el nódulo linfático regional. En este tipo de lesión predomina la respuesta inmune celular, con la producción de citoquinas pro-inflamatorias que promueven la respuesta inflamatoria. En este estadio son eficaces para el diagnóstico de la infección las pruebas diagnósticas de base celular como la intradermotuberculinización o el interferón- $\gamma$ . La tuberculosis orgánica crónica (TOC) se instaura posteriormente y se caracteriza por la diseminación del agente por el órgano afectado con patrones lesionales variados. En este estadio disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias y comienza una respuesta inmune de base humoral con producción de anticuerpos. Las pruebas de base celular no suelen detectar animales en este estadio y por ello se debe recurrir a pruebas de base humoral como la técnica ELISA. Uno de los principales problemas que presenta la erradicación de la tuberculosis es la reducida sensibilidad que presentan las técnicas diagnósticas, por lo que se trabaja constantemente en el desarrollo de nuevas pruebas que resuelvan este problema. Este estudio pretende valorar la utilidad de dos técnicas diagnósticas de base humoral en el diagnóstico de la tuberculosis; por un lado una técnica ELISA INGEZIM

TUBERCULOSIS DR comercializada recientemente por el laboratorio Ingenasa y por otro lado una prueba de inmunodifusión, INGEZIM TB-CROM Ab, diseñada por el mismo laboratorio y aún en estado de desarrollo. Se estudiaron un total de 110 sueros de la especie caprina, de los cuales 60 sueros eran de animales con diagnóstico de tuberculosis confirmado por la presencia de lesiones compatibles tras la necropsia y la visualización del agente en tinciones de Ziehl-Neelsen, y otros 50 procedían de animales de explotaciones oficialmente indemnes de la enfermedad (T3) estando la mitad de éstos vacunados contra paratuberculosis. La técnica INGEZIM TB-CROM Ab arrojó unos resultados de sensibilidad elevados, del 86,6%, mientras que la especificidad calculada fue más baja, del 46%. La técnica ELISA INGEZIM TUBERCULOSIS DR mostró mejores resultados, con un valor de sensibilidad del 88,3% y de especificidad del 84%, que no parecieron mostrar variaciones según el tipo de lesión. Los animales vacunados no influyeron en los valores de especificidad, si bien la densidad óptica sus sueros fue ligeramente superior. La baja especificidad mostrada por la nueva técnica serológica supone una importante limitación para su uso, y por ello no cumple los objetivos planteados en este trabajo.

**Palabras clave:** Cabra, Tuberculosis, Diagnóstico, Serología.

## ABSTRACT

Tuberculosis is a chronic infectious and highly contagious disease caused by bacillus from the *Mycobacterium tuberculosis* complex. This disease can affect many hosts including humans and domestic animals; the main species that produce the disease in cattle and goat are *M. bovis* and *M. caprae*, respectively. The main entrance way for the tubercle bacillus is the aerial route, so the lung is usually the first organ to be affected. This disease is characterized by the formation of granulomatous lesions in affected organs, and a nonspecific symptomatology can be observed in final stages with cough, fever, weight loss and lethargy. Bovine tuberculosis is handled to a eradication program (RD 2611/1996 and Directive 64/432/CEE) which includes the realization of diagnostic tests in the spanish exploitations for an early detection of infected herds. This program contemplates the sacrifice of positive animals to diagnostic tests and the corresponding compensation, while treatments and prophylactic vaccines are forbidden. Caprine tuberculosis isn't handled to a eradication program, but animals that coexist or pasture with cattle, or embrace their pastures must be included in the program. A caprine tuberculosis eradication program exists in some autonomous communities. The disease begins with the appearance of a primary complex (PC) which is a granuloma that can settled in the affected organ or in the regional lymphatic nodule too. In this kind of lesion the cellular immune response predominates with the production of pro-inflammatory cytokines that promote the inflammatory response. Cell based tests such as IDTC or IFN- $\gamma$  are effective to diagnosticate the infection in this stage. Chronic organic tuberculosis (COT) is established later and it is characterized by the dissemination of the agent to different organs showing diverse lesional patterns. Pro-inflammatory cytokine production ceases in this stage and a humoral based immune response begins, that ends up provoking a cellular anergy or lack of cell response. Cell based tests can't usually detect animals in this stage and humoral based tests like ELISA technique may be used. One of the main problems that tuberculosis eradication presents is the reduced specificity that diagnostic tests show, hence they are constantly working in the development of new tests which can resolve this problem. This study tries to value the usefulness of a new humoral based test designed by Ingenasa Lab and still in developmental status, INGEZIM TB-CROM Ab, in order to confirm or discard its utility in tuberculosis diagnosis. A total of 110 serums were studied, of which 60 serums proceeded from infected animals and the other 50 belonged to healthy animals, all of them from caprine animals. Serums from positive animals were confirmed through finding macroscopic and microscopic lesions after the their necropsy and agent visualization in Ziehl-Neelsen stains, whereas that not infected animals came from exploitations with sanitary qualification of T3. A half of the negative animals was vaccinated against paratuberculosis. Results are given in sensitivity and specificity values. INGEZIM TB-CROM Ab technique showed high sensitivity results, 86,6%, while the calculated specificity value was lower, 46%. This low specificity involve a strong limitation of this technique and this is why it doesn't reach the proposed goal in this study. Nonetheless, the low specificity doesn't seem to act at random and all negative results given by ELISA technique were negative results in INGEZIM TB-CROM Ab, and by the other hand all negative results in the mentioned test were all negative in ELISA test. ELISA technique yielded



best results, with a sensitivity value of 88,3% and a specificity value of 84%. Also this test wasn't be influenced by the kind of lesions animals showed, and no matter the lesions they had ELISA technique was able to detect a high percentage of the positive animals' serums. None of the two techniques was affected by the vaccination of the animals although optical densities of these serums was slightly higher than the rest, but they were still ELISA negative. By the other hand correlation between both techniques was calculated by Pearson Chi-squared test and yielded a value of 0,489. This value means that both techniques are moderately correlated between them. This fact explains why each technique shares negative results in specificity assay.

**Key words:** Goat, Tuberculosis, Serology, Diagnosis.



## **DETERMINACIÓN DE AMILOIDE A SÉRICO Y HAPTOGLOBINA EN EL LÍQUIDO SINOVIAL DE LA ARTICULACIÓN METACARPO /METATARSOFALANGIANA EN CABALLOS SANOS Y CON OSTEOARTRITIS**

**Fenoll, P.; Ayala, I.\*; Rodríguez, M.J.**

**\*Autor para correspondencia:** Ignacio Ayala de la Peña. Email:iayape@um.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

### **RESUMEN**

La articulación metacarpo/metatarsofalangiana (AMC/MTF) es la articulación de mayor movilidad de todas las existentes en el caballo, puesto que se mueve en un rango desde los 120° de flexión hasta los 120° de extensión. Ese gran rango de movimiento y su biomecánica convierten a dicha articulación en una región especialmente susceptible a padecer lesiones de tipo degenerativo como la osteoartritis (OA), debido a las grandes cargas y tensiones a las que son sometidos sus componentes anatómicos. La OA es una patología articular que se caracteriza por la degeneración del cartílago, acompañada por cambios en los tejidos blandos y en el hueso subcondral como son la esclerosis subcondral, la formación de osteofitos marginales, sinovitis, erosión y degeneración del cartílago que en estados muy avanzados se visualiza radiológicamente con la disminución del espacio articular. Una vez dañado el cartílago articular, por sus características fisiológicas y bioquímicas, la regeneración es imposible y la reparación es lenta y difícil, por lo que resulta fundamental una detección precoz de la enfermedad. Los animales con OA presentan signos clínicos como cojera, disminución del rango de movimiento, efusión sinovial y por tanto una disminución del rendimiento deportivo. El diagnóstico se realiza comúnmente mediante anestias perineurales e intra-articulares, radiografía y ecografía. La tomografía computerizada (TC) y la imagen por resonancia magnética (IMR) son excelentes métodos diagnósticos pero en ocasiones menos utilizados por no estar al alcance de todos los profesionales. Sin embargo, para realizar detecciones precoces es necesario recurrir a estos métodos de diagnóstico por imagen más sofisticados, pues estadios tempranos de la enfermedad como la OA temprana no pueden ser diagnosticados por los métodos tradicionales. Siguiendo esta línea de investigación de detección temprana de la OA, son numerosos los estudios que se centran en la búsqueda de biomarcadores de patología articular a nivel sistémico (suero) o local (líquido sinovial) que permitan un diagnóstico rápido, temprano y fiable de la patología. Estos biomarcadores son moléculas que son productos normales y subproductos de los procesos metabólicos, entre otros, del sistema musculoesquelético, que se liberan tanto en el caso de reparación fisiológica inducida por el ejercicio o de lesión del mismo. Las proteínas de fase aguda (PFA) son proteínas plasmáticas que tienen como principal característica que varían su concentración plasmática en respuesta al estímulo de ciertas citoquinas producidas

durante diferentes tipos de procesos inflamatorios en los cuales hay implicado algún grado de daño tisular, por lo que han sido muy estudiadas en los últimos años. Las PFAs son altamente sensibles lo que permite detectar lesiones o alteraciones en los primeros estadios, y su conocimiento resulta muy útil a nivel clínico ya que las convierte en potenciales biomarcadores de enfermedad. El Amiloide A Sérico (AAS) y la Haptoglobina (Hp) son dos PFAs que recientemente han sido localizadas y medidas en el líquido sinovial de articulaciones equinas con OA. Sin embargo, los estudios que miden estas proteínas y que establecen rangos de concentración para dicha patología en caballos son escasos y con resultados contradictorios. Objetivos: determinar la variación del valor de proteínas totales (PT), AAS y Hp en el líquido sinovial de la articulación MC/MTF de caballos sanos y con OA, así como establecer un rango de concentración de AAS y de Hp en el líquido sinovial de la articulación MC/MTF que sea indicativa de OA. Hipótesis: las concentraciones tanto de PT como de AAS y de Hp serán superiores en el grupo de articulaciones con OA en comparación con el grupo de articulaciones sanas. Material y métodos: estudio clínico prospectivo con dos grupos de animales. En el grupo 1 o grupo control se incluyeron 2 caballos sanos de los que se obtuvieron 5 muestras de líquido sinovial. Estos animales no presentaban patologías asociadas al sistema musculoesquelético. En el grupo 2 se incluyeron 6 animales diagnosticados con OA de cualquiera de las articulaciones estudiadas. Finalmente, con el fin de comprobar la sensibilidad de los métodos utilizados para la medición de las PFAs en el líquido sinovial, se utilizó una muestra procedente de una articulación interfalangiana distal con artritis séptica. Las muestras se mediante la punción del receso dorsal lateral o del receso palmaroproximal lateral. Todas ellas se conservaron en tubos de heparina en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , correctamente identificadas y cerradas. Las concentraciones de AAS se determinaron mediante un inmunoensayo turbidimétrico humano, la concentración de Hp se midió con un kit comercial colorimétrico y las proteínas totales se determinaron por el método de pirogalol usando un reactivo comercial. En aquellas variables diferentes de cero (PT), se realizó la media y se utilizó la prueba o test paramétrico de T- Student. Resultados: tanto las muestras de líquido sinovial del grupo 1 (articulaciones sanas) como del grupo 2 (OA) presentaron valores cero de AAS y Hp. Las concentraciones de proteínas totales (PT) en líquido sinovial fueron muy variables entre los grupos 1, 2 y el líquido sinovial séptico. El grupo 1 (articulaciones sanas) presentó las concentraciones más bajas del estudio con una media de 278 mg/dL (con un rango de valores de 24.24mg/dL a 800.48mg/dL), seguido del grupo 2 (OA) con una media de 680.07 mg/dL (cuyo rango de valores abarca desde 582.61mg/dL hasta 818.75mg/dL) y obteniendo la mayor concentración de PT en líquido sinovial séptico con un valor de 2500mg/dL. La muestra 5 del grupo 1 (articulaciones sanas) presentó un valor de PT (800.48 mg/dl) muy alto respecto al resto de valores del grupo; este valor estaba dentro del rango del grupo 2 (OA). Además, mediante la prueba o test paramétrico de T- Student, se puede afirmar que existen diferencias significativas entre las concentraciones de PT de articulaciones sanas y con OA ( $p:0.01$ ). Conclusiones: La concentración de AAS en líquido sinovial en articulaciones MC/MTF tanto sanas como con signos de OA medida con inmunoensayo turbidimétrico es de 0 mg/L. La concentración de Hp en líquido sinovial en articulaciones MC/MTF tanto sanas como con signos de OA medido con un kit colorimétrico es de 0 mg/L. El valor de PT en líquido sinovial en caballos con OA es superior a 500 mg/dL. No se puede establecer una concentración de AAS y/o Hp en líquido sinovial que sea indicativa de articulaciones con OA mediante el análisis con estos métodos.

**Palabras clave:** amiloide A sérico, haptoglobina, caballo, articulación, osteoartritis.

## ABSTRACT

The metacarp/metatarsophalangeal (MC/MTP) joint (fetlock) is a rotary joint that can exhibit the greatest range of motion of any equine joint, ranging from  $120^{\circ}$  of extension to  $120^{\circ}$  of flexion. This high degree of activity makes this joint particularly susceptible to exercise-induced wear and indeed, the fetlocks are commonly associated with injury and signs of degenerative joint disease. Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease that corresponds to one of the most common causes of lameness in horses with large economic losses and animal welfare problems because of pain. Articular cartilage plays a central role in the pathology; however, subchondral bone and synovial membrane play a crucial role in mitigating forces and joint lubrication. The synovium is an important source of inflammatory and matrix degrading trigger the cascade of degenerative osteoarthritis increasing damage to the articular cartilage cytokines enzymes, this in conjunction with alterations

in the structure of subchondral bone increases the damage. There are several diagnostic methods being the most common radiography, however it is not the most efficient due to the lack of correlation with clinical disease, biomarkers may lead to a diagnostic method early which allows early treatment of the disease. The acute phase proteins are highly sensitive, allowing the detection of lesions or alterations in the early stages of the pathology, and their knowledge is very useful since it makes them potential biomarkers of disease. Serum Amyloid A and Haptoglobin are two acute phase proteins that have recently been localized and measured in the synovial fluid of equine joints with OA. Objectives: Determine the variation of the total protein, serum amyloid A and haptoglobin value in the synovial fluid of the MC/MTP joint of healthy horses and with OA and establish a range of serum amyloid A and haptoglobin concentration in synovial fluid of the MC/MTP joint that is indicative of OA. Hypothesis: The concentrations of both total protein, serum amyloid A and haptoglobin will be higher in the group of joints with OA compared to the group of healthy joints. Material and methods: Prospective clinical study. In Group 1 or control group were included 2 healthy horses from which 5 samples of synovial fluid were obtained. These animals did not present pathologies associated with the musculoskeletal system. Group 2 included 6 animals diagnosed with OA of any of the joints studied. Finally, in order to verify the sensitivity of the methods used for the measurement of acute phase proteins in the synovial fluid, a sample (sample 12) from a distal interphalangeal joint with septic arthritis was used. Samples were obtained through the lateral dorsal recess or lateral palmaroproximal recess and were stored in heparin tubes in a freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$ , correctly identified and closed. Serum amyloid A concentrations were determined by a human turbidimetric immunoassay, haptoglobin concentrations were measured with a commercial colorimetric kit and total proteins were determined by the pyrogallol method using a commercial reagent. In those variables other than zero (total proteins), the mean was performed and the T-Student parametric test was used. Results: Both the synovial fluid samples from group 1 (healthy joints) and from group 2 (OA) had zero serum amyloid A and haptoglobin values. Total protein (PT) concentrations in synovial fluid were very variable between groups 1, 2 and septic synovial fluid. Group 1 (healthy joints) presented the lowest concentrations of the study with a mean of 278 mg/dL (with a range of values from 24.24mg/dL to 800.48mg/dL), followed by group 2 (OA) with a mean of 680.07 mg/dL (with a range of values from 582.61mg/dL to 818.75mg/dL) and obtaining the highest total protein concentration in septic synovial fluid with a value of 2500mg/dL. Sample 5 of group 1 (healthy joints) had a very high total protein value (800.48 mg/dl) compared to the rest of the group. This value was within the range of group 2 (OA). In addition, by means of the test of T-Student, we affirm that there are significant differences between the total protein concentrations of healthy joints and joints with OA ( $p: 0.01$ ). Conclusions: The concentration of serum amyloid A in synovial fluid in MC/MTP joints both healthy and with signs of OA measured with turbidimetric immunoassay is 0 mg/L. The concentration of haptoglobin in synovial fluid in MC/MTP joints both healthy and with signs of OA measured with a colorimetric kit is 0 mg/L. The value of total proteins in synovial fluid in horses with OA is greater than 500 mg/dL. A concentration of serum amyloid A and/or haptoglobin in synovial fluid that is indicative of articulations with OA cannot be established by analysis with these methods..

**Keywords:** serum amyloid A, haptoglobin, horse, joint, osteoarthritis.



## ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CALIDAD DEL ENSILADO DEL SUBPRODUCTO DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA L.*, VAR. *LONGIFOLIA*) CON DIFERENTES TRATAMIENTOS

Fernández-Hernández, I., Megías-Rivas, M.D.\* , Martínez-Teruel, A.

\***Autor de correspondencia:** María Dolores Megías. Email: mdmegias@um.es Departamento de Producción Animal. Campus de Espinardo. Universidad de Murcia. 30100 Murcia. España. Tel: 34 868884748 Fax: 34 868884147

### RESUMEN

Los hábitos adquiridos en las dietas de los consumidores europeos hacen que cada vez se produzcan más alimentos preparados, transformados o con algún tipo de presentación industrial, lo que, unido a la moderna agricultura intensiva provoca la aparición de un exceso de subproductos que tiene ser desechado necesitando de importante desembolso económico. La lechuga es un alimento muy perecedero de rápida degradación, cuyos subproductos, de no ser retirados rápidamente producen graves problemas medioambientales. El principal objetivo de este estudio fue determinar las consecuencias en la conservación, mediante el ensilaje, del subproducto crudo de lechuga romana (*Lactuca sativa L.*, var. *Longifolia*) obtenido en las industrias productoras de hortalizas de IV gama. Se han comparado indicadores fermentativos y químico-nutritivos durante 28 días de ensilaje. Se practicaron cinco tratamientos: lechuga (100%) (L); lechuga y paja de cebada (75+25%) (LPC); lechuga y NaCl (97,5 + 2,5%) (LS); lechuga, paja de cebada más subproducto de mandarina (70+20+10%) (LM) y lechuga más paja de cebada (90+10%) (LP). Estos lotes, por triplicado, fueron sellados al vacío, y almacenados a 9°C durante 28 días. De los resultados obtenidos cabe destacar que la composición inicial del subproducto de lechuga no posee unas buenas condiciones para ser ensilado. Sin embargo, los tratamientos realizados presentaron una mejora sobre dicho potencial. Por una parte, el lote LS obtuvo unos buenos niveles en los parámetros de fermentación, siendo estadísticamente significativos ( $P < 0,001$ ) en cuanto a su contenido en ácido láctico, ácido acético y pH. De los parámetros químico-nutricionales, puede observarse que los tratamientos que incluyeron paja, presentaron unos resultados significativos de mayores contenidos de las fracciones fibrosas y materia seca y, menor en proteína bruta. Por otra parte, puede concluirse que los lotes dónde se incluyeron la paja, presentaron una gran capacidad de retención del agua disminuyéndose de esta forma el impacto medioambiental de los ensilados. Si bien, se hace necesario buscar alternativas para mejorar la calidad fermentativa de estos tratamientos.

**Palabras clave:** ensilaje, subproducto, fermentación, lechuga, *Lactuca sativa*, paja

## ABSTRACT

The habits acquired in the diets of European consumers mean that more and more food is produced: prepared, processed or with some kind of industrial presentation, which, together with modern intensive agriculture, causes the appearance of an excess of by-products that has to be discarded, needing a high economic cost. Lettuce is a very perishable food of rapid degradation, whose by-products, if not removed quickly produce serious environmental problems. The main objective was to determine the results in the conservation by the silage of the raw byproduct of romaine lettuce (*Lactuca sativa L., var. Longifolia*) obtained in the industries producing vegetables of the IV category. Fermentative and chemical-nutritive indicators were compared during 28 days of silage. Five treatments were practiced: lettuce (100%) (L); lettuce and barley straw (75 + 25%) (LPC); lettuce and NaCl (97.5 + 2.5%) (LS); lettuce, barley straw plus mandarin byproduct (70 + 20 + 10%) (LM) and lettuce plus barley straw (90 + 10%) (LP). These batches, in triplicate, were vacuum sealed, and stored at 9 ° C for 28 days. From the results obtained, it should be noted that the initial composition of the lettuce by-product does not have good conditions for silage. However, the treatments performed showed an improvement over said potential. On the one hand, the LS batch obtained good levels in the fermentation parameters, being statistically significant ( $P < 0.001$ ) in terms of its content in lactic acid, acetic acid and pH. From the chemical-nutritional parameters, it can be observed that the treatments that included straw presented significant results of higher contents of the fibrous fractions and dry matter, and lower in crude protein. On the other hand, it can be concluded that the lots where the straw was included, showed a great capacity for water retention, thus reducing the environmental impact of the silage. But, it is necessary to look for alternatives to improve the fermentative quality of these treatments. While, it is necessary to look for alternatives to improve the fermentative quality of these treatments.

**Key words:** silage, by-product, fermentation, lettuce, *Lactuca sativa*, straw.



## **PLAN DE MARKETING DE UN CENTRO VETERINARIO. ADICIÓN DE UN SERVICIO VETERINARIO A UNA EMPRESA YA EXISTENTE.**

**Fernández, A.\*; Muñoz, A.**

**\*Autor para correspondencia:** Alba Fernández Escudero Email: alba\_fe\_93@hotmail.com . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

### **RESUMEN**

El propósito de este proyecto es analizar la situación que rodea a la empresa, analizando cada uno de los servicios que se ofrecen, así como redactar una visión detallada del nuevo servicio que se pretende añadir para atender la demanda de los clientes de la necesidad de la puesta en marcha de un servicio veterinario continuo y de confianza en la localidad de Pedro Muñoz. Uno de los puntos fuertes de la apertura de este nuevo servicio es que se va a integrar en una empresa que ya está en funcionamiento y que va a complementar los servicios ya ofrecidos, aprovechando la confianza de un gran número de clientes que ya disfrutaban de ellos y que piden su complementación con un servicio veterinario que, actualmente es deficiente en la población y obliga a los propietarios de las mascotas a viajar a localidades cercanas. Los servicios con los que cuenta dicha empresa son, por un lado, en un local situado en el centro de la localidad, peluquería canina y tienda especializada con una gran variedad de piensos y accesorios para todo tipo de mascotas. Por otro lado, se ofrece un servicio de adiestramiento canino y modificación de conducta, contando con un gran terreno vallado para la realización de las sesiones. Además, se ofrece un servicio de Terapia Asistida con Animales que está teniendo mucho éxito. Este plan de marketing se ha iniciado analizando la localidad en la que se encuentra la empresa, así como la competencia que pueda haber en el entorno. Según Serra y Velasco (1) “El marketing es una herramienta imprescindible para hacer llegar nuestra oferta de servicios a nuestros clientes reales y potenciales”. Por ello se ha hecho especial énfasis en analizarlos, ya que son los clientes los que van a guiar este proyecto con sus preferencias, gustos y peticiones. Para ello, se ha elaborado una encuesta que recoge los aspectos más importantes de un servicio veterinario que pueden ser evaluados por el cliente, como por ejemplo, si es de interés la contratación de una iguala veterinaria o no, o qué se podría mejorar en la clínica veterinaria a la que el cliente suele acudir con su mascota, entre otras preguntas. Se ha continuado analizando cada uno de los servicios que ya se ofrecen en la empresa con los productos ofertados y sus precios y algunas propuestas de mejora. También se han analizado y descrito las características del personal con el que va a contar la empresa y, con especial énfasis, del servicio que se desea adicionar a los ofrecidos, es decir, el servicio veterinario. De este último se ha detallado dónde se va a instalar, añadiendo un plano de las instalaciones, los servicios que se van a ofrecer y a qué precios, que instalaciones se necesitan y una serie de estrategias de marketing para la fidelización de la clientela. Las tarifas y los horarios del consultorio se han redactado de acuerdo a la experiencia de las prácticas realizadas en

tres centros veterinarios y también de acuerdo a los resultados de la encuesta. Una vez analizado todo lo que se desea ofrecer, se ha procedido a realizar un análisis de las debilidades, amenazas, fortalezas y oportunidades de la empresa (Análisis DAFO). Con esta información se han propuesto una serie de objetivos, es decir, que quiero conseguir con la complementación del servicio veterinario, planteando unas estrategias para alcanzarlos.

**Palabras clave:** plan marketing, clínica veterinaria, análisis dafo, Pedro Muñoz, empresa.

## ABSTRACT

The purpose of this project is to analyze the situation surrounding our company, analyzing each of the offered services and write a detailed view of the new service that we will pretend to add due to our clients request, who need a continuous and reliable veterinary service in Pedro Muñoz. One of the strengths of this new service is its inclusion in an operational business. This service is going to complement the other offer services. People who benefit from the rest of our services, know our way of work and trust us. People asked for a veterinary service in Pedro Muñoz because they had to travel to a nearby village with their pets previously. "Servicios Caninos Los Humedales" offers the follow four services: dog groomer, pet shop, these both are located in a central building in the village, dog training and behaviour modification. (in a big piece of ground), animal assisted therapy and all of these services are succeeding. Three methods have been used to write this marketing plan. - The first has been a synthetic analytical methodology, typical of a marketing plan. This has been analyzing the village in which the business will be located and the competition of the surroundings. Customer preferences have been analyzed too in a survey. Then, the company staff and the products and services offered have been described. The organization's strengths, weaknesses, opportunities and threats has been analyzed (SWOT analysis). SWOT analysis allows the setting of goals and to develop strategies to achieve these goals. - The second one has been a self - administered survey presented to the customers to know their tastes and preferences. The survey results have been used to make the marketing plan. The most important information collected has been the most and the least important aspect to consider by the customer in a veterinary center. The most important has been the good manner of the vet with the pet. The least one has been the opening and closing hours. - The last one has been the own experience of the analyst in three veterinary centers where she practiced during her studying years. Prices and opening and closing hours have been taken from this experience. Once this marketing plan is done and based on the result which the most important are: Poor competition around us; the central location in the village of the building; the survey results, in which 51,6% of the surveyed would visit a new veterinary center; the emergency supply, which 58,33% of surveyed people consider an important thing and the success of the already offered service. I would consider it to be worth carrying out the project by adding the new veterinary service and complementing the offered ones.

**Key words:** . marketing plan, veterinary clinic, swot analysis, Pedro Muñoz, company.

## VALIDACIÓN DE UNA TERMOCÁMARA APLICABLE A TELÉFONO MÓVIL PARA SU USO EN LECHONES EN LACTACIÓN

**Galindo, I.; Pallarés, F.J.; Ramis, M.G.\***

**\*Autor para correspondencia:** Manuel Guillermo Ramis. Email: guiramis@um.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34 868884749

### RESUMEN

En clínica y producción porcina la toma de temperatura por métodos termométricos clásicos es difícil y conlleva un gasto importante de tiempo, sobre todo cuando los animales están alojados de forma colectiva, además de producir estrés en los animales y la posibilidad de transmisión de enfermedades mediante los instrumentos de medición. La termografía ofrece una alternativa mucho menos difícil de ejecutar y que evita los riesgos antes mencionados. Sin embargo, hasta hace poco la carestía de las cámaras termográficas no permitía que se implementase en la exploración clínica cotidiana de las granjas. Recientemente ha salido al mercado una termocámara acoplable al teléfono móvil, con un precio reducido y que ofrece una oportunidad de extender el uso de la termografía. En este trabajo se ha validado una cámara termográfica (FLIR ONE en su versión para Android) para la evaluación de temperatura cutánea superficial en lechones en lactación. Se han utilizado dos aplicaciones informáticas (FLIR ONE y Degree) para el análisis de las imágenes termográficas capturadas. Un total de 218 y 177 imágenes de lechones lactantes se capturaron mediante FLIR ONE y Degree y se obtuvo la temperatura rectal de los lechones, así como la temperatura ambiental, la humedad relativa y la luminosidad en el momento de la medición. Se excluyeron aquellos datos que presentaban valores de temperatura termográfica extremos por considerarlos un error de lectura, por tanto, finalmente se analizaron 205 y 165 datos, respectivamente. Los datos se analizaron mediante SPSS v 15. Se han obtenido correlaciones medias muy significativas entre los parámetros termográficos analizados con cualquiera de las dos aplicaciones y la temperatura rectal. Esto nos indica que el uso de termografía se revela como una herramienta clínica importante en el futuro inmediato.

**Palabras clave:** termografía, FLIR One, Degree®

### ABSTRACT

The body temperature assessment in porcine clinic examination is a time consuming not easy procedure. Thus use not to be done in a routinely basis in farms. Moreover, the use of devices directly applied to animals has risks such as stress or iatrogenic transmission of pathogens. The infrared thermography (IRT) is an alternative procedure that allows to assess the skin surface temperature and to interpolate the body core

temperature. However, classically the price of thermal cameras has been very high preventing thus the universal implementation of this technology to the animal health and production field. This has changed recently because of the apparition of low cost smart thermography cameras, able to be linked to any smartphone to get images. The price has been reduced about more than 80 folds regarding the original cameras. So, nowadays it is possible to design new strategies for thermography analysis in animal health and specifically in swine diseases. In this frame, FLIR ONE device has appeared, a smart camera supported by Android and iOS smartphones able to get thermal images and to offer an estimation of the core temperature on the basis of the skin temperature. Once the thermal image has been got, it can be analyzed by means of different software applications. We have used two different Apps: FLIR TOOLS (Flir, USA) and Degree (Beinfive, Spain) to validate the camera to assess temperature variations in suckling piglets. The procedure in brief was: thermal images using FLIR ONE were taken of piglets between 7 and 21 days of life without spatial restriction. Subsequently the images were taken using Degree, and the rectal temperature was assessed by classical electronic thermometer. Environmental temperature, relative humidity and brightness were measured by electronic devices ad hoc. Finally, 218 images were taken with FLIR ONE and 177 with Degree. There were excluded all temperatures below 34°C or above 50°C, as considered as measurement errors. So, 205 and 165 images were analyzed, respectively. For the images analyzed with FLIR TOOLS thermographic temperatures were assessed in entire loin or ear basis (intended as thermal window), whilst Degree offered directly the highest temperature recorded in the image, below 45°C. Data were included in an Excel database and analyzed by means of SPSS (SPSS Inc, USA), using Pearson's correlation, and considering as significant when  $p < 0.05$ . Regarding FLIR ONE and FLIR TOOLS analysis, significant correlations were found among rectal temperature and maximum IRT in loin ( $r = 0.589$ ,  $p < 0.001$ ), average IRT in loin ( $r = 0.496$ ,  $p < 0.001$ ), minimum IRT in loin ( $r = 0.389$ ,  $p < 0.001$ ), maximum IRT in ear basis ( $r = 0.589$ ,  $p < 0.001$ ), average IRT in ear basis ( $r = 0.508$ ,  $p < 0.001$ ) and minimum IRT in ear basis ( $r = 0.293$ ,  $p < 0.001$ ). The correlation between maximum IRT in loin and ear basis was very high and significant ( $r = 0.944$ ,  $p < 0.001$ ). When data were analyzed by means of Degree, significant correlations were also found among rectal temperature ( $r = 0.47$ ,  $p < 0.001$ ) and all the other thermographic parameters analyzed with FLIR TOOLS (among  $r = 0.471$  and  $r = 0.567$ ,  $p < 0.001$ ). There were some influence of environmental temperature, brightness and humidity on the correlation among thermographic temperature and rectal temperature, but in none case was enough to prevent the use of the device; only when parameters were extreme. In conclusion, FLIR ONE and both software applications tested may be suitable to assess the skin temperature in suckling piglets and to have an early detection of both hypo and hyperthermia as health indicators.

**Key words:** Thermography, FLIR ONE, Degree

## SANEAMIENTO GANADERO EN UNA EXPLOTACIÓN BOVINA CO-INFECTADA DE TUBERCULOSIS Y PARATUBERCULOSIS

García, E.; Ortega, N.; Seva, J\*.

\***Autor para correspondencia:** Juan Seva. Email: jseva@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34868884701.

### RESUMEN

En el presente trabajo, se ha tratado de valorar las diferentes respuestas a los test de diagnóstico oficiales empleadas en la detección de la tuberculosis bovina en una explotación con animales co-infectados con tuberculosis y paratuberculosis. Para ello se ha hecho un seguimiento de los resultados obtenidos en 3 campañas de saneamiento realizadas en una explotación bovina con tuberculosis en la que también se detectaron animales con paratuberculosis. Actualmente, la prueba de la intradermorreacción simple y el test de interferón-gamma, usadas para detectar las bacterias del complejo tuberculoso, deben confirmarse mediante la realización del cultivo bacteriano y la identificación por PCR. Dentro de los posibles factores que afectan a la eficacia del diagnóstico de la tuberculosis; la presencia de paratuberculosis es una de las principales causas, siendo ésta una enfermedad muy presente en el ganado rumiante de España. Sin embargo, el efecto directo en la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de la tuberculosis, no está determinado. Aunque, en nuestro estudio, las pruebas realizadas mostraron solo un animal co-infectado, no encontrándose lesiones compatibles con tuberculosis ni se pudo aislar el patógeno, los resultados muestran que el uso conjunto de las dos técnicas de diagnóstico ayudó a eliminar los falsos reaccionantes positivos. La sensibilidad y la especificidad se calcularon para las dos pruebas, mostrando a la prueba del IFN- $\gamma$ , es menos específica que la IDTB simple. La posibilidad de usar otras pruebas como la intradermotuberculinización comparada o la implementación de antígenos más específicos podría haber mejorado la calidad del diagnóstico al mejorar la especificidad de las pruebas.

**Palabras clave:** Tuberculosis, Paratuberculosis, Bovino, Co-infección.

### ABSTRACT

Tuberculosis is a chronic disease affecting cattle. In addition, it has a zoonotic component and may also affect people. This disease is very important because of the economic costs that they produce in their eradication and control plans made by the different countries, since it has been fighting against it more than 50 years in the world. Paratuberculosis is a chronic disease that affects ruminants, which, like tuberculosis, is produced by bacteria of the genus *Mycobacterium*. Both pathologies have a complex union with the animal's immune response in the evolution of lesions and symptomatology. The state of humoral and cellular immunity is most

used at the diagnosis of these diseases. In tuberculosis, cellular immunity is most used and, in paratuberculosis, is humoral immunity. There are also diagnostic tests that detect the etiological agent such as bacteriological culture or the polymerase chain reaction (PCR) test. The European Union includes the single tuberculin skin test and the IFN- $\gamma$  test as official tests in tuberculosis control plans. These tests are made to measure cellular immunity using a purified protein derivative (PPD) to stimulate T-cells of the animal and produce a type IV hypersensitivity response which is associated with the presence of the infection. In the case of paratuberculosis, tests that measure the level of antibodies, such as ELISA, are routinely used. The antibody assay uses the humoral immune response as a diagnostic method. The presence of tuberculosis is influenced when other diseases appear, in addition to other factors such as immunosuppressive agents, the type of management of the farm, the age of the animals or the virulence of the bacterial strain. The efficacy of the diagnosis using cellular immunity, in tuberculosis, is influenced when the animals coexist with other diseases. When both diseases, tuberculosis and paratuberculosis, unite in the same herd produce interference in the diagnoses because they are similar pathogens: the two bacteria have obligate intracellular pathogenic, produce lesions modifying the immune response and share a certain proportion of antigens as they belong to the same genus. This situation makes tuberculosis, which is a disease that is aimed at eradicating, in a major problem because it is difficult to diagnose. This study has evaluated the different responses to official diagnostic tests, applying protocols for control and eradication of bovine tuberculosis in a bovine farm in the Region of Murcia. In view of the above results, this is a co-infected herd of tuberculosis and paratuberculosis at the field level. We studied a farm in which animals with lesions compatible with tuberculosis appeared in a routine slaughter. In subsequent appraisals, disease was confirmed and controlled using simple IDTB together with the IFN- $\gamma$  test and eliminating positive reactors. The percentage of the animals detected by these tests was odd, being reflected in the calculation of the sensitivity and specificity. The possible use of more specific antigens, in our study, could have eliminated at least some of the false positive reactors. To sum up, during a subclinical infection of tuberculosis or paratuberculosis, the greatest problem is found when establishing, with certainty, the presence of the bacteria. This lack in the diagnoses with the current tests make it necessary to continue researching in order to detect subclinical infections or to improve the difference between different infections of the different bacteria that compose the genus *Mycobacterium*.

**Key words:** Tuberculosis, Paratuberculosis, Bovine, Co-infected.

## FACTORES GENÉTICOS EN LA ETIOLOGÍA DEL PROLAPSO DE RECTO EN CERDO IBÉRICO (*SUS SCROFA*) EN INTENSIVO

García, M.A.; Ramis, M.G.\*

\***Autor para correspondencia:** Manuel Guillermo Ramis. Email: guiramis@um.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34 868884749

### RESUMEN

En este trabajo se busca identificar la posibilidad de que determinados genes que codifican ciertas metaloproteinasas de matriz (MMP), concretamente las MMP-1, MMP-3 y MMP-9; puedan estar relacionados a la predisposición del prolapso rectal en la especie porcina. Se realizó la necropsia de tres cerdos provenientes de una explotación porcina que usa un cruce entre Duroc x Ibérico, la cual presenta una incidencia del 2% de prolapsos rectales. Se decidió estudiar dichos genes, usando la estrategia de "genes candidatos", extrapolando los resultados obtenidos en estudios realizados en la especie humana y, teniendo en cuenta que el porcentaje de similitud de la MMP-1, MMP-3 y MMP-9 entre la especie *Sus scrofa* y la especie *homo sapiens* es del 86%, 85% y 84% respectivamente, tal y como se ha determinado mediante BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)). Se tomaron muestras de tejidos de dos cerdas con prolapso rectal y una cerda aparentemente sana, procedente de la misma granja, con edades aproximadas entre 16-18 semanas de edad. Se obtuvieron muestras de duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto y nódulo inguinal, además de sangre desuerada. Dichas muestras se dividieron en dos porciones, una se fijó en formol y se realizó un estudio histopatológico y de la otra conservada en fresco, se extrajo ADN y ARN para realizar posteriormente las pruebas laboratoriales mediante PCR a tiempo real. El estudio histopatológico reveló un proceso inflamatorio afectando a todos los tramos del intestino y todos los animales, aunque con menos gravedad en el animal sin prolapso. Se descartó que se debiera a la presencia de *Circovirus* porcino tipo 2 (PCV2), *Lawsonia intracellularis* y *Brachyspira hyodysenteriae*. Tras poner a punto una técnica de PCR en tiempo real, se procedió al estudio de la expresión génica relativa en cada tejido y en cada animal para los genes MMP-1, MMP-3 y MMP-9 mostró un patrón de expresión distinto en los animales con y sin prolapso..

**Palabras clave:** prolapso rectal, porcino, expresión génica, metaloproteinasas

### ABSTRACT

The most important reason for this work was to identify the possibility that certain genes encoding certain matrix metalloproteinases (MMPs) are related to the predisposition of rectal prolapse in the porcine species. The studied metalloproteinases were MMP-1, MMP-3 and MMP-9. The rectal prolapse in the porcine species

is a widespread multifunctional pathology present among well-developed pigs. This phenomenon can occur at any age. Although, the most common age is between 8-20 weeks of life. This pathological phenomenon is characterized by the exteriorization of the visceral wall of the rectum through the orifice or anal canal. A wide variety of causes may promote this pathology. Our objective with this work has been the search for a possible genetic cause, discarding some of the most frequent infectious diseases. There is no information regarding genetic alterations related to rectal or uterine prolapse in pigs, but there are studies related to pelvic organ proliferation (POP) in human. These studies evidenced a remodeling of the extracellular matrix and its components in the pelvic floor. However, the exact pathophysiological pathways involved in this entity still need to be clarified. Disorders of connective tissue metabolism can affect structures supporting the pelvic organs (eg, ligaments) and have also been described as potential causes of POP. The central idea was to extrapolate this concept to the pathology presented in pigs. The necropsy was performed on three animals. These animals were a crossbreed Iberian x Duroc reared under intensive conditions. The incidence of rectal prolapse in this farm is 2%. Tissue extractions were performed from two sows with evident rectal prolapse and also a healthy sow. All of them with approximate ages between 16-18 weeks. Samples of duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, inguinal nodule and were obtained by necropsy, in addition to bleeding blood. These samples were divided in two portions. One of them was fixed in formaldehyde and their histopathology was studied. And from the other samples DNA and RNA were extracted to make PCR tests. A comparative study of gene expression between different types of MMPs was carried out using real-time PCR. In order to obtain the c-DNA an RT-PCR was performed with the obtained RNA. In addition, a primer concentration test was performed at 50 nM, 150 nM and 300nM to determine the most indicated concentration to be used later in the comparative study. The DNA concentration was used at 300 nM. The results obtained were different from those consulted in the bibliography. Above all, it was observed that the animal without rectal prolapse presented greater gene expression compared to the animals affected by the pathology. These results were contradictory to POP studies. Specifically, MMP-9 does not follow the pattern of POP studies. While MMP-3 seems to follow the pattern of POP studies. The results obtained in this study are preliminary and inconclusive. Obviously, it is needed further research following the pathway designed for this work. The number of samples could be increased. In addition, comparative studies of gene expression with other genes involved in the remodeling of the extracellular matrix should be performed.

**Keywords:** rectal prolapse, swine, gene expression, metalloproteinase.



## **EFECTO DEL FLUIDO FOLICULAR LIOFILIZADO EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS PORCINOS**

**García, R.; Romar, R.\***

**\*Autor para correspondencia:** Raquel Romar. Email: rromar@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34-868-884791

### **RESUMEN**

El uso potencial de embriones porcinos para la biomedicina está siendo seguido con gran interés por la comunidad científica. Debido a las similitudes fisiológicas con los seres humanos, los embriones producidos *in vitro*, y muchos de los producidos *in vivo*, se utilizan en los laboratorios de investigación para la obtención de células madre o la producción de animales transgénicos, a veces con el propósito de utilizar sus órganos para xenotrasplantes. Existe un gran interés y un rápido avance en la producción de grandes cantidades de embriones porcinos, obtenidos a través de la técnica de maduración *in vitro* de ovocitos y la posterior fecundación, para la investigación científica, así como para muchas tecnologías reproductivas emergentes. Como consecuencia se han desarrollado importantes avances en los sistemas de cultivo embrionario mediante la modificación de las técnicas utilizadas y los medios de cultivo. Sin embargo, varios problemas siguen sin resolverse. Uno de los aspectos más críticos es la calidad intrínseca de los ovocitos. La mayoría de las técnicas utilizadas para la maduración y fecundación *in vitro*, utilizan ovocitos inmaduros recuperados de los ovarios de las hembras pre-púberes sacrificadas en el matadero, lo que resulta en una mezcla de ovocitos en diferentes fases de crecimiento y etapas de desarrollo. Para solucionar este problema, se utilizan técnicas de sincronización basadas en el uso de inhibidores reversibles, que permiten detener la maduración ovocitaria en Profase I, y de esta forma sincronizar al máximo posible la maduración. A continuación, se retira el inhibidor para permitir que los ovocitos reanuden la meiosis y maduren de la forma más homogénea y sincrónica posible. En los últimos años se han logrado importantes avances en los sistemas de maduración y fecundación *in vitro*. Desde finales de los años 90, como mejora en la maduración *in vitro*, se emplea fluido folicular como suplemento en el medio de maduración de ovocitos porcinos. Numerosos estudios demuestran que el empleo de este fluido tiene un impacto beneficioso en el potencial de desarrollo de los ovocitos. En este estudio probamos el efecto que tiene en la maduración ovocitaria, que el fluido folicular esté liofilizado, ya que ello alargará la vida media de este reactivo biológico y facilitará el almacenamiento del mismo y su transporte, por lo que se podrán obtener grandes lotes del mismo fluido que se podrán comercializar y utilizar por los distintos laboratorios evitando la variabilidad entre los grupos de investigación. Además, la comprobación de la efectividad e inocuidad del fluido liofilizado es un paso previo y requisito indispensable si se quiere comercializar este reactivo. La hipótesis de trabajo es que la adición de fluido folicular liofilizado no afectará a los resultados de calidad y maduración ovocitaria comparado

con el fluido folicular no liofilizado que se utiliza en los protocolos habituales. El fluido folicular es un aditivo empleado rutinariamente por la mayoría de laboratorios que trabajan con técnicas de reproducción asistida en la especie porcina. Este se utiliza como fuente proteica desde que en 1988 se demostró que mejoraba la maduración ovocitaria. Además de fluido folicular, el medio de cultivo NCSU-37 se suplementa con gonadotropinas, dbAMPc (dibutiril adenosín monofosfato cíclico), insulina, cisteína y factores de crecimiento permitiendo en su conjunto una maduración óptima. El fluido folicular porcino (FFP) se obtiene de los folículos de ovarios procedentes de hembras prepúberes sacrificadas en el matadero. Este fluido se deshidrata sometándolo a una rápida congelación y posteriormente eliminando el hielo mediante un ligero calentamiento al vacío, transformándolo en vapor, eliminando así el agua y dejándolo en estado sólido. Para este estudio, el medio del grupo experimental se suplementa con 10% FFP liofilizado mientras que el grupo control se suplementa con FFP líquido congelado-descongelado. El método de maduración es el empleado hasta el momento en diferentes estudios. Se lleva a cabo en grupos de 45-50 COCs (complejos ovocito-células del cúmulus) en un volumen de medio de 500 ul. Pasadas 20-22 horas de cultivo, los COCs se transfieren a medio NCSU-37 libre de gonadotropinas y dAMPc y se cultivan durante 20-22 horas. Finalmente se tiñen los ovocitos (Hoechst 33342) y se observa en un microscopio de fluorescencia con filtro ultravioleta el estadio de maduración nuclear en el que se encuentran los ovocitos. Los resultados muestran que un  $68.7 \pm 3.2\%$  de los ovocitos maduran correctamente y alcanza el estadio de metafase II. Al adicionar FFP liofilizado este porcentaje disminuye ligeramente hasta el  $54.0 \pm 3.6\%$ . Además, al madurar los ovocitos con FFP liofilizado hay un mayor porcentaje de ovocitos degenerados ( $2.8 \pm 1.1\%$  vs.  $8.1 \pm 1.9\%$ ) y detenidos en estadio de vesícula germinal 0 ( $0.5 \pm 0.5\%$  vs.  $5.1 \pm 1.6\%$ ). Estos resultados no confirman la hipótesis de partida y están lejos de los obtenidos normalmente en este laboratorio empleando fluido folicular sin liofilizar u otros fluidos reproductivos liofilizados. Podrían explicarse por cuestiones técnicas y falta de experiencia en las técnicas.

**Palabras clave:** fluido folicular, maduración in vitro, ovocito, porcino

## ABSTRACT

The potential use of swine embryo for biomedicine is being sought with great interest by the scientific community. Due to the physiological similarity of pigs to human beings, embryos produced in vitro, and many of the ones produced in vivo as well, are used in research laboratories for the collecting of stem cells or the production of transgenic animals, sometimes for the purpose of using their organs for xenotransplantation. There is a great interest and a quick progress in the production of large amounts of embryos, whose oocytes are matured in vitro and fertilized afterwards, in scientific research, as well as in many other emerging reproductive technologies. As a result, important breakthroughs have been developed in embryo culture systems through the modification of culture mediums and techniques. However, several questions are yet to be solved. One of the most critical aspects is the intrinsic quality of the oocytes. Immature oocytes from the ovaries of prepuberal slaughtered females are used in the majority of in vitro maturation and fertilization techniques, resulting in a mix of oocytes in different growth and development stages. To solve this problem, synchronization techniques based on the use of reversible inhibitors are employed, which allows the stopping of the oocytes maturation in Prophase I, synchronizing the maturation as much as possible. Later, the inhibitor is removed to allow the oocytes to continue with the process of meiosis and mature in the most homogeneous and synchronous way possible. In the last years, important breakthroughs in in vitro maturation and fertilization systems have been achieved. Since late 90s, as an improvement in in vitro maturation, follicular fluid has been used as a supplement in the maturation medium for swine oocytes. Numerous studies showed the beneficial influence of this fluid in the oocytes development potential. In this research, the effect of using this fluid lyophilized on the oocytes maturation is proved, since the lyophilisation will extend the average lifetime of this biological reagent and will facilitate its storage and transport, allowing obtaining large batches for commercialization in different laboratories avoiding the variability among the research groups. Furthermore, the verification of the effectiveness and safety of the lyophilized fluid means a previous step and an essential requirement if the reagent is being commercialized. Our hypothesis is that the addition of the lyophilized follicular fluid would not affect the quality and oocytes maturation rates compared to the addition of non-lyophilized fluid used in

the usual protocol. The follicular fluid is an additive routinely used in the majority of the laboratories that work with assisted reproduction techniques in porcine species. It is used as a source of protein since in 1988 it was demonstrated its beneficial effect improving the oocyte's maturation rate. In addition to the follicular fluid, the culture medium named NCSU-37 is supplemented with gonadotropins, dbAMPc (dibutyryl adenosine monophosphate cyclic), insulin, cysteine and growth factors, altogether allowing an optimal maturation. The porcine follicular fluid is obtained from ovarian follicles of slaughtered gilts. It is dehydrated by a quick freeze, and subsequently, removing the ice through a vacuum slight warming, transforming it in steam and so removing the water and leaving it in a solid state. For this research, the experimental group medium is supplemented with 10% lyophilized PFF (porcine follicular fluid), whereas the control group is supplemented with liquid frozen-thawed PFF. The maturation method is the one routinely used in different studies. It is conducted in 45-50 COCs groups (cumulus oocyte-complexes) in an average volume of 500  $\mu$ l. After being 20-22 hours in culture, the COCs are transferred to a gonadotropins and dbAMPc-free NCSU-37 medium, and cultured for additional 20-22 hours. Finally, the oocytes are stain (Hoechst 33342) and observed under epifluorescent microscope to record the maturation stage in each oocyte. The results show that  $68.7\pm 3.2\%$  of the oocytes mature properly reaching the metaphase II stage. When adding lyophilized PFF, this percentage decreases to  $54.0\pm 3.6\%$ . Besides, maturation in lyophilized PFF, increases the rate of degenerated oocytes ( $2.8\pm 1.1\%$  vs.  $8.1\pm 1.9\%$ ) and the rate of oocytes at germinal vesicle 0 stage ( $0.5\pm 0.5\%$  vs.  $5.1\pm 1.6\%$ ). These results do not confirm the initial hypothesis and are far from the usually obtained results in this laboratory using non-lyophilized follicular fluid or other lyophilized reproductive fluids. This could be explained by technical problems and the lack of experience in these techniques.

**Key words:** follicular fluid, in vitro maturation, oocyte, porcine species.



## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CLAMIDIAS EN AVES SILVESTRES

García, A.; Ortega, N.; González, F.; Del Río, L.\*

\***Autor para correspondencia:** Laura del Río Alonso · Email:laurario@um.es · Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: 034 868884154

### RESUMEN

Las clamidias son bacterias intracelulares que pueden infectar a multitud de especies animales y algunas presentan un importante potencial zoonótico, como es el caso de *C. psittaci* y *C. abortus*. Gracias a las técnicas moleculares, en los últimos años se han identificado y descrito nuevas especies clamidiales en aves silvestres como en el íbis eremita (*Threskiornis aethiopicus*) y el flamenco (*Phoenicopterus roseus*), aunque hasta el momento, no hay apenas datos de las especies que infectan a las rapaces. El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de clamidias en varias especies de aves silvestres procedentes de un centro de recuperación de fauna silvestre. Se ha utilizado un protocolo diseñado para mejorar la sensibilidad de la detección en muestras cloacales, optimizando la conservación del ADN en condiciones de campo mediante la utilización de un tampón conservante basado en guanidina. Se muestrearon 50 individuos en total, correspondientes a las especies Buitre negro (*Aegypus monachus*) y Cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*). Posteriormente, se analizaron los extractos por real-time PCR, evaluando la presencia o ausencia de clamidias analizando la amplificación de una secuencia del gen 23s del ARN ribosomal de la familia *Chlamydiaceae* y genes específicos para la identificación de clamidias aviarias como *C. psittaci*, *C. avium*, *C. gallinae* y *C. pecorum*. Nuestros resultados indican que el protocolo de conservación de la muestra mejoró el rendimiento en cantidad y calidad del ADN obtenido. Además, la eficiencia en la amplificación de beta-actina determinó un alto valor predictivo de la técnica. Por último, se han detectado ADN clamidial de forma asintomática en las aves estudiadas, destacando la presencia de *C. pecorum* en aves carroñeras. Nuestros resultados muestran una técnica eficaz para el diagnóstico de clamidias aplicable a muestras de fauna silvestre.

**Palabras clave:** Chlamydia, aves silvestres, diagnóstico, real-time PCR.

### ABSTRACT

Chlamydiae are intracellular bacteria that can infect a multitude of animal species and some have an important zoonotic potential, such as *C. psittaci* and *C. abortus*. Thanks to molecular techniques, in recent years chlamydial infections have been identified in wild birds such as ibis eremita (*Threskiornis aethiopicus*) and flamenco (*Phoenicopterus roseus*), giving rise to the description of new species. The aim of this study was to analyze the presence of chlamydia in wild birds from wildlife rehabilitation centers. A protocol designed

to improve detection sensitivity in cloacal samples has been used, optimizing DNA conservation in field conditions by using a guanidine-based preservative buffer. Samples from fifty birds from the species cinereous vulture (*Aegypus monachus*) and white stork (*Ciconia ciconia*) were taken from the cloaca. Subsequently, the DNA extracts were analyzed by real-time PCR, evaluating the presence or absence of chlamydial bacteria by analyzing the amplification of a sequence of the 23s gene of ribosomal RNA of the Chlamydiaceae family and specific genes for the identification of species of chlamydia such as *C. psittaci*, *C. avium*, *C. gallinae* and *C. pecorum*. Our results indicate that the preservation of the samples allowed a higher yield and better quality of the DNA obtained. In addition, the efficiency of beta-actin amplification determined a high predictive value of the technique. Finally, chlamydial DNA has been detected asymptotically in the birds studied, highlighting the detection of *C. pecorum* DNA present in the faeces of cinereous vulture. This technique can be of great use for the diagnosis of chlamydia in wildlife samples.

**Keywords:** Chlamydia, wild birds, diagnosis, real-time PCR

## **ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE ESTRÉS, MEDIANTE EL USO DE WIRELESS SENSOR TECHNOLOGIES, EN CABALLOS DE EQUINOTERAPIA**

**González, A.; Zilberschtein Juffé, J.\*; Sánchez-Valverde, M.A.**

**\*Autor para correspondencia:** José Zilberschtein Juffé. Email: [ziltein@um.es](mailto:ziltein@um.es). Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34 868 887 651

### **RESUMEN**

Podemos definir de forma general la equinoterapia como una forma de tratamiento alternativo para personas con discapacidad física, psíquica o sensorial, problemas de salud mental y/o de adaptación social, que utiliza como elemento terapéutico el vínculo del paciente afectado con el caballo, tanto en la monta como en el cuidado del animal, y aprovecha el movimiento del caballo con un sentido terapéutico. Los équidos empleados en estas técnicas terapéuticas alternativas, son sometidos a una rutina de trabajo que puede alterar la tranquilidad y por ende el bienestar del animal, debido a que requiere de rutinas de trabajo personalizadas según cada paciente, lo que podría ser considerado como un estímulo estresante para el animal, originando una serie de respuestas adaptativas por parte del mismo. Estas respuestas adaptativas del animal al estrés, conlleva la activación de múltiples sistemas hormonales y mecanismos que afectan directamente al estado físico y bienestar general del animal. Esta respuesta busca conservar la homeostasis y óptimo rendimiento del animal, así como preservar la supervivencia en caso de una situación extrema. Dentro de las respuestas fisiológicas de adaptación se incluyen cambios térmicos, cardiorespiratorios y comportamentales, así como la activación de sistemas hormonales como el eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical y el eje simpático-adrenomedular. Con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical se desencadena una cascada hormonal que conlleva en última instancia a la elevación de los niveles de glucocorticoides, especialmente, cortisol. Mediante la evaluación de los indicadores no invasivos de estrés agudo y crónico, como del estrés agudo en el caso de los valores de FC, FR, TC y Conductas Comportamentales (CC), se puede determinar el estado de Bienestar de los animales. Estudios anteriores ya han demostrado que los niveles elevados de cortisol salival reflejan la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical y por ello es considerado un marcador biológico de estrés agudo o crónico. Así mismo, diversos estudios han hallado una asociación entre niveles elevados de cortisol y diferentes patologías que cursan con dolor. El objetivo de este estudio es analizar mediante Wireless Sensor Technologies los niveles de estrés en caballos de equinoterapia y si dichos niveles aumentan durante la realización de las sesiones terapéuticas. Para ello se han seleccionado seis caballos, tres de raza Fjord y tres mestizos, que realizan su trabajo como cooterapeutas equinos en la Fundación Tiovivo, ubicada en el municipio

de Cartagena (Murcia, España). Los niveles de estrés han sido medidos en cuatro momentos distintos tomadas a los caballos en 4 instantes; control y minutos 0, 25, 60 de la sesión de equinoterapia, para visualizar el posible efecto del tiempo sobre ellos. Las mediciones se repitieron en días diferentes, durante diez y seis semanas. Tras la realización de un ANOVA, se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos en los 4 instantes de tiempo. Concluyendo que el sistema de medición mediante Wireless Sensor Technologies, es un buen indicador no invasivo para medir la respuesta a factores de estrés. Los valores de FC, FR y TC aumentaban durante la sesión de equinoterapia. Así mismo, debemos seguir profundizando en próximos estudios en su utilidad como indicadores no invasivos de estrés, ya que pueden estar íntimamente relacionados con el ejercicio realizado en las diferentes sesiones de equinoterapia. Los datos recabados de FC, FR y TC nos muestran que el método de medición con sensores de última generación, es un factor que minimiza el estrés de los caballos y es un importante avance en los procedimientos para su evaluación. El último parámetro valorado fue el patrón comportamental. Los animales mostraban un pico de presencia de comportamientos anómalos al comienzo de la sesión, disminuyendo progresivamente durante la realización de la misma. Esto puede ser debido al grado de concentración que van alcanzando los animales, así como a la habituación a lo largo de la terapia. Por ello, se trata también de un excelente indicador no invasivo para medir la respuesta a un factor de estrés, ya que nos permite de forma rápida y económica valorar el estado de confort del animal en cada momento. Se ha conseguido el objetivo buscado en esta primera fase del presente estudio, siendo nuestros siguientes pasos continuar en esta línea de investigación con profundo e incansable interés.

**Palabras clave:** Stress Parameters, Wireless Sensor Technologies, Equine-Assisted Therapy

## ABSTRACT

Usually hippotherapy is defined as an alternative treatment for physical, psychic, sensory disability people and people without mental health and/or with adaptation disorders. It uses the union bond between patient and horse, including the riding and the previous cares of the animal, and also takes advantage of the horse gait as a therapeutic treatment. The horses used in these therapeutic alternative techniques are subjected to routine work that can disturb the peace and therefore the welfare of the animal, because it requires routines tailored to each patient work, which could be considered as stressful stimulus for the animal, causing a series of adaptive responses by the same. These adaptive responses to the animal due to the stress, involves the activation of multiple hormonal systems and mechanisms that affect directly the fitness and general welfare of the animal. This response seeks to maintain homeostasis and optimum animal performance and preserve the survival in case of an extreme situation. Within physiological adaptive responses it is include thermal changes, cardiorespiratory, and activation of hormonal systems such as hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis and the sympathetic-Adrenomedullary axis are included. With the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis is triggered a hormonal cascade that involve, as a last resort, to elevate levels of glucocorticoids, especially cortisol. It could determinate the animal welfare by the assessment of non – attached stress indicators. Previous studies have already shown that high levels of salivary cortisol reflect the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis and therefore is considered a biological marker of acute or chronic stress. Also, several studies have found an association between elevated cortisol levels and various diseases involving pain. The objective of the study is analyzing the stress level in hippotherapy horses using wireless sensor technologies, and if this stress level increases while the horse is training in the daily session. For this reason, 6 horses have been select: three of Fjord breed and other three mixed breed. They carry out the daily session as a cooperative therapist on Fundacion Tio Vivo, located on Cartagena (Murcia, España). The stress level has been measured in 4 different moments on the horses and in 4 different times; time control and after 0, 25 and 60 minutes of the hippotherapy training, to show the most likely effect of time on them. Measures taken in different days, for 16 weeks. After performing ANOVA, significant differences between the values obtained in the four different instants has been found. It concludes that Wireless Sensor Technologies is a good non – attached stress indicator. HR (Heart Rate), BR (Breath Rate) and CT (Corporal temperature) were also measured. All of them increased during the session of hippotherapy. So we must continue go deeply in future studies about the utility of non – attached stress indicators, because they could be extremely connect



with exercises of a hippotherapy session. Results can show us that Wireless Sensor Technologies reduces the stress on horses and it's an important progress in the evaluation of the procedure. The last parameter was valued behavior. The animals showed a peak of presence of anomalous behavior at the beginning of the session, gradually decreasing during the making of. This may be due to the degree of concentration ranging reaching animals and habituation along therapy. Therefore, it is also an excellent non-invasive indicator to measure the response to a stressor because it allows us to evaluate quickly and economically the comfort degree of animals at all the time. It has achieved the desired goal in this first phase of this study, being our next steps to continue in this line of research with deep and tireless interest.

**Key words:** Stress Parameters, Wireless Sensor Technologies, Equine-Assisted Therapy.



## **LIGAMENTO ACCESORIO (CHECK LIGAMENT) DEL TENDÓN FLEXOR DIGITAL PROFUNDO DEL CABALLO: ESTUDIO DE LA ANATOMÍA TOPOGRÁFICA**

**Guilabert, R.; Latorre, R.M.\*; López, O.M.**

**\*Autor para correspondencia:** Rafael Latorre. Email:Latorre@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: 34868884697

### **RESUMEN**

El ligamento accesorio del tendón flexor digital profundo (LA-TFDP) es una de las estructuras más importantes tanto en el aparato estático pasivo como en la fase de carga durante el movimiento en el caballo. Tanto el LA-TFDP como el ligamento accesorio del tendón flexor digital superficial (LA-TFDS) actúan durante la estación impidiendo la sobrecarga de los vientres de los músculos flexores digitales profundo y superficial respectivamente. El LA-TFDP tiene una topografía compleja por el conjunto de estructuras con las que se relaciona, motivo por el que no existen descripciones precisas del mismo. Recientemente se ha identificado en algunos animales una potencial unión de este ligamento con el tendón flexor digital superficial (TFDS). Esta unión podría tener repercusiones clínicas importantes, sin embargo, no hay evidencias anatómicas publicadas. El objetivo general de nuestro estudio ha sido contribuir a profundizar en el conocimiento de la anatomía clínica del ligamento accesorio del tendón flexor digital profundo (LA-TFDP) en el miembro torácico del caballo. En concreto, identificando, mediante técnicas de disección y secciones seriadas transparentes plastinadas, la posible relación macroscópica y microscópica del LA-TFDP con el TFDS. Se utilizaron 12 miembros torácicos de dos animales adultos y cuatro potros. La disección reglada permitió identificar la zona donde el LA-TFDP se relaciona con el TFDS. Por lo tanto, las secciones transversales se obtuvieron en dicha zona, comprendida 3cm distal a la articulación carpometacarpiana y 10 cm proximal a los huesos sesamoideos proximales. El análisis en conjunto de los planos de disección reglada y de las secciones seriadas permitió establecer la situación topográfica del LA-TFDP. Se tomaron como referencias anatómicas para la correcta descripción del LA-TFDP, la posición del tendón flexor digital profundo, el tendón flexor digital superficial, el ligamento suspensor y la vaina sinovial común de los músculos flexores. Los datos aportados sobre topografía y relaciones del LA-TFDP con otras estructuras anatómicas han permitido identificar la zona de unión con el TFDS y establecer las referencias anatómicas necesarias para su correcta identificación mediante de técnicas de diagnóstico por imagen.

**Palabras clave:** Anatomía clínica, ligamento accesorio del tendón flexor digital profundo, Tendón flexor digital superficial.

## ABSTRACT

The Accessory Ligament of the Deep Digital Flexor Tendon (AL-DDFT) is one of the most important structures in the passive static apparatus as well as during the overload phase while the horse is moving. The AL-DDFT and the superficial accessory ligament (AL-SDFT) work when the horse is not moving, avoiding the muscle's belly overload of the deep digital muscle and the superficial digital muscle respectively. The AL-DDFT has a complex topography cause of structures that are related with it, due to this it hasn't exist accurate description of it. Recently it has been identified in some animals a potential junction of this ligament with the SDFT. This junction might have important clinical repercussions, nevertheless there has not published anatomical evidences about this union. The main target of our study has been, to contribute to get deeper into the clinic anatomical knowledge about the AL-DDFT on the equine forelimb. Specifically, identifying, using dissection techniques and transparent plastid serial sections, the possibility of macroscopic and microscopic relationship between the AL-DDFT with the SDFT. It was used twelve forelimbs from two adults and four yearlings. The regulated dissection allowed us to identify the area where the AL-DDFT had some connections with the SDFT. Due to this, transverse section where obtained from the area mentioned above, located 3cm distally to the carpo-metacarpal joint and 10cm proximally to the proximal sesamoid bones. The aggregate analysis of the regulated dissection and the seriated section allowed us to establish the topographic situation of the AL-DDFT. The DDFT, SDFT, suspensory ligament and the common synovial sheath of the flexor muscles position were taken as an anatomical reference for the correct description of the AL-DDFT. The obtained data about topography and relations of the AL-DDFT with other anatomical structures, have permitted identify the junction zone with the SDFT and to establish the necessary anatomical references for its correct identification using the correct imaging diagnosis techniques.

**Key words:** Accessory ligament of the deep digital flexor Tendon, Superficial digital flexor tendon.

## ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL ÁCARO ECTOPARÁSITO *VARROA DESTRUCTOR*

Jimeno, C.; Serrano, F.; Muñoz, I.\*

\***Autor para correspondencia:** Irene Munoz. Email: irenemg@um.es, Área de Biología Animal, Universidad de Murcia. 30100 Murcia. España. Tel: +34868 88 8031

### RESUMEN

*Varroa destructor* es un ácaro ectoparásito que constituye una grave amenaza para la abeja de la miel (*Apis mellifera*). Los conocimientos disponibles sobre la genética poblacional del ácaro *Varroa* son insuficientes, por lo que en este estudio se ha analizado la variabilidad y estructura genética de tres poblaciones usando microsatélites, que son un tipo de marcadores moleculares que se hallan en el ADN del núcleo celular. Las muestras de las poblaciones citadas provienen de las islas Canarias, del sureste de la península Ibérica y de Ghana, por lo que su análisis proporciona una medida de la diferenciación entre poblaciones. También se ha analizado la variación genética intracolonia en dos colmenas del apiario del Campus de Espinardo (Murcia), para tener una estima de la variación intrapoblacional. Como cabía esperar, la variabilidad genética encontrada en todos los análisis es escasa, debido a que en la *Varroa* la mayoría de los cruzamientos se producen entre ácaros hermanos dentro de la misma celda larvaria de la abeja. Sin embargo, la variabilidad encontrada en la población de Canarias es mayor que en la población del sureste de la península Ibérica, lo que sugiere que se han analizado colmenas que provienen de abejas con orígenes geográficos diversos, unas asentadas desde hace siglos en las Islas, otras introducidas recientemente. Se han encontrado diferencias genéticas significativas entre la estructura genética de las poblacionales de *Varroa* con distinto origen geográfico. Estos datos subrayan la necesidad de realizar estudios comparativos de la estructura poblacional de este parásito y de su hospedador *Apis mellifera*, a fin de establecer los fundamentos de la relación entre la resistencia y/o tolerancia del ácaro a los tratamientos acaricidas y su capacidad infectiva, fundamentos que permitirían desarrollar estrategias efectivas de lucha contra el ácaro.

**Palabras clave:** *Varroa destructor*; ácaro; *Apis mellifera*; microsatélites; genética de poblaciones

### ABSTRACT

*Varroa destructor* is an ectoparasitic mite that threatens apiculture globally. It has been recently shown that the mite has been able to develop treatment resistance, thus increasing its chance of attacking and destroying hives. A better knowledge about its population genetics is expected to help in controlling the mite. In this study, three geographically mite populations were compared by analysing their genetic variability and structure based

on microsatellite markers. In addition, a study of the intracolony genetic variability was carried out analysing mites from two colonies of the same apiary (Campus de Espinardo, Murcia). A total of 63 mite samples were analysed coming from the southeast of the Iberian Peninsula (Campus de Espinardo, Murcia), Canary Islands and Ghana. The last two populations were sampled nine years ago, while the southeast of the Iberian Peninsula population was sampled on February 2017. Samples were conserved in pure ethanol at -20 °C. DNA was extracted following Chelex® method performed according to the manufacturer's instructions. Thirteen microsatellite loci were amplified, first individually to fine-tune the PCR reaction and subsequently through two PCR multiplex. The 13 microsatellites were divided into two PCR reactions: R6 (VD112, VD152, VD119, VD163, VD001, Vj275) and R7 (Vdes02, Vdes07, Vdes09, Vdes16, Vj292, Vj294, Vj295). PCR conditions were designed according to current standards. PCR products were sequenced by Secugen S.L. (Madrid). Genetic analyses were carried out by bioinformatics programmes GeneMapper® Software, GenAlEx 6.5, Genepop on the web 4.2, Structure 2.3.4, Structure Harvester web v0.6.94, and ARLEQUIN 3.1. As expected, genetic variability of the three mite populations was low due to the mite reproductive cycle (it should be noted that fertilization is carried out by sisters and brother inside the same larval cell of the bee). Many microsatellites were monomorphic and most individuals were homozygous. Population comparison analyses were carried out counting one individual mite from each hive, and showed higher genetic variability in the mite population from the Canary Islands. This had the highest number of: polymorphic microsatellites, genetic diversity (heterozygosity) and number of private alleles. These results are possibly due to recent introductions of foreign honeybees detected in previous studies. All tests showed significant differences between all mite populations. The Canary population appeared in disequilibrium Hardy-Weinberg, corroborating the hypothesis of introduction of phoretic mites introduced together with the foreign host honeybees in the Canary Islands. Comparison between two hives located in the southeast of the Iberian Peninsula (Campus de Espinardo, Murcia) did not show significant genetic differences. In conclusion, differences in genetic variability of *V. destructor* populations found in this study, although low, are significant across large geographic distances. These differences are likely due to both intrinsic factors of the mite concerning its resistance to treatments, and to the tolerance of the bee to the mite. Thus, it seems that it is needed the study of a large number of populations of both species, to assess patterns of parallel evolution host-parasite, and to determine alleles related with treatments to mite resistance.

**Key words:** *Varroa destructor*; mite; *Apis mellifera*; microsatellites; population genetic

## UTILIZACIÓN DE DOS FUENTES DE UREA DE LENTA LIBERACIÓN EN EL CEBO DE TERNEROS: EFECTOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO Y LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS

López, A.; Hernández, F.\*; Valverde, M.

\***Autor para correspondencia:** Fuensanta Hernández. Email: nutri@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel:+34868884745

### RESUMEN

En los últimos años ha aumentado el interés por la búsqueda de estrategias que optimicen la utilización de nitrógeno en el rumen, promoviendo así una mejora en los parámetros de crecimiento de los animales y un abaratamiento de los costes. Esto, además de aumentar las producciones, disminuiría las patologías en el animal, así como la contaminación del medio ambiente. Para ello, se están utilizando nuevas fuentes de nitrógeno no proteico como urea recubierta con matrices orgánicas o inorgánicas, denominada Urea de Liberación Lenta (ULL), que ralenticen la liberación de amoniaco ruminal. En este estudio se han evaluado dos fuentes de urea de liberación lenta (con y sin adición de enzimas) y sus efectos sobre los parámetros productivos de terneros frisonos criados en régimen intensivo. Además se ha realizado un estudio de comportamiento alimentario de estos animales. Se utilizó un rebaño de 24 machos con 5 meses de edad y un peso medio de  $223 \pm 23$  kg. Los animales fueron divididos en dos lotes homogéneos en peso según tipo de pienso (C1ULL y C2ULLE) y alojados en dos cuadras. Las dietas basadas en maíz sólo diferían en el tipo de ULL administrada, sin (C1ULL) o con (C2ULLE) enzimas. Para controlar la ingestión los comederos eran electrónicos y los terneros fueron crostalados en la oreja con un microchip para su identificación, de este modo se pudo controlar el comportamiento alimentario y la ingestión individual de los animales. Se pesaron los animales al inicio del estudio y al inicio de cada mes. Se disponía de más de 5500 datos por cuadra y mes. Con los datos del mes de Marzo se realizó el estudio de comportamiento alimentario, para ello el día se dividió en 4 franjas horarias: 00:00 a 06:00; 06:00 a 12:00; 12:00 a 18:00; 18:00 a 24:00. Los datos obtenidos fueron: n° medio de comidas al día (n°/d) por franja horaria, cantidad media de pienso consumido al día (kg/d), tamaño medio de la comida (kg/comida). Para el resto de meses solo fue analizada la base de datos para la ingestión individual total de cada ternero. El número medio de comidas o veces que los terneros van al comedero se sitúa entre 7-8 veces al día, en las horas con luz la frecuencia de alimentación aproximada es 1 vez cada dos horas. La franja horaria ha sido determinante en el comportamiento alimentario de los terneros, disminuyendo las veces que van al comedero y la ingestión de pienso ( $p < 0,001$ ) en horario nocturno (0:00 a 6:00 horas). Estadísticamente no se ha encontrado efecto del tipo de pienso sobre el número de comidas o cantidad de pienso ingerida ( $p > 0,05$ ). Respecto al tamaño de la comi-

da, cada vez que el ternero accede al comedero como media ingiere 1 kg de pienso, con extremos de 0,8 y 1,1 kg, registrándose también las comidas más pequeñas en la franja horaria nocturna ( $p < 0,001$ ). Este parámetro tampoco fue afectado por el tipo de pienso utilizado ( $p > 0,05$ ). El peso vivo de los terneros y la ganancia media diaria (GMD) no fueron afectados por el tipo de ración utilizada ( $p > 0,05$ ). Las GMD en ambos tratamientos fueron elevadas, 1,58 y 1,62 kg/d para los terneros C1ULL y C2ULLE, respectivamente, pero estaban dentro de las descritas para esta raza. El consumo medio diario (CMD) tendía a ser mayor ( $p < 0,1$ ) en los animales alimentados con la ULL con enzimas (7,63 y 8,33 kg/d para los terneros C1ULL y C2ULLE, respectivamente). Ambas circunstancias provocaron que el índice de conversión (IC) fuera mayor ( $p < 0,05$ ) en los terneros alimentados con el pienso que contenía la urea de liberación lenta suplementada con enzimas (4,68 y 5,34 kg/kg para los terneros C1ULL y C2ULLE, respectivamente). En conclusión, la adición de enzimas a una fuente de urea de liberación lenta en rumen aumentó el consumo de pienso de los terneros, aunque esto no redundó en un mayor crecimiento de los animales.

**Palabras clave:** frisonas, ganancia media diaria, índice de conversión.

## ABSTRACT

In recent years it has been increased the interest in searching strategies that optimize the use of nitrogen in the rumen, improving the parameters of animal growth and reducing the cost of rations. Besides of enhance the productions, this would decrease the pathologies in the animal, as well as the pollution of the environment. To do this, new sources of non-protein nitrogen such as urea coated with organic or inorganic matrices, called slow release urea (SRU), are being used to slow the release of ruminal ammonia. In this study were evaluated two sources of SRU (with and without enzyme addition) and their effects on the productive parameters of Holstein calves in feedlot. In addition, a dietary behavior study of these animals has been carried out. A herd of 24 males with 5 months of age and an average weight of  $223 \pm 23$  kg was used. The animals were divided into two homogenous lots using two types of rations (C1ULL and C2ULLE). Corn-based diets differed only in the type of ULL administered, without (C1ULL) or with (C2ULLE) enzymes. In order to control the ingestion, the feeders were electronic and the calves were grazed in the ear with a microchip for identification, in this way it was possible to control the feeding behavior and the individual ingestion of the animals. Animals were weighed at the beginning of the study and at the beginning of each month. More than 5500 data were available per block and month. With the data of the month of March the study of alimentary behavior was realized, for that, the day was divided in 4 time zones: 00:00 to 06:00; 06:00 to 12:00; 12:00 to 18:00; 6:00 p.m. to 12:00 p.m. The data obtained were: average number of meals per day (nr / d) by time slot, average amount of feed consumed per day (kg / d), average size of food (kg / meal). For the remaining months, only the database for total individual ingestion of each calf was analyzed. The average number of meals or times that the calves go to the feeder was between 7-8 times a day, in the light hours the approximate feed frequency is 1 time every two hours. The time frequency has been determinant in the dietary behavior of the calves, decreasing the times that go to the feeder and the feed intake ( $p < 0,001$ ) during night time (0:00 to 6:00 hours). However, statistically no effect of the type of feed on the number of meals or amount of feed intake ( $p > 0,05$ ) was found. Regarding the size of the food, each time the calf accesses to the feeder, it consumes approximately 1 kg of feed, with extremes of 0.8 and 1.1 kg, also registering the smaller meals in the night time zone ( $p < 0,001$ ). This parameter was not affected by the type of feed used ( $p > 0,05$ ). Live weight of calves and average daily gain (ADG) were not affected by the type of ration used ( $p > 0,05$ ). ADG in both treatments were elevated, 1,58 and 1,62 kg / d for calves C1ULL and C2ULLE, respectively, but they were within those described for this breed. The average daily intake (ADI) was higher ( $p < 0,1$ ) in the animals fed the ULL with enzymes (7.63 and 8.33 kg / d for calves C1ULL and C2ULLE, respectively). Both of these circumstances led to a higher conversion index (CI) in calves fed the feed containing the slow release urea supplemented with enzymes (4.68 and 5.34 kg / kg for Calves C1ULL and C2ULLE, respectively). In conclusion, the addition of enzymes to a source of slow-release urea in rumen increased the feed intake of calves, although this did not represent a growth of the animals.

**Key words:** Frisians, average daily gain, feed conversion ratio.



## EFECTO DE LA INTENSIFICACIÓN DE ORDEÑO SOBRE EL BIENESTAR DE VACAS LECHERAS

López, M.\*; Martínez, S.

\***Autor para correspondencia:** Marina López. Email:marina.lopez9@um.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

### RESUMEN

Actualmente, en el sector de vacuno de leche se tiende a mejorar la eficiencia productiva ya que esta es determinante para la viabilidad de las explotaciones. La intensificación del ordeño es una forma de aumentar la eficiencia productiva de las explotaciones, pero esta intensificación puede afectar a multitud de parámetros productivos e incluso al bienestar de los animales. En la actualidad, se desconocen las repercusiones que una intensificación del ordeño puede tener sobre el estrés en las vacas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la repercusión que puede tener el incremento de 3 a 4 ordeños diarios durante los primeros 21 días de la lactación sobre el estrés en vacas primíparas. Para el estudio se emplearon 20 novillas frisonas de una explotación industrial, 10 se sometieron a un ritmo de cuatro ordeños diarios (4X) separados 6 horas, y otras 10 formaban el grupo control, sometidas a la rutina de ordeño habitual de la explotación, tres ordeños diarios (3X) a intervalos de 8 horas. Los animales de ambos grupos fueron alimentados ad libitum dos veces al día con la misma ración. Se recogieron muestras de heces el día del parto y a los 21 días postparto, y se conservaron congeladas hasta ser procesadas. Posteriormente, de las muestras de heces fueron extraídos los glucocorticoides fecales y analizados mediante las técnicas RIA, e IMMULITE. Tras el análisis de los resultados se observó que a los 21 días de ordeño, en vacas ordeñadas 3X y 4X los niveles de glucocorticoides fecales fueron  $19,27 \pm 2,31$  ng/g y  $24,50 \pm 2,19$  ng/g de heces secas, respectivamente;  $P = 0,109$  al analizar mediante RIA, y  $0,468 \pm 0,32$  ng/mg y  $0,442 \pm 0,15$  ng/mg, respectivamente;  $P = 0,959$  al analizar mediante IMMULITE. Los niveles de glucocorticoides fecales el día del parto fueron mayores significativamente ( $P < 0,001$ ) respecto a los obtenidos a los 21 días postparto con ambas técnicas ( $58,45 \pm 8,93$  ng/g y  $41,71 \pm 8,93$  ng/g en vacas 3X y 4X, respectivamente con RIA, y  $0,15 \pm 0,051$  ng/mg y  $0,16 \pm 0,049$  ng/mg, en vacas 3X y 4X, respectivamente con IMMULITE). De los resultados concluimos que incrementar la frecuencia de ordeño de 3 a 4 veces al día durante los primeros 21 días de lactación, no aumenta el nivel de glucocorticoides fecales a los 21 días postparto en vacas de primer parto, lo que hace suponer que esta intensificación de ordeño no incrementa el estrés en las vacas. Por otra parte, el nivel de glucocorticoides fecales analizados mediante RIA e IMMULITE en vacas de primer parto es mayor el día del parto que a los 21 días postparto.

**Palabras clave:** ordeño, estrés, vacas leche.

## ABSTRACT

In dairy cattle there is currently a trend to improve production efficiency as it is decisive for the viability of farms, and in order to remain competitive in the dairy sector. The intensification of milking is one way to increase the productive efficiency of farms. It is accepted, in a general way that a high frequency of milkings is necessary to keep high milk production, but this intensification may affect many production parameters (milk composition, nutritional status of the animal, somatic cell count, etc...) and even animal welfare. Assure animal welfare on farms is of increasing importance, it has become a public concern, it is also essential to improving the efficiency of production is the most important for the viability of farms factor. The objective measurement of animal welfare is a complex process, requiring combine physiological, productive and behavioural indicators related to the presence of stress, since the lack of welfare leads to the appearance of stress. In response to stress, the body triggers various endocrine responses, inducing changes in the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis and adrenal- sympathetic system. Cortisol is one of the most biomarkers used to evaluate stress in all animal species, when released into the bloodstream can cause a crowd of biological effects, including changes in the metabolism of carbohydrates and proteins, impaired growth and reproduction, and the immune system function. Milking generally has been studied from the outlook of production. There are few studies that evaluate the stress on the animals milking routine. At present, the impact of an intensification of milking can have on stress in dairy cows it is unknown. The goal of this work was to study the impact that may have increased three to four milkings a day during early lactation on stress in primiparous cows. For the study 20 Friesian heifers randomly industrial farm chosen were employed, 10 were subjected to a rate of 4 milkings per day (4X), at intervals of 6 hours and the other 10 formed the control group, subjected to routine regular milking farm of three daily milkings (3X) at intervals of 8 hours. The animals of both groups were fed twice a day with the same ration. Stool samples were collected on the day of delivery and at 21 days postpartum, and stored frozen until processing. Later stool samples were extracted and analyzed fecal glucocorticoid by the IMMULITE and RIA techniques. After analysing the results it was observed that at 21 days of milking in cows milked 3X and 4X fecal glucocorticoid levels were  $19.27 \pm 2.31$  ng / g of dried feces and  $24.50 \pm 2.19$  ng / g, respectively;  $P = 0.109$  when analyzed by RIA, and  $0.468 \pm 0.32$  ng / mg and  $0.442 \pm 0.15$  ng / mg, respectively;  $P = 0.959$  when analyzed by IMMULITE. Fecal glucocorticoid levels the day of delivery were significantly higher ( $P < 0.001$ ) compared to those obtained at 21 days postpartum with both techniques ( $58.45 \pm 8.93$  ng / g and  $41.71 \pm 8.93$  ng / g RIA respectively, and  $0.145 \pm 0.051$  ng / mg and  $0.158 \pm 0.049$  ng / mg, respectively for IMMULITE). Although measurement of stress is a complex process that involves the use of many markers and we focus only on the fecal glucocorticoid measurement using two different techniques; mainly corticosterone levels by RIA and cortisol by IMMULITE. From the results of this study we conclude that increasing the frequency of milking three to four times a day during the first 21 days of lactation, does not increase the level of fecal glucocorticoid at 21 days postpartum in first calving cows, which it suggests that this intensification of milking does not increase stress in dairy cows therefore not harm their welfare. Moreover, the level of fecal glucocorticoids analyzed by RIA and IMMULITE in first calving cows is greater the day of delivery that at 21 days postpartum, indicating that labor is the most stressful for cows in our study time.

**Keywords:** milking, stress, dairy cow

## PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA FRENTE AL VIRUS INFLUENZA PORCINO

López, M.; Ramis, G.; Pallarés, F.J.\*

\***Autor para correspondencia:** F.J. Pallarés. Email: pallares@um.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: 34868884336

### RESUMEN

Se realiza la puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica (IHQ) de tipo indirecto, mediante el protocolo descrito por HSU et al. (1981) sobre el Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC). Esta se realiza con el empleo de un anticuerpo monoclonal frente al virus influenza A (o anticuerpo primario) para los serotipos H1N1, H2N2, H3N2 y H5N1 (inoculado en ratón); 100µL, es una nucleoproteína de IgG (Figura 1). Dicho anticuerpo se diluye a diferentes concentraciones, para evaluar cuál de ellas es la que proporciona mejores resultados. Las diluciones que se quiere evaluar son las de 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 y 1:2000. De las cuales, la dilución que, a menor concentración de anticuerpo, mostró los mejores resultados fue la 1:500, seleccionándose esta como estándar para la puesta a punto de la técnica IHQ. También se pretende evaluar la efectividad de diferentes sustancias para el desenmascaramiento enzimático, las cuales son pronasa, tween20 y urea, obteniendo el mejor resultado el ensayo con pronasa, por lo que esta fue la sustancia seleccionada para su inclusión en la técnica IHQ evaluada. La IHQ se realiza sobre tejido pulmonar fijado con formol al 10% e incluido en parafina, cortado y preparado en portaobjetos para su tratamiento. Finalmente, se obtiene una puesta a punto satisfactoria de la técnica evaluada.

**Palabras clave:** Virus Influenza A porcino; diagnóstico; inmunohistoquímica.

### ABSTRACT

The aim of this dissertation is to provide an efficient swine influenza diagnose, fitting the specific diagnose technique in certain conditions. Likewise, it has the purpose of fulfilling the demands of clinic veterinarians that refer lung tissue samples (mainly fixed with formaldehyde) to the pathological anatomy laboratory on Murcia's University to detect the mentioned disease. The object is to find a quick and correct diagnose of the infectious process. The detection of this illness is of highly importance due to epidemiological, economical and public health facts. The diagnostic method to adequate the immunohistochemistry technique, which can be define as "the in situ identification of a tissue constituent (antigen), by a specific antigen-antibody reaction visualized with a coloured indicator". This method provides complementary information to the ordinary histopathological study, of highly specificity and it is an extremely demanded test by clinic veterinarians. Therefore, the indirect

immunohistochemistry technique adequation is done through the described protocol by HSU et al. (1981) about "The use of the Avidin-Biotin-Peroxidase compound (ABC) in immunoperoxidase techniques", of which is desired to prove the efficiency of different primary antibody solutions as well as the treatment with different substances that would cause the enzymatic unmasking of the sample. This is done with the use of a monoclonal antibody against A influenza (or primary antibody) for H1N1, H2N2, H3N2 and H5N1 serotypes (mouse inoculated); 100 $\mu$ L, is an IgG nucleoprotein (Figure 1). The used antibody is effective at the dilution in which it is commercially available, however, it is very interesting to achieve the same diagnostic effect with a smaller amount of it, which means dissolving it until obtaining an effective dilution with the smallest possible amount of this substance. This provides the opportunity for greater utilization of the purchased doses, and therefore an economic saving when processing a larger number of samples with the same amount of antibody. The mentioned antibody is, therefore, diluted to different concentrations (1: 100, 1: 200, 1: 500, 1: 1000 and 1: 2000) of which the dilution with the lowest concentration of antibody, showed the best results was 1: 500, being selected as a standard for the development of the IHQ technique. Also, the evaluation of the effectiveness of different enzymatic unmasking techniques has also been carried out. This is a step inside the IHQ technique, which aims to eliminate the denatured proteins by the formaldehyde that remain on the surface of the tissue causing a worse vision and turbidity in the sample. They were chosen for the evaluation of the treatments with pronasa, tween20 and urea, obtaining the best result the test with pronasa, reason why this substance was selected for the use of IHQ. Therefore, it's performed, the protocol described in the article by HSU et al., With the different indicated dilutions and with the pronase treatment on samples of formalin fixed lung tissue, which come from pigs positive to swine flu facilitated by Dr. FJ Salguero, of the University of Surrey, United Kingdom; To which are attached other «problem» samples suspected of coming from pigs infected with the swine influenza virus. The results obtained after the tests are satisfactory. Positive marking against influenza virus was characterized by brown staining in the cytoplasm of epithelial cells of bronchi and bronchioles (Figures 2, 3 and 4). The results were undeniable positive up to the 1: 500 dilution of the primary antibody. At higher dilutions, (1: 1000 and 1: 2000) the interpretation of the positivity of the samples was somewhat doubtful; therefore, in view of the need to choose a dilution, effective and with the minimum number of antibodies possible, the 1: 500 dilution was selected as standard for subsequent use in diagnostic tests. Consequently, the desired immunohistochemical technique has been successfully developed, which allows us to respond to the demand of clinical veterinarians to make a correct definitive diagnosis for this disease. In addition, another advantage is the opportunity to perform this same technique in stored samples from past years, giving the possibility of retrospective studies of the disease, either with statistical intentions to determine in which percentage of cases the virus is found, or to the simple resolution of cases that were not correctly diagnosed at the time, precisely because of the lack of this technique.

**Key words:** Swine Influenza A virus; diagnosis; immunohistochemistry.

## EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA RACIÓN CON UREA DE DEGRADACIÓN LENTA Y ENZIMAS SOBRE LOS ÍNDICES PRODUCTIVOS DE TERNEROS EN CEBO Y LA PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*

Morales, E.; Madrid, J.\*; López, M.J.

\***Autor para correspondencia:** Josefa Madrid. Email: alimen@um.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34868884750

### RESUMEN

En los últimos años, el mercado de materias primas para piensos se ha visto sometido a fluctuaciones de precios que han tenido un gran impacto en los costes de producción del cebo de terneros. Para minimizar estos efectos negativos, una estrategia es la inclusión de urea en las raciones, debido a su bajo coste y a las posibilidades de reemplazar parcialmente materias primas proteicas que generalmente son caras. Las ureas de liberación lenta tienen un uso más seguro que la urea no protegida, si bien todavía su utilización no está optimizada. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la suplementación de la ración con urea de degradación lenta (ULL) y enzimas sobre los índices productivos de terneros en cebo y la cinética de degradación ruminal de las raciones. Se han realizado dos experimentos, uno *in vivo* y otro *in vitro*. En la prueba *in vivo* se utilizaron 45 terneros, con un peso inicial de  $455,3 \pm 36,37$  kg, que fueron distribuidos aleatoriamente en 4 corrales. El periodo experimental tuvo una duración de 64 días, diseñando dos programas de alimentación de dos fases (crecimiento de 28 días y acabado de 36 días). Cada programa correspondió a un tratamiento: un tratamiento control que incluía en la ración ULL, y otro que incorporaba conjuntamente ULL+enzimas. Los animales dispusieron de pienso y paja *ad libitum*. Durante la prueba se controló la ganancia media diaria de peso (GMD), el consumo medio diario (CMD), y los índices de conversión (IT) de los animales. En el experimento *in vitro*, se incubaron en condiciones de anaerobiosis y a 39°C las muestras de los piensos con medios de líquido ruminal enriquecidos con ULL, y ULL+enzimas, registrándose la producción de gas a las 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72 y 96 horas con un lector de presión, así como la degradación de la materia seca a las 96 horas. Los resultados de la prueba *in vivo* indicaron que no hubo efecto significativo de la incorporación de enzimas, sobre el peso vivo, la GMD, CMD e IT de los terneros, tanto en el periodo de crecimiento o finalización, como tampoco en el periodo global del experimento ( $P > 0,05$ ). En la prueba *in vitro*, tampoco se observaron efectos significativos de la suplementación de ULL+enzimas sobre la cinética de producción de gas, o la degradación de la materia seca ( $P > 0,05$ ). En conclusión, en las condiciones ensayadas, la suplementación con extractos enzimáticos de las raciones de terneros que contienen ULL no afecta los índices productivos de los animales, así como tampoco la producción de gas *in vitro* o la degradación de la materia seca.

**Palabras clave:** terneros, urea de degradación lenta, enzimas.

## ABSTRACT

In Spain the beef cattle sector represents 17.1% of final livestock production, which, with respect to its economic value places us in the fifth position in the European Union. In recent years the market of raw materials for feeding has been subjected to price fluctuations that have had a major impact on production costs in livestock production. To minimize these negative effects, one of the strategies is the inclusion of urea in rations, due to its low cost and the possibility of partially replacing protein raw materials that are generally expensive. The Slow Release Urea (SRU) has a safer use than unprotected urea, which due to its possible toxicity limits its use, although the use of SRU has not yet reached its maximum efficiency in beef cattle. Thus, the objective of the present work was to study the effect of dietary supplementation of the ration with slow degradation urea and enzymes on productive indexes in beef bull, and on the kinetics of ruminal degradation of rations using a method of gas production. For the development of the work two experiments have been performed, one *in vivo* and another *in vitro*. In the *in vivo* test 45 Spanish and Limousin crossbred bulls, with an initial mean weight of  $455.3 \pm 36.37$  kg, which were randomly distributed in 4 pens were used. The experimental period had a total duration of 64 days, designing two feeding programs of two phases (growth of 28 d and finishing of 36 d). Each programme corresponded to an experimental treatment: a control treatment that included SRU in the ration, and another that incorporated all at once SRU+enzymes. The animals had feed and straw ad libitum. During the test, productive parameters such as average daily weight gain (DWG), average daily intake (ADI), and feed conversion ratio (FCR) of animals were monitored. Also, an *in vitro* experiment was carry out, in which samples of the growing phase feeds enriched with SRU, and SRU+enzymes were incubated under anaerobic conditions and at 39°C with ruminal liquid and artificial saliva. The feeds were studied together with “blank” samples that did not contain feed, and placed in 16 bottles (8x2 batches), being the gas production recorded at 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72 and 96 hours with a pressure reader. The accumulated gas production over time was using to estimate the kinetic parameters of gas production according to the exponential equation:  $G = A [1 - e^{-c(t-L)}]$ . At 96 h, the incubation was stopped and degraded dry matter was dertermined. The results of the *in vivo* experiment indicated that there was no significant effect of the incorporation of enzymes, on the live weight, the DWG, ADI and FCR of the beef bulls, either during the growing or finishing period, nor in the overall period of the experiment ( $P > 0.05$ ). In the *in vitro* experiment, no significant effects of SRU+enzyme supplementation on gas production kinetics or dry matter degradation ( $P > 0.05$ ) were observed. In conclusion, under the conditions tested, supplementation with enzymatic extracts in the beef bull rations containing SRU does not affect the productive rates studied in the animals, nor does the production of *in vitro* gas or the degradation of dry matter, but more studies must be performed to clarify the function of enzymes+SRU on beef cattle feeding and ruminal metabolism.

**Key words:** beef bull, slow release urea, enzymes.

## LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS EN PULMONES DE CORDERO DECOMISADOS EN MATADERO

Navas-Coronel, B.; Bernabé-Salazar, A.\*; Sánchez-Martínez, P.; Gómez-Sánchez, M.A.

\***Autor para correspondencia:** Antonio Bernabé. Email: abernabe@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: 34868884705.

### RESUMEN

Este trabajo está basado en el estudio anatomopatológico de las alteraciones pulmonares de 57 corderos, cuyos pulmones fueron obtenidos entre los meses de marzo y abril del año 2017 en los mataderos de Orihuela y Torre Pacheco. Además, se obtuvieron 93 pulmones más decomisados de las mismas partidas de los cuales no se realizaron estudios histológicos, pero que han servido para el estudio de las incidencias de las distintas enfermedades y su distribución en los diferentes lóbulos pulmonares durante el estudio macroscópico de estos. Durante estos dos meses y en las partidas de donde se obtuvieron las muestras se sacrificaron un total de 685 animales de los cuales se decomisaron el 21.85% de los pulmones. Los pulmones decomisados proceden de cuatro explotaciones diferentes (Cartagena, Murcia, Valencia y Granada) destinadas al cebo de estos animales para la producción de carne de cordero con una edad menor o igual a los 4 meses. La mayoría de las muestras fueron recogidas y procesadas en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, donde se anotaron todos los datos referentes a cada muestra, como la procedencia, la edad y las características macroscópicas, para posteriormente proceder a la toma de imágenes macroscópicas y recogida de muestras con fijación de las mismas en formalina al 10%. El resto de muestras recogidas en el “Matadero Industrial de Torre Pacheco S.L.”, fueron fotografiadas y fijadas en formalina in situ, recogiendo los datos de los daños macroscópicos al mismo tiempo. Una vez fijadas las muestras se procedió a su procesamiento y tinción con hematoxilina-eosina (H-E), para su posterior estudio microscópico. La clasificación macroscópica ha tenido en cuenta el aspecto externo de 150 pulmones y su superficie de corte donde se han diferenciado zonas de consolidación en un 95.33% de los pulmones, pleuritis en un 12.66%, hemorragias en un 13.33% y nódulos (parasitarios, purulentos e hiperplasia linfoide) en un 22%. Las lesiones microscópicas se han clasificado en 3 grupos generales: trastornos de la capacidad aérea (32.48%), trastorno de la circulación (18.89%) y trastornos inflamatorios (48.50%). Dentro de estos grupos se han identificado diferentes lesiones, siendo las más destacadas la neumonía enzoótica presentándose en 50 de 57 pulmones y zonas de atelectasia y enfisema en 56 de 57 pulmones estudiados. Este hecho es normal, ya que la neumonía enzoótica conlleva estos procesos en el 100% de los casos, además de ser un daño secundario a multitud de etiologías lesionales pulmonares diferentes. Hay que resaltar que el 59.64% de los pulmones estudiados han presentado más de una lesión concomitante aumentando así el número total de lesiones hasta 237. Se ha visto una relación entre las lesiones macroscópicas y microscópicas, percibiéndose

macroscópicamente el tipo de lesión y su cronicidad en la mayoría de los casos aportándonos gran ayuda a la hora de la interpretación histopatológica. Gracias a esta relación existente entre las lesiones macroscópicas y microscópicas se han podido estudiar un mayor número de pulmones únicamente macroscópicamente utilizando estos datos para conocer la distribución de las distintas lesiones y la incidencia de estas. No se han detectado lesiones compatibles con enfermedades zoonóticas en ninguno de los pulmones estudiados, al igual que no se han detectado parásitos, aunque si lesiones compatibles con la presencia previa de estos agentes. El decomiso de pulmones de cordero en matadero no tiene una repercusión económica significativa en el sector cárnico, pero son estos órganos la segunda víscera con mayores decomisos tras el hígado. La información obtenida mediante la realización de este trabajo puede ser de gran utilidad para conocer las principales causas de decomisos de pulmones, haciendo ver tanto a veterinarios como ganaderos la existencia de enfermedades subclínicas que, aunque no causan mortalidad, si aumenta la morbilidad repercutiendo económicamente en el sector.

**Palabras clave:** Pulmón, decomiso, matadero, anatomía patológica, estudio histopatológico, ovino, cordero.

## ABSTRACT

This work is based on the anatomopathological study of the pulmonary alterations of 57 lambs. Their lungs were obtained between March and April of 2017 in the slaughterhouses of Orihuela and Torre Pacheco. 93 additional seized lungs, without histological studies, were obtained to study the incidence of different diseases and their distribution in several lung lobes during their macroscopic study. In these two months, 685 animals were sacrificed and only the 21.85% of the lungs were seized. The seized lungs from four different farms (Cartagena, Murcia, Valencia and Granada) were used to feed animals to produce lamb meat with the age of 4 months or less. Most of the samples were collected and processed in the veterinary faculty of the University of Murcia and different data were written down such as origin, age and macroscopic characteristics. Afterwards, macroscopic images were taken and the collected samples were fixed in 10% of formalin. The rest of the collected samples in the "Industrial Slaughterhouse of Torre Pacheco S.L", were photographed and fixed in formol in situ. At the same time, data from macroscopic damages were written down. Once the samples were fixed, they were processed and stained with H-E (hematoxylineosin) for subsequent microscopic study. Macroscopic lesions were classified into 3 types of injuries seen outer surface and cutting surface of 150 lungs. Consolidation zones with 95.33%, pleuritis with 12.66%, hemorrhages with 13.33% and nodules (parasitic, purulent and lymphoid hyperplasia) with 22%. Microscopic lesions were classified into 3 groups: air capacity disorders (32.48%), circulation disorders (18.89%) and inflammatory disorders (48.50%). Different lesions were identified within these groups. The most outstanding was enzootic pneumonia (50 of 57 lungs) and pulmonary atelectasis (56 of 57 lungs). This fact is normal because enzootic pneumonia leads to pulmonary atelectasis in 100% of cases. Moreover, atelectasis is a secondary damage for multitude of different pulmonary lesion etiologies. It should be noted that 59.64% of the lungs studied presented more than one concomitant lesion at the same time, increasing the total number of lesions to 237. It was seen a relationship between the macroscopic and microscopic lesions. In most cases, it was perceived macroscopically the type of lesion and its chronicity. This allowed us to understand histopathologically the samples. For this connection between macroscopic and microscopic lesions we can examine greater number of lungs only with macroscopic methods. With this information we can know the distribution and incidences of these lungs lesions. No compatible lesions with zoonotic diseases and parasites were detected in any of the lungs studied. Instead, lesions compatible with the previous presence of these agents were detected. The confiscation of lamb lungs in a slaughterhouse does not have a significant economic impact on the meat sector, but these are the second largest viscera with seizures after the liver. The information obtained by carrying out this work can be very useful to know the main causes of seizure of the lungs. In this way, veterinarians and herdsmen can see the existence of subclinical diseases that although they do not cause mortality, can affect economically in the sector if the morbidity increases.

**Key words:** Lung, seizure, slaughterhouse, pathological anatomy, histopathological study, sheep and lamb.



## ESTUDIO DE LA ETIOLOGÍA ASOCIADA AL COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO EN ESPAÑA

Pérez, F.; Pallarés, F.J.\*; Gómez, S.

\***Autor para correspondencia:** Francisco José Pallarés. E-mail: pallares@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34868884336

### RESUMEN

Las enfermedades respiratorias en el ganado porcino suponen pérdidas millonarias al sector debido a la cantidad de bajas que producen, el retraso en el crecimiento de los animales y los costes asociados a los tratamientos. Por tanto, y teniendo en cuenta que España se encuentra entre las primeras potencias mundiales y europeas en la producción de ganado porcino, es de vital importancia mejorar el estudio de estos procesos para ayudar a la mejora y crecimiento del sector. El complejo respiratorio porcino (CRP) es la manifestación clínica de la actuación conjunta de varios agentes patógenos, asociado a deficiencias en las condiciones ambientales y estrategias de manejo. La etiología de este proceso es muy variable, ya que existe una gran cantidad de patógenos que se asocian a este síndrome. Sin embargo, en la mayoría de ocasiones, suelen estar implicados uno o dos virus (PCV2 y virus PRRS en la mayoría de los casos), *Mycoplasma hyopneumoniae* y varias bacterias oportunistas. La lucha frente a este proceso debe centrarse en identificar los patógenos que están actuando dentro de la explotación, diferenciar los agentes primarios y los oportunistas, y establecer las estrategias de lucha adecuadas frente a ellos, profilácticas y terapéuticas, a la vez que detectar y solucionar los posibles problemas ambientales o de manejo que puedan favorecer el desarrollo del proceso respiratorio. Como en cualquier proceso, debemos ser rigurosos a la hora de hacer el diagnóstico del CRP. Identificar de forma adecuada cuales son los patógenos implicados nos ayudará a realizar una correcta labor de manejo y control del mismo. Asimismo, poder esclarecer cuales son los agentes primarios y cuales son los oportunistas, nos proporcionará la información necesaria para la prevención de futuros brotes. Para ello es necesario realizar un correcto examen anatomopatológico y unas técnicas complementarias, como pueden ser la PCR-rt o la inmunohistoquímica. En este sentido, parece ser que *M. hyopneumoniae* se sitúa como principal agente iniciador y potenciador del proceso, que favorece la acción patógena de otros agentes etiológicos y además potencia la acción y duración de los mismos. En este estudio se ha observado que las lesiones predominantes son la neumonía broncointersticial (37,8%), la neumonía intersticial (30,5%) y la bronconeumonía purulenta (20,7%). En cuanto a la aparición conjunta de lesiones se ha visto que la combinación de bronconeumonía purulenta, neumonía broncointersticial y neumonía intersticial es la más frecuente (30%) seguido de la combinación de bronconeumonía purulenta y neumonía broncointersticial (23,33%). Por último, al realizar los métodos analíticos correspondientes, pudimos esclarecer cuales son los patógenos con mayor implicación en los casos de CRP en el territorio nacional. De esta manera vimos como PCV2, *M. hyopneumoniae* y virus PRRS son los agentes etiológicos que tienen un mayor índice de aparición, con un 60%

los dos primeros y un 50% el tercero. La forma de presentación más frecuente en los casos de CRP es la provocada por la acción conjunta de estos tres agentes con bacterias oportunistas, con una tasa de aparición del 33,33%.

**Palabras clave:** complejo respiratorio porcino, neumonía, etiología.

## ABSTRACT

Swine industry in Spain has a great importance in the country's economy, since it represents 12.7% of the Agrarian Final Production of the same. In addition, the pig sector occupies the first place in the livestock productions, which represent around 38% of the final agricultural production, reaching 36.4% of the final cattle production. World widely speaking, Spain is the third largest producer of pigs (after China and the US), while at European level, Spain ranks first in production with a total of 3.9 million tonnes in 2015, and is the first EU country in European census, with more than 19% of the community census. With these production data, we understand the weight of the sector in the country's economy and, therefore, the great importance of maintaining the health and welfare of pigs during their productive period. The respiratory processes represent a million dollar losses to the sector due to the difficult task of diagnosis and control, also due to the large number of pathogens that can cause disease and, in the vast majority of cases, appear simultaneously during the pathological process. The porcine respiratory disease complex (PRDC) is the clinical manifestation of the joint action of several pathogens, associated with deficiencies in environmental conditions and management strategies. PRDC is a very frequent pathological process in pig farming, and one of the major causes of economic losses in pigs. It causes tissue damage and alterations in the functioning of the respiratory system, triggering high rates of morbidity and mortality during the productive period of the pig, and for this it becomes more relevant in transition animals and bait, with a higher incidence between 12-20 weeks old. The pathogens involved in PRDC are many and their associations vary in time and within each production system. In most cases, one or two viruses, *Mycoplasma hyopneumoniae* and several opportunistic bacteria are usually involved. In carrying out this study at the national level, we can get a general overview of which pathogens have the greatest incidence in cases of PRDC in Spain. The fight against this process should focus on identifying the pathogens that are operating within the farm, differentiating primary and opportunistic agents, and establishing appropriate strategies to fight against them, prophylactic and/or therapeutic, while detecting and trying to solve the possible environmental or management problems that may favor the development of the respiratory process. As in any process, we must be rigorous when making the PRDC diagnosis. Proper identification of the pathogens involved will help us to perform a correct management and control work. Also, being able to clarify which are the primary agents or initiators of the process, and which are the opportunists or who have appeared a posteriori, will provide us with the necessary information for the prevention of future outbreaks. For this, it is necessary to perform a correct anatomopathological examination and correct complementary techniques, such as PCR-rt or immunohistochemistry. In this sense, *M. hyopneumoniae* appears to be the main initiating agent and potentiator of the process, since it favors the occurrence of the rest of etiological agents and also enhances the action and duration of the same. It should be also mention the importance of establishing correct management and control patterns against the different pathogens in farms since, as observed in the study, despite the fact that PCV2 is a virus against which practically all vaccination guidelines are established of farms in Spain, and it still remains as one of the two viruses with the greatest implication in cases of PRDC at the national level, which implies that there are flaws in the fight and control of this pathogen. In this study, the predominant lesions were bronchointerstitial pneumonia (37.8%), interstitial pneumonia (30.5%) and purulent bronchopneumonia (20.7%). As for the joint appearance of lesions, it has been seen that it is the combination of suppurative bronchopneumonia, bronchointerstitial pneumonia and interstitial pneumonia that appears most frequently, with 30% of the time, followed by the combination of purulent bronchopneumonia and bronchointerstitial pneumonia, with a 23.33% occurrence. Finally, when performing the corresponding analytical methods, we were able to clarify which pathogens are most involved in cases of PRDC in the national territory. Thus, PCV2, *M. hyopneumoniae* and PRRS virus are the etiological agents that have a higher rate of onset, with 60% the first two and 50% the third. In addition, it is the joint appearance of these three agents, together with the appearance of opportunistic bacteria, the most prevalent form of presentation in PRDC cases, with a rate of onset of 33.33%.

**Key words:** respiratory disease complex, pneumonia, aetiology

## **EVALUACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL EN LEOPARDOS (*PANTHERA PARDUS KOTIYA*), SURICATAS (*SURICATA SURICATA*), CERCOPITECOS (*CERCOPITHECUS NEGLECTUS*), COLOBOS (*COLOBUS GUEREZA*) Y LEONES (*PANTHERA LEO*) EN UN PARQUE ZOOLOGICO**

**Portugués, M.; Hevia, M.L.\***

**\*Autor para correspondencia:** M<sup>a</sup> Luisa Hevia Méndez. Email:hevia@um.es Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

### **RESUMEN**

El enriquecimiento ambiental tiene como objetivo principal la mejora del bienestar de los animales, pues produce un incremento de la variabilidad de conductas naturales y una disminución del tiempo empleado en la realización de estereotipias. Para garantizar el bienestar de los animales, éstos deben encontrarse en un estado satisfactorio de salud, tanto de manera física como emocionalmente. Por ello, cada vez es más común en los zoológicos la utilización de material de enriquecimiento con animales salvajes en cautividad, pues supone un desafío cognitivo y favorece la expresión de comportamientos propios de la especie. La hipótesis que plantea el presente trabajo consiste en comprobar si el empleo de enriquecimiento ambiental en los leopardos (*Panthera pardus kotiya*), suricatas (*Suricata suricatta*), cercopitecos (*Cercopithecus neglectus*), colobos (*Colobus guereza*) y leones (*Panthera leo*) del parque zoológico Terra Natura de Murcia sirve para mejorar las condiciones de vida de dichos animales. Para llevar a cabo este estudio se realizaron 15 etogramas por cada especie, tanto con enriquecimiento ambiental como sin éste. Mediante observación directa y durante un periodo total de 20 minutos se registraron las conductas llevadas a cabo por los animales, dividiéndose éstas en: comportamientos activos, comportamientos inactivos, comportamientos agonísticos y estereotipias. Los enriquecimientos utilizados fueron diseñados en función de las características biológicas de cada animal, pudiendo ser de tipo comestible, olfativo, manipulable, destructible o una combinación de éstos. Aunque los materiales empleados para su fabricación eran reciclados, la seguridad de los animales estaba siempre garantizada, pues se rechazaron aquellos componentes que pudieran suponer un mínimo riesgo para la integridad de los animales. Los resultados del estudio mostraron un claro incremento de los comportamientos de actividad y comportamientos agonísticos, considerados conductas naturales. Por otro lado, se observó un descenso en la frecuencia de aparición de los comportamientos de inactividad y las estereotipias. Sin embargo, se apreciaron diferencias entre especies, ya que solo realizaban estereotipias los leopardos, las suricatas y los cercopitecos. Además, dentro de los leopardos, existía una desigualdad entre individuos, pues cada uno

presentaba un tipo de estereotipia con mayor frecuencia. En conclusión, el estudio etológico de estos animales con el uso de enriquecimiento ambiental puso de manifiesto que su empleo incrementa el bienestar. Sin embargo, para que éste sea efectivo, debe diseñarse para cada especie en concreto, pues debe tenerse en cuenta la biología de cada animal. Asimismo, debe variarse para que los animales no se habitúen a él y deje de producir el efecto beneficioso buscado.

**Palabras clave:** enriquecimiento ambiental, bienestar animal, estereotipias, parque zoológico, animales salvajes en cautividad.

## ABSTRACT

The main objective of environmental enrichment consists on the improvement of the animals' welfare. This is achieved due to the increasing of natural behaviours' variability, and diminution of time dedicated to stereotypies within the habitual performance of the animals. In order to grant the animals' welfare, it is mandatory to make sure that they are in a satisfactory health condition, both emotionally and physically. This is the reason why using enrichment material with wild animals in captivity is more usual in zoos nowadays, as it represents a cognitive challenge and favours the expression of the species distinctive features. Taking all this into account, the hypothesis formulated in this paper consists on proving if the use of environmental enrichment in leopards (*Panthera pardus kotiya*), meerkats (*Suricata suricatta*), De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*), mantled guereza (*Colobus guereza*) and lions (*Panthera leo*) of the zoo Terra Natura, located in Murcia, helps improving life conditions of the said animals. To carry out this study, 15 ethograms were elaborated for each species, both with environmental enrichment and without it. By means of direct observation, and for a total period of 20 minutes, the behavioural patterns were recorded and divided in: activity behaviours, inactivity behaviours, agonistic behaviours and stereotypies. The enrichments used were designed considering the biological characteristics of each animal, being these classified into feeding, olfactory, manipulative, destructible enrichment, or a combination of some of these types. Even though the materials used for the enrichments were all recycled, our main concern was always the animals' safety and welfare. Therefore, all the components that could represent the slightest risk for the animals were discarded. The results of this study showed a significative increase of the activity behaviours and agonistic behaviours, considered to be natural performances of the aforementioned animals. Furthermore, a decrease in the frequency of occurrence of the inactivity behaviours and stereotypies was observed. Nevertheless, some differences were appreciated among species, as the stereotypies were only performed by leopards, meerkats and De Brazza's monkeys. Moreover, regarding the leopards, we found a clear inequality among individuals, since each one of them showed a different stereotypie with a higher frequency. In conclusion, the ethological study of these animals when the environmental enrichment techniques are applied brings light to the fact that its use increases their welfare. However, to ensure its effectiveness, it must be specifically designed for each species taking into account the biological features of each animal. In the same way, the procedure applied for these enrichments must be changed to avoid the animals to get used to them, which would cause it to stop producing the beneficial effect we are looking for in this study.

**Key words:** environmental enrichment, animal welfare, stereotypies, zoo, wild animals in captivity.

## ESTUDIO DE VIDA ÚTIL EN FRESAS RECUBIERTAS MEDIANTE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE ALOE VERA Y ALOE VERA Y PECTINA

Prat, A.; Egea, M.\*

\***Autor para correspondencia:** Macarena Egea . Email:macarena.egea@um.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel:

### RESUMEN

Los recubrimientos comestibles son cada vez más estudiados y utilizados para la conservación de frutas y verduras con el fin de incrementar su periodo de vida útil, así como también para mejorar su aspecto, proporcionar mayor protección al alimento y utilizar menos envases plásticos y no biodegradables. En este estudio, se aplicó dos tipos de recubrimientos comestibles sobre fresas (*Fragaria* spp.), uno a base de Aloe vera (50%) y el segundo a base de Aloe vera (50%) y pectina (0,5%) con el objetivo de incrementar la vida útil de esta fruta. El Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) posee grandes propiedades antifúngicas y antibacterianas, y fueron estas dos propiedades las que hicieron que se eligiera como base este tipo de recubrimiento para las fresas, ya que una de las principales causas de deterioro de las fresas es el crecimiento de hongos, principalmente *Botrytis cinérea*. Otras causas también importantes del deterioro de las fresas son la elevada fragilidad del producto y la elevada pérdida de humedad a causa de la alta tasa de respiración de esta fruta, lo que también puede verse mejorado con la aplicación de dicho recubrimiento, haciendo éste que disminuya la tasa de respiración y proteja al alimento. La pectina, se combinó con el Aloe vera en el segundo tipo de recubrimiento para probar su eficacia como gelificante y mejorar las características de textura, viscosidad y resistencia del recubrimiento. Tanto las fresas tratadas, como las del grupo control fueron colocadas en bandejas de poliestireno y film perforado y fueron almacenadas en refrigeración a 8°C durante 8 días, durante los cuales se les realizaron diferentes análisis (físico-químico, microbiológico y sensorial). El recubrimiento comestible a base de Aloe vera y pectina no dio unos resultados favorables, observándose peores índices en relación a la microbiología y el análisis sensorial, siendo los resultados parecidos a las fresas del grupo control y peores en relación a las fresas recubiertas únicamente con Aloe vera. Esto pudo deberse a una sinergia negativa entre el Aloe vera y la pectina y/o a una falta de calcio en la solución de recubrimiento que hizo que la pectina no actuara correctamente. Sin embargo, en el recubrimiento comestible a base únicamente de Aloe vera, los resultados en relación a la microbiología fueron favorables, ya que los valores de aerobios mesófilos y hongos fueron menores que en las fresas del grupo control, comprobándose así las propiedades antibacterianas y antifúngicas de este compuesto. También fueron favorables los resultados en relación con el análisis sensorial, donde no se observaron apenas diferencias entre las fresas del grupo

control y las recubiertas con dicho recubrimiento, por lo que también se comprobó que el Aloe vera no altera las características sensoriales de las fresas. Cabe decir que ambos recubrimientos no afectaron a las características físico-químicas de las fresas frescas, ya que los resultados fueron parecidos entre las fresas del grupo control y las fresas recubiertas por ambos recubrimientos. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento a base de Aloe vera es aceptable sensorialmente y además prolonga la vida útil de las fresas al reducir el crecimiento microbiano y fúngico. También muestran como la pectina en combinación con el Aloe vera no proporciona una aceptación sensorial favorable y no reduce el crecimiento microbiológico.

**Palabras clave:** fresas, envases comestibles, aloe vera, pectina, vida útil.

## ABSTRACT

Currently, edible coatings are increasingly investigated and used for the preservation of fruits and vegetables in order to increase shelf life, as well as to improve their appearance, provide greater food protection and reduce non-biodegradable packaging waste. Edible coatings must be legal, safe, sensorially acceptable and provide added value to the food are coated. The use of edible coatings is a technology that has been applied for several years, such as the coating of some fruits and vegetables with wax, but it's currently when many important research is being done. There are a multitude of edible coatings, and each one of them have different characteristics and properties, which means that it's necessary to take into account the characteristics that are desired to improve in the fruits or vegetables with which you want to investigate to choose the best type of edible coating for each food. The aim of the present work is the application of two edible coatings, one of them based on Aloe vera (50%), and the other based on Aloe vera (50%) and pectin (0,5%), in order to increase the shelf life of strawberries (*Fragaria* spp.). Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) has great antifungal and antibacterial properties, and it was these two properties that made this type of coating for strawberries as the basis, since one of the main causes of strawberry deterioration is Growth of fungi, mainly *Botrytis cinerea* (gray mold), although it also grew other fungi like *Rhizopus* spp and *Mucor* spp. Other important causes of deterioration of strawberries are the high brittleness of the product and the high loss of moisture due to the high respiration rate of this fruit, which can also be improved with the application of this coating, Strawberry and decreasing respiration rate and thus loss of moisture. Pectin was combined with Aloe vera in the second coating type to test its efficacy as a gelling agent and to improve the texture, viscosity and coating resistance characteristics. For the coating, 3 batches of 30 strawberries were made. One batch was immersed in the Aloe vera coating for 5 minutes, and the same procedure was performed with the second batch in the edible coating based on Aloe vera and pectin. The third batch was the control group, which was immersed in distilled water for 5 minutes. The strawberries were then allowed to dry in all batches and placed in polystyrene and perforated film trays and refrigerated at 8 ° C for 8 days. On days 1, 3 and 8 different analyses were carried out on all the lots to check the evolution of the strawberries. Analyzes were physical-chemical analyzes (pH, soluble solids, titratable acidity, weight loss and color), microbiological analyzes (aerobic mesophiles as well as molds and yeasts) and sensorial analysis (colour, gloss, dehydrated appearance, molds and others, Strawberry odor, strange odors, strawberry flavor, strange flavors and hardness). Finally, a statistical analysis (analysis of one-way variances, ANOVA) was performed for the processing of the obtained data and obtaining the results. The edible coating based on Aloe vera and pectin did not give favorable results, observing higher values in relation to the microbiology, being the results similar to the strawberries of the control group and higher in relation to the strawberries covered only with Aloe vera. In relation to the sensorial analysis also obtained worse indexes, seeing a loss of intensity of color and brightness, greater dehydrated aspect, appearance of wrinkles in the surface of the strawberries and strange flavor defined as slight bitter taste. These poorer indices in relation to this coating could be due to a negative synergy between Aloe vera and pectin and / or a lack of calcium in the coating solution that caused the pectin to not act correctly. However, in the edible coating based solely on Aloe vera, the results in relation to microbiology were favorable, since the values of aerobes mesophiles and fungi were lower than in the strawberries of the control group, thus checking the antibacterial and antifungal properties of this compound. Also favorable were the results in relation to the sensorial analysis, where there were not only differences

between the strawberries of the control group and those coated with that coating, observing only a strange taste, defined by the tasters as a slight bitter taste, which could be due to the presence of aloine residues, so it was also found that Aloe vera does not alter the sensory characteristics of strawberries. It is possible to say that both coatings did not affect to the physical-chemical characteristics of the fresh strawberries, since the results were similar between the strawberries of the control group and the strawberries covered by both coatings, observing minimum or null variations between the different groups, besides The values within the normal range should always be maintained. Based on the results obtained, it can be concluded that the treatment based on Aloe vera is acceptable sensorially and also prolongs the shelf life of strawberries by reducing microbial and fungal growth. They also show how pectin in combination with Aloe vera does not provide favorable sensory acceptance and does not reduce microbiological growth, so it is not considered desirable to combine both compounds.

**Key words:** strawberry, edible coating, aloe vera, pectin, shelf life.





## **CONTROL DE LA PARATUBERCULOSIS, MEDIANTE VACUNACIÓN CON GUDAIR®, EN EL RESERVORIO DE LA CABRA MONTESA (*CAPRA PYRENAICA HISPANICA*) DEL PARQUE NATURAL DE LAS SIERRAS DE CAZORLA, SEGURA Y LAS VILLAS.**

**Reyes, A.F.; Prieto, P.; Prats van der Han, M.; Cubero, M.J.\***

**\*Autor para correspondencia:** María José Cubero Pablo. Email: mjcupero@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34868884731

### **RESUMEN**

El Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas (PNSCSV) constituye el área protegida de mayor extensión en el territorio español, dentro del ecosistema mediterráneo de montaña. En el Parque existe un censo elevado de rumiantes silvestres, aunque la única especie autóctona es la cabra montesa (*Capra pyrenaica hispanica*). En el PNSCSV conviven especies domésticas y silvestres en las zonas de pastoreo y, como consecuencia de esta interacción, surgen enfermedades infecto-contagiosas. La paratuberculosis, por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), fue detectada clínicamente por primera vez en el año 2012 en el Reservoirio de la Cabra Montesa, situado en el monte de Navahondona. A partir del año 2013 y hasta 2015, como estrategia para el control de esta enfermedad, se vacunaron todos los animales del reservorio con una dosis de la vacuna inactivada Gudair®, utilizada en rumiantes domésticos. En la población del Reservoirio de la Cabra Montesa del PNSCSV, hemos realizado un estudio sero-epidemiológico longitudinal retrospectivo, durante los años 2013 a 2015, para valorar la respuesta inmunitaria tras la vacunación con Gudair®. Las muestras de suero utilizadas en este estudio fueron tomadas por los Servicios Veterinarios y Agentes de Medio Ambiente del Parque, en el chequeo anual realizado en el mes de septiembre. En el muestreo hubo similar presencia de machos y hembras, pero mayor número de adultos que juveniles. Hemos analizado 101 muestras de suero, pertenecientes a las 50 cabras montesas, a lo largo de los tres años de estudio. Hemos utilizado la técnica de Inmuno Ensayo Enzimático, ELISA Indirecto, con los kit comerciales IDEXX Paratuberculosis Screening (IDEXX) y PARACHEK® 2 (Prionics, AG). La vacuna Gudair® resultó fácil de aplicar en las cabras montesas mediante la manga de manejo y no se observaron reacciones adversas. En el 70% de los animales vacunados se detectó seroconversión (aumentó cuatro veces el título del anticuerpos entre los análisis realizados anualmente) y se mantuvo la respuesta inmunológica durante los dos años posteriores. Sin embargo, 30% de las cabras montesas no mostraron respuesta serológica post-vacunal, manteniéndose seronegativas a lo largo del periodo de estudio. Se detectó en 22 animales una buena respuesta inmunológica frente a Gudair®, con seroconversión en los dos ELISA

comerciales y con buena correlación ( $R=0.90$ ) de resultados entre ellas. La media y desviación típica de la respuesta serológica en las cabras montesas analizadas antes de la vacunación fue IDEXX  $6,31\pm 16,38$  y PARACHEK®2  $20,83\pm 3,47$ . La respuesta inmunológica con seroconversión en el primer año fue IDEXX  $73,08\pm 42,66$  y  $73,03\pm 48,36$  PARACHEK® 2 y, la respuesta se mantuvo al segundo año postvacunación IDEXX  $63,44\pm 33,45$  y  $70,84\pm 49,83$  PARACHEK® 2. Hemos comprobado que la diferencia entre los valores de respuesta inmunológica antes y después de la vacunación resultó estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ). En la población del Reservorio de la Cabra Montesa del PNSCSV, a lo largo del periodo de estudio, se confirmó la muerte por paratuberculosis de tres cabras montesas vacunadas, en febrero de 2014 Risco (de 3 años) y en julio de 2016 Isla (de 2 años), y Tranco (de 8 años). Como medida complementaria de gestión sanitaria se recomendó la separación de las siete cabras montesas (Cañuelo, Coto, Don Antonio, Inquieta, Miguel Barba, Rambla, y Roble) que fueron seropositivas antes de la vacunación. Podemos concluir que la aplicación masiva (en animales de todas las edades) de una sola dosis de vacuna inactivada Gudair®, junto a la segregación de las cabras detectadas seropositivas antes de la vacunación, ha sido una estrategia efectiva para el control de la paratuberculosis en el Reservorio de la Cabra Montesa del Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y las Villas (Jaén).

**Palabras clave:** cabra montesa, paratuberculosis, Gudair®, respuesta serológica, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas.

## ABSTRACT

The Natural Park “Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas” (PNSCSV) is the most extensive protected area in Spain within the mountainous Mediterranean ecosystem. In this Park, there is a high census of wild ruminants, although the only indigenous species is the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*). In the PNSCSV, both domestic and wild species coexist, and their interaction in grazing areas maiden outbreaks of infectious diseases. Paratuberculosis, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), was clinically described for the first time in 2012 in the Spanish ibex Reservoir, located in the mountain of Navahondona. From 2013 to 2015, the control measure of the disease was the massive vaccination of the reservoir animals with the inactivated vaccine Gudair®, which is usually employed on domestic ruminants. We have performed a sero-epidemiological, longitudinal, retrospective study on the population of the Spanish ibex Reservoir of the PNSCSV during the period from 2013 to 2015 to assess the immune response after vaccination with Gudair®. Serum samples employed in this study were collected by the Veterinary Services and Environmental Agents of the Park during the annual check-up carried out during the month of september. Sampling was performed on a similar number of males and females, but with a majority of adult individuals instead of young ones. We have analyzed 101 serum samples belonging to 50 Spanish ibex by indirect Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) with the commercial kits IDEXX Paratuberculosis Screening (IDEXX) and PARACHEK® 2 (Prionics, AG). Administration of the Gudair® vaccine to the semi-freedom Spanish ibex was easily performed using the management sleeve. No adverse effects have been reported on vaccination. Seroconversion (the antibody title increased four-fold in the yearly performed analyses) was detected in 70% of the vaccinated animals, and the immune response was maintained during the two following years. However, 30% of the Spanish ibex did not show any post-vaccination humoral response, and they remained seronegatives for the whole period of study. A good immune response with seroconversion against Gudair® was detected in 22 animals by both commercial ELISAs and with a good correlation between them ( $R=0.90$ ). The mean and the standard deviation of the humoral response in Spanish ibex analyzed before vaccination was  $6.31\pm 16.38$  according to IDEXX and  $20.83\pm 3.47$  according to PARACHEK®. In the first year, immune response with seroconversion was  $73.08\pm 42.66$  according to IDEXX and  $73.03\pm 48.36$  according to Parachex® 2. The response was maintained two years after vaccination ( $63.44\pm 33.45$  with IDEXX and  $70.84\pm 49.83$  with PARACHEK®). We have determined that the difference between the values of immune response before and after vaccination is statistically significant ( $p<0.05$ ). During the period of study, within the population of the Spanish ibex Reservoir of the PNSCSV, was confirmed the death by paratuberculosis of three vaccinated Spanish

ibex: Risco (3 years-old) on winter 2014, Isla (2 years-old), and Tranco (8 years-old) on summer 2016. In addition, as a complementary measure of health management, the segregation of seven Spanish ibex was recommended (Cañuelo, Coto, Don Antonio, Inquieta, Miguel Barra, Rambla y Roble), which were seropositive before vaccination. We can conclude that massive application (in animals of all ages) of a single dose of the inactivated vaccine Gudair®, together with the segregation of the goats detected to be seropositive before vaccination, has been an effective strategy for the control of paratuberculosis in the Spanish ibex Reservoir of the Natural Park “Sierras de Cazorla, Segura y las Villas” (Jaén).

**Key words:** Spanish ibex, paratuberculosis, Gudair®, serological response, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), Natural Park “Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas”.



## MERCURIO EN AVES MARINAS

**Rosales, A.\*; María, P.**

**\*Autor para correspondencia:** Ana Rosales López. E-mail: rosales\_ana@hotmail.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: 619221854

### RESUMEN

El mercurio es un metal tóxico no esencial, cuyo estudio es importante por sus efectos sobre la salud humana y por su repercusión sobre la contaminación del medio ambiente. Las aves se han utilizado hasta el momento por ser una de las especies más representativas que se utilizan como sistema de alarma temprano en caso de riesgo medioambiental. En esta revisión bibliográfica hemos descrito en primer lugar la toxicología del mercurio, los efectos que este metal puede producir a largo plazo en las aves marinas pudiendo provocar desde alteraciones reproductivas hasta locomotoras. Utilizando bases de datos y fuentes documentadas, se ha tenido en cuenta la variedad de investigaciones realizadas hasta el momento utilizando ejemplos para comprender la situación mundial y de la península Ibérica. Con un total de 25 estudios representativos de diversas zonas del mundo hemos realizado un cuadro comparativo donde se han descrito los diferentes tipos de muestras utilizadas. Las plumas han resultado ser las muestras más utilizadas mostrando la preferencia de los investigadores por las muestras no invasivas. Además la mayoría de autores han utilizado animales adultos para la biomonitorización continua de este metal. La procedencia geográfica de las muestras ha sido variada pero la mayoría de artículos se han localizado en Europa y América del Norte con un 50% y 38% respectivamente, dejando un porcentaje menor al resto de los continentes, valor que debería incrementarse en un futuro debido al aumento de industrialización de estas zonas.

**Palabras clave:** mercurio, aves, plumas, bioindicador.

### ABSTRACT

Mercury is a non-essential toxic metal whose study is important because of its effects on human health and its impact on environmental pollution. This review has been written in order to describe the toxicology of mercury in seabirds. Organic mercury, methylmercury, dissolves and concentrates on smaller fish; these will be depredated by larger fish that will accumulate higher concentrations of Hg to reach the top of the food chain, where humans and seabirds are. This metal can be absorbed in three ways: the gastrointestinal, the respiratory and the dermal. We emphasize the gastrointestinal tract (without detracting from the other two), since one of the main forms of exposure in birds is through ingestion of food. Exposure to a high dose of a toxicant usually causes harmful effects that can be detected by observation of the animal or a correct clinical examination.

However, this type of compounds usually causes chronic exposures, repeated exposures and low doses that cause undetectable harmful effects. Eggs can be affected at low doses and cause mortality, malformations and neurological effects. Adults affected with sublethal doses are associated with behavioral problems, decreased size and weight. Chronic exposure to these effects may lead to lower hatching rates, reduced chicks survival, and generally alterations and difficulty in reproductive function. Birds have been used to date as one of the most representative species used as an early warning system in case of environmental risk. They have been used as bioindicators of ecosystems because they are relatively long-lived species and are located at the top of the food chain, and are exposed to heavy metals through air, water and food. Biomonitoring has the difficulty of homogenizing the results and choosing the most representative tissue of environmental contamination. Therefore, the choice of a bird tissue for biomonitoring will depend on the metal studied, the type of bird, its position in the trophic chain, the age, the sample collection period, the type of ecosystem and the study objective. We have used databases such as "Pubmed" and "Buscatox" which are free and you can obtain various articles of veterinary medicine. In addition "ScienceDirect" and Sertoxmur "whose different sections offer educational information, research and current news. We have taken into account the variety of research carried out so far using examples to understand the world situation and the Iberian peninsula. Several studies have been carried out so far, traversing the Mediterranean and the Balearic archipelago with characteristic species of interest such as the razorbill (*Alca torda*) and the Balearic shearwater (*Puffinus mauretanicus*). The latter is a species that requires special monitoring due to the decline of specimens in recent years. In the rest of Europe, such as the Bay of Jade (Germany), the Ebro Delta and others, have used seagulls as representative birds. The situation in the world is also worrying, highlighting the regions where there are minimum emissions of mercury, such as the Arctic, which have been affected due to transcontinental and global transport of this metal. With a total of 25 representative studies from different areas of the world we have made a comparative table where the different types of samples have been described. In most of the studies consulted, the samples used were feathers, with 46%. The use of internal tissues such as the liver accounts for 28% of the studies, followed by kidney with 11%, eggs with the same percentage and finally the muscle with 4%. It would be interesting to use excrement in future projects. Of these birds, a significant percentage of researches use seagulls due to their geographical distribution and to be a representative species in the consumption of garbage and discards. Very few studies use penguins as a species to be investigated. The use of adult animals has highlighted the use of young animals. Finally, Europe and North America represent up to 88% (50% and 38%, respectively) of the studies performed. The rest of the continents have had a smaller percentage and it would be advisable to take them into account in future research for their industrial development and the increase of emissions of this metal.

**Key words:** mercury, birds, feathers, bioindicator.

## LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS EN RIÑONES DE CORDERO DECOMISADOS EN MATADERO

Rubio-Lorente, S.; Bernabé-Salazar, A.\*; Sánchez-Martínez, P.; Gómez-Sánchez, M.A.

\***Autor para correspondencia:** A. Bernabé-Salazar. Email: abernabe@um.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: 868884705

### RESUMEN

El presente trabajo está basado en el estudio anatomopatológico de las alteraciones renales de 100 corderos, cuyos riñones se decomisaron entre los meses de octubre y noviembre del año 2016 en el “Matadero Orihuela S.A”. Durante estos meses se sacrificaron un total de 5.868 animales, de los cuales solo se decomisaron el 1,70% de los riñones, correspondiente a las muestras analizadas. Durante la recogida de muestras se han obtenido datos sobre la edad, el sexo, las explotaciones de procedencia y la posible presencia de lesiones en otros órganos. Los animales de los que se han tomado muestras proceden de 24 explotaciones, la mayoría de estos cebaderos, siendo el resto de reproducción de carne. Explotaciones distribuidas en el sureste español y ubicadas concretamente en 5 provincias. Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, donde se realizaron fotografías de las alteraciones macroscópicas. Posteriormente se procesaron las muestras y se tiñeron mediante la técnica de H-E (hematoxilina-eosina), para su diagnóstico microscópico. En algunos casos ha sido necesario el uso de otras técnicas de tinción más específicas para realizar el diagnóstico definitivo (PAS, Tricrómico...). La clasificación macroscópica se ha llevado a cabo, en base al aspecto externo y superficie de corte de las lesiones renales en nueve tipos: áreas blanquecinas multifocales evidentes de diferente tamaño (24,02%), áreas rojizas y palidez (12,25%), lesión difusa (0,49%), áreas blanquecinas multifocales con relieve hacia el interior “riñón fruncido” (8,82%), color pardo-rojizo (4,90%), punteado y áreas blanquecinas multifocales (10,78%), punteado granuloso multifocal (5,88%), palidez (6,37%) y punteado blanquecino multifocal (26,47%). Las lesiones microscópicas se han clasificado en cuatro grupos: trastornos inflamatorios (88,24%), trastornos circulatorios (5,39%), trastornos metabólicos (3,43%) y trastornos del desarrollo (2,94%). Dentro de estos grupos se han identificado diferentes lesiones, siendo la más destacada la glomerulonefritis crónica (37,75%). Cabe resaltar, que la mayoría de muestras presentan más de una lesión renal. En general la clasificación macroscópica gira en torno al aspecto externo de las alteraciones inflamatorias, al estar estas presentes en el 94% de las muestras. Por lo que se ha comprobado que en la mayoría de los casos el diagnóstico microscópico guarda relación con el aspecto macroscópico típico de cada lesión, especialmente en el caso de las glomerulonefritis crónicas. Se ha clasificado a los animales en dos rangos de edad: la mitad de ellos perteneciente a la EDAD 1 (3 meses) y la otra mitad a la EDAD 2 (5-6 meses), con un total de lesiones del 52,45% y 47,55%, respectivamente. Para este estudio se ha tenido también en cuenta el sexo, con un total de 65 machos y 35 hembras con un porcentaje total de lesiones de 65,69% y 34,31%, respectivamente. Concluyendo, que el sexo y la edad no poseen gran influencia sobre las alteraciones renales

encontradas. En cuanto a los datos recogidos acerca de otras lesiones orgánicas, la alteración más destacada es la neumonía infecciosa, presente en el 33% de las muestras. En 26 de las 33 muestras que presentan afección pulmonar, se ha podido observar a nivel renal la presencia de glomerulonefritis crónica (78,79%). Por lo que, se puede afirmar que existe elevada relación entre ambas lesiones. En cuanto al tipo de explotación ganadera, se ha comprobado que el mayor porcentaje de decomisos (2,58%) y de otras lesiones orgánicas (1,04%) ha tenido lugar en las explotaciones dedicadas a reproducción de carne. El decomiso del riñón de cordero en matadero no tiene repercusión económica significativa para el sector cárnico ovino. La información obtenida en este trabajo, puede ser de utilidad para conocer mejor las principales alteraciones renales que con mayor frecuencia se encuentran tras la inspección veterinaria en matadero. Permitiendo tanto a veterinarios como a ganaderos desarrollar medidas preventivas, con el propósito de mejorar la sanidad animal, la higiene en las explotaciones ganaderas y evitar posibles riesgos para la salud pública.

**Palabras clave:** riñón, decomiso, matadero, anatomía patológica, histopatología, ovino.

## ABSTRACT

The present research work is based on the anatomopathological study of the renal alterations of 100 lambs, whose kidneys were seized between October and November of the year 2016 in the "Slaughterhouse Orihuela S.A.". During these months a total of 5.868 animals were slaughtered, of which only 1.70% of the kidneys were seized, corresponding to the samples analyzed. During the collection of samples data on age, sex, livestock farming of provenance and the possible presence of injuries in other organs have been obtained. The animals sampled come from 24 livestock farming most of them breeding, being the rest of the reproduction of meat. These were distributed by the southeast Spanish and located concretely in 5 provinces. The samples were analyzed in the Laboratory of Histopathology of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Murcia, where photographs of macroscopic alterations were made. The samples were then processed and stained using the hematoxylin-eosin technique (H-E) for microscopic diagnosis. In some cases it has been necessary to use other more specific staining techniques to perform the definitive diagnosis (PAS, Trichrome ...) The macroscopic classification was based on the external appearance and cut surface of the renal lesions in nine types: clear multifocal whitish areas of different size (24.02%), reddish areas and pallor (12.25%), diffuse lesion (0.49%), whitish multifocal areas with inward embossing ("Puckered Kidney") (8.82%), brownish-red colour (4.90%), dotted and whitish multifocal areas %, multifocal graining (5.88%), pallor (6.37%) and multifocal whitish dotting (26.47%). Microscopic lesions have been classified into four groups: inflammatory disorders (88.24%), circulatory disorders (5.39%), metabolic disorders (3.43%) and developmental disorders (2.94%). Within these groups different lesions have been identified, the most outstanding being chronic glomerulonephritis (37, 75%). It should be noted that the majority of samples present more than one renal lesion. In general, the macroscopic classification revolves around the external appearance of the inflammatory alterations, since they are present in 94% of the samples. It has been found that in most cases the microscopic diagnosis is related to the macroscopic appearance typical of each lesion, especially in the case of chronic glomerulonephritis. The animals were classified into two age ranges: half of them belonging to the AGE 1 (3 months) and the other half to the AGE 2 (5-6 months), with a total lesion of 52.45% and 47.55%, respectively. For this research, sex was also taken into account, with a total of 65 males and 35 females, with a total percentage of lesions of 65.69% and 34.31%, respectively. Concluding, that sex and age do not have great influence on the renal alterations found. As for the data collected about other organic lesions, the most prominent alteration is infectious pneumonia, present in 33% of the samples. In 26 of the 33 samples with pulmonary affection, the presence of chronic glomerulonephritis (78.79%) has been observed at the renal level. Therefore, it can be affirmed that there is a high relation between both lesions. As regards the type of livestock exploitation, it has been verified that the highest percentage of seizures (2.58%) and other organic lesions (1.04%) has taken place in the exploitations dedicated to meat reproduction. The confiscation of the lamb kidney in slaughterhouse has no significant economic impact on the sheep meat sector. To sum up, the information obtained in this research may be useful to better understand the main renal alterations that are most frequently found after veterinary inspection in a slaughterhouse. Allowing both, veterinarians and farmers, to develop preventive measures, with the purpose of improving animal health, hygiene in livestock farms and avoid possible risks to public health.

**Key words:** kidney, confiscation, slaughterhouse, pathological anatomy, histopathology, ovine.



## DETECCIÓN MOLECULAR DE PATÓGENOS EN ABEJAS INSULARES

Sánchez, M.M.; De la Rúa, P.; Muñoz, I.\*

\***Autor para correspondencia:** Irene Muñoz. Email: irenemg@um.es, Área de Biología Animal, Universidad de Murcia. 30100 Murcia. España. Tel: +34868 88 8031

### RESUMEN

La polinización realizada entre otros insectos por la abeja de la miel es un elemento indispensable para el mantenimiento de los ecosistemas naturales y agrícolas. Sin embargo, actualmente se está constatando un declive general de polinizadores y la presencia de patógenos ha sido propuesta como una de sus principales causas; detrás de ello se encuentra entre otras prácticas apícolas, la introducción de abejas foráneas. En este contexto, se hace necesario establecer programas de conservación de las abejas locales, así como programas sanitarios para el control de las enfermedades. En este trabajo se ha llevado a cabo la determinación molecular de *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, *Ascospaera apis*, *Acarapis woodi*, tripanosomátidos y neogregarinos en 53 colmenas de la isla de Gran Canaria muestreadas en 2016. Tras la secuenciación de los fragmentos amplificados se determinó la presencia de *Lotmaria passim* con una prevalencia del 49,06%. Por otro lado la prevalencia de *N. ceranae* observada fue del 16,7%. No se ha detectado correlación entre las abejas que han sido caracterizadas como introducidas y la presencia de patógenos. Aun así se recomienda el uso de cuarentenas tanto en eventos de introducción de paquetes de abejas como en el de establecimiento de colmenas para programas de conservación de abejas locales.

**Palabras clave:** abeja de la miel, Gran Canaria, patógenos, determinación molecular, secuenciación, prevalencia, cuarentena.

### ABSTRACT

Pollination performed among other insects by honey bees is an indispensable element for the maintenance of natural and agricultural ecosystems, in addition to contributing to human health and nutrition. However, a general decline of pollinators is now worldwide observed. The presence of pathogens has been proposed as one of its main causes; furthermore, honey bee trade should also be considered, as practices such as the introduction of foreign honey bees has caused not only the replacement of local honey bees but also the dispersion of pathogens spread by those introduced. In this context, it is necessary to establish programs for the conservation of local honeybee bees, as well as health programs for the control of diseases. Such type of initiatives is being carried out on islands as Gran Canaria where a hatchery with honey bees of the Canarian black ecotype has been created. For this, colonies from 53 hives sampled in 2016 were characterized by determining the

mitochondrial haplotype. In the present work, several pathogens have been searched by molecular methods in the colonies included in the conservation program to discard the introduction in the new hatchery of those that were infected. The pathogens included in the analyses were: *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, *Ascospaera apis*, *Acarapis woodi*, trypanosomatids and neogregarines. To do this, after the DNA extraction from a pool of worker bees from each hive, we attempted to amplify through the Polymerase Chain Reaction (PCR) specific regions of the genome of each pathogen. Results obtained in each experiment have proved to be inconclusive since in most cases amplification was observed in the negative controls, or organisms other than the target ones were amplified. To confirm the species of pathogen detected, some of the positive samples of *N. ceranae* and *N. apis* were sent to sequence. This confirmed the presence of *N. ceranae* in the samples, and not *N. apis* but *Gilliamela apicola*, a symbiont of the digestive tract of the bees. For the trypanosomatids and neogregarines, a multiplex PCR reaction was used, which allowed to detect the genus trypanosomatids but not neogregarines in 26 out of the 53 samples. After sequencing the amplified fragments, the presence of the trypanosomatid *Lotmaria passim* was determined in 49.06% of the colonies whereas the prevalence of *N. ceranae* observed was 16.7%. No correlation was found between honey bees characterized as introduced and the presence of pathogens. However, the use of quarantines is recommended both in honey bee introduction events and in the establishment of honey bee colonies for local conservation programs.

**Key words:** honey bee, Gran Canaria, pathogens, molecular determination, sequencing, prevalence, quarantine.

## VACUNACIÓN FRENTE A ROTAVIRUS A EN LECHONES: DETECCIÓN DE EXCRECIÓN Y EVALUACIÓN DE UN KIT DE INMUNODIFUSIÓN LATERAL

Sandoval, H., Pallarés, F.J.; Ramis, M.G.\*

\***Autor para correspondencia:** Manuel Guillermo Ramis. Email: guiramis@um.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: +34868884749

### RESUMEN

El propósito de este trabajo es evaluar un sistema de inmunodifusión lateral para la detección de Rotavirus A, y comprobar si es capaz de detectar la presencia de virus vacunal. Por otro lado se va a comprobar si se produce excreción de rotavirus A en lechones lactantes tras la vacunación (ProSystem® ROTA) vía oral de un grupo 5 individuos, en contacto con otro grupo control de 5 lechones no vacunados. Para tal fin, en primer lugar se comprobó si la explotación porcina estaba libre de dicho patógeno y para ello se utilizó el propio kit de inmunodifusión lateral (WITNESS® PED-TGE-Rota Zoetis®, EEUU) capaz de detectar antígeno viral en las heces. El test demostró que la explotación está libre de patógenos, así como de los virus de la diarrea vírica epidémica (PED) y del virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGE). Tras esto, se procedió a la vacunación de 5 lechones en una sola dosis y la posterior recogida de heces individual, de forma diaria durante 7 días. Estas heces se procesaron para aislar ARN mediante un kit (RNeasy® Mini Kit (250) de QIAGEN), llegando a un total de 76 muestras. Posteriormente, se sintetizó cADN mediante retrotranscripción inversa y poder así realizar la PCR a tiempo real. En este trabajo ha sido necesaria la puesta a punto de la PCR a tiempo real como principal método diagnóstico, para lo cual se han utilizado primers específicos de rotavirus A y química SYBR green.

**Palabras clave:** rotavirus, test inmunodifusión lateral, excreción vírica

### ABSTRACT

Rotavirus A belongs to Reoviridae's family and they have a double ARN chain with a segmented genome. Moreover, there are 8 different serogroups (A-H) that they encode to 6 structural proteins (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 and VP7) and 6 nonstructural proteins (NSP1-6), all of them have been found in animals. Rotavirus A is transmitted by an oro-fecal route and it is able to survive for 4-7 days in faeces. Rotavirus A infects the small intestine's enterocytes and the receptor of them is the sialic acid. All of that leads to a malabsorption syndrome, loss of enterocytes and diarrhoea. Furthermore, it causes an hypernatremia, hyperkerlamia and hyperfosfatemie symptoms. In spite of the first contact between the animal and rotavirus A, it doesn't cause an immune response

against the different rotavirus serogroups, the replay in the vaccination or infection gives a board range of protection against heterotypic rotavirus. The vaccination against rotavirus A gives an important local immune response with IgA and lymphocytes proliferation in neonatals pigs. The main diagnostic methods are electronic microscopy to see viral particles), RT-PCR for the ARN viral detection with a high specificity and sensitivity, immunohistochemistry to detect viral antigen and ELISA which allows to analyze a lot of samples. As for the control and prevention, the higienic steps are very important, especially in the nursery room and birth room in order to avoid the exposure to the agent. The vaccination against rotavirus A is other option to avoid the disease. The principal objective of this work was to evaluate the excretion and transmission of rotavirus A after the oral vaccination of piglets in the first week of their lifes and the possible interaction with a lateral immunodiffusion kit for the pathogen detection. On the other hand, the secondary objectives were prepare a real time PCR technique, check the health status in the GDV with a lateral immunodiffusion test, verify the excretion of rotavirus A in vaccinated piglets and the presence of rotavirus's A ARN in unvaccinated piglets. For the q-PCR preparation was necessary to obtain a vaccine sample and it was used to the ARN extraction. After, it was necessary to do an inverse retrotranscription in order to obtain cDNA. Finally, the q-PCR was done with 3 different concentrations (50 nM, 150 nM and 300 nM), SYBR-Green was used as a fluorogen and ROX as a reference. The final volumen was 25 µl. Finally, the thermocycling was done using an ABI 7300 thermocycler (Life Technologies, USA) with a procol that includes a first activation phase at 95°C for 15 minutes followed by a second phase with 40 cycles which has a first subphase of DNA denaturation of 95°C for 15 seconds, a second subphase at 58°C for 30 seconds and a third extension subphase for 1 minute at 72°C. The final extension phase takes place for (lasts) 10 minutes at 72°C. At the end, a dissociation phase was developed from 60° to 95°C to determinate the dissociation temperature of the amplicon. Furthermore, to confirm that the amplicon obtained was the amplicon that we wanted a 2% agarose gel electrophoresis was used. In this Project, a group of 10 piglets were used and 5 of them were vaccinated and 5 of them were non vaccinated as control group. The vaccine used was ProSystem® Rota and the piglets were vaccinated on the fourth day after birth, orally and with a single dose. To the analysis of the possible or not possible excretion of rotavirus A after vaccination, a total of 76 fecal samples were taken from the piglets and 5 samples from the suckling mother. Moreover, for the rotavirus A detection was used the lateral immunodiffusion test PED-TGE-Rota from Zoetis®. Before the investigation, the farm was checked with de lateral immunodiffusion test in case of the rotavirus A was present but the result was negative. The q-PCR showed 7 positive samples to rotavirus A, 6 of them from vaccinated piglets and 1 of them from the control group. Nevertheless, only one of them had the dissociation temperature from rotavirus A (a vaccinated piglet in the third day post-vaccination). On the other hand, the immunodiffusion test confirmed the positive sample in the q-PCR. The positives samples with a different dissociation temperature were negative in the immunodiffusion test. Moreover, the electrophoresis showed that the only positive sample generated an agarosa gel band with 430 pdb and the sample was the 3.570 which has a melting temperature in accordance with the positive control. In the other samples the accumulation of primer dimers is observed beyond 100 bp. As a conclusion, the vaccination against rotavirs A in suckling piglets doesn't cause the complete fecal excretion because only a percentage of the piglets have viral ARN in the faeces. Although there is a positive animal to rotavirus A, the excretion hasn't happened for a long time and it happened only a day. Moreover, the viral excretion can't be detected in unvaccinated piglets. The lateral immunodiffusion test is capable to detect the vaccine virus but false positives can be present. Furthermore, there is concordance between q-PCR positive samples with a rotavirus Tm and the results of the lateral immunodiffusion test. Finally, the q-PCR preparation can produce artifacts that produce false positives that are discovered easily with the dissociation temperatura.

**Key words:** rotaviruses, lateral immunodiffusion test, viral spreading.

## **DEFECTO ADQUIRIDO DEL SEPTO INTERATRIAL EN UN CAVALIER KING CHARLES SPANIEL CON ENFERMEDAD MITRAL DEGENERATIVA CRÓNICA**

**Torrano, A.; Talavera, J.; Fernández, M.J.\***

**\*Autor para correspondencia:** M Josefa Fernández del Palacio. Email: mjfp@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

### **RESUMEN**

El objetivo de este trabajo es describir un caso clínico de enfermedad mitral degenerativa crónica que evoluciona hacia un defecto septal adquirido por ruptura del mismo, lo cual es muy poco frecuente. Los defectos del septo atrial (DSA) consisten en una comunicación entre los dos atrios a través del septo que los separa. Estos defectos están mayormente causados por anomalías congénitas, resultantes de un fallo en el desarrollo embrionario del septo atrial, sin embargo, en ocasiones pueden ser adquiridos, siendo mucho más infrecuentes y resultando su causa más desconocida. La etiología de los DSA adquiridos es incierta, sin embargo es claramente multifactorial. Uno de los factores, que parece ser el desencadenante, es la insuficiencia de la válvula mitral de manera crónica (IVMC). Los casos avanzados de IVMC pueden complicarse por procesos relacionados con el incremento de tamaño y presión en la aurícula izquierda. En algunos casos puede producirse una ruptura del septo interatrial debido a estas mismas causas (aumento de presión y trauma en las paredes del septo). Debido a que la sobrecarga de volumen afecta al ventrículo derecho y no al izquierdo, las comunicaciones grandes terminan ocasionando el desarrollo de una insuficiencia cardíaca derecha con sus correspondientes signos clínicos (ascitis, edema subcutáneo, distensión y pulso yugular, hepatomegalia y esplenomegalia...). Aunque infrecuente, la ruptura del septo interatrial es una consecuencia a tener en cuenta en aquellos animales que sufran de IVMC, y debe considerarse su presencia en perros con IVMC que desarrollan signos de fallo cardíaco derecho.

**Palabras clave:** Enfermedad mitral degenerativa crónica, defecto septo atrial adquirido.

### **ABSTRACT**

Atrial septal defects (ASD) are caused by the communication between the two atria through the septum that divides them. These defects are mainly due to congenital anomalies which result from a fault in the embryonic development of the atrial septum. However, they may also be acquired, being these cases less frequent and therefore their origin less certain. The definitive atrial septum results from the appearance and later fusion of

the two septa: the first septum “septum primum” (which forms the left side of the atrial septum) and the second septum “septum secundum” (which forms the right side of the atrial septum). In some occasions, congenital variations which modify the usual anatomy of the atrial septum and cause defects in it have been detected. Different types have been described depending on their anatomical location. Regarding acquired ASD, their aetiology is less certain, although they are clearly multifactorial. One of the factors, which seems to be the trigger, is degenerative mitral valve disease. Degenerative mitral valve disease in dogs is usually caused by a progressive myxomatous degeneration of the atrioventricular valves. From an ultrastructural point of view there is a myxomatous proliferation of the leaflets, in which the spongy component is unusually prominent and the quantity of dyed glycosaminoglycanos is increased. Heredity is suspected to play a crucial role in the apparition of this disease. An appropriate closure of the mitral valve requires an intact valve system from an anatomical and functional point of view. Mitral insufficiency may be due to alterations in the leaflets, expansion of the union between atrium and ventricle, rupture of the chordae tendinae, or an inadequate contraction of the papillary muscles. More than one of these factors are usually identified when there is a degenerative mitral valve disease. The clinical signs of degenerative mitral valve disease are related to the presence or seriousness of one or several of the following pathophysiological events: high pressure in the left atrium and pulmonary veins, which causes dyspnea and cough secondary to pulmonary edema and compression of the main bronchus; reduced effective flow through the left or right ventricle, which causes weakness and limited vigour; right heart failure, which causes pleural effusion and ascites; acute descompensation with fulminant pulmonary edema or ventricular fibrillation which causes sudden death. Advanced cases of degenerative mitral valve disease may become complicated due to processes related to an increase in the size and pressure of the left atrium. The later presents a thinner wall, being therefore more susceptible to pressure rise. This, together with ongoing trauma of the regurgitant flow, may lead to its rupture. For this reason, endocardial fissures are frequently found in post-mortem studies with dogs which presented degenerative mitral valve disease. In some cases a rupture of the interatrial septum may occur due to the same causes (pressure rise and trauma in the septum walls). The blood flow through the defect takes place mainly in the diastole. The difference in pressure through the defect is low and the direction and size of the communication are mainly determined by the relative resistance to the filling of each ventricle. The right ventricle usually presents more adaptability than the left ventricle and offers less resistance when filling, therefore the blood flows preferably from the left atrium to the right atrium and the right ventricle. In most cases there is a blood flow from left to right, causing an expansion of the right atrium, eccentric hypertrophy of the right ventricle and pulmonary hipercirculation. Since the blood overload affects the right ventricle and not the left one, big communications lead to the development of right heart failure with its corresponding clinical signs (ascites, subcutaneous edema, distension and jugular pulse, hepatomegaly and splenomegaly...). The aim of this study is the description of a clinical case of chronic degenerative mitral disease which evolves towards an acquired atrial septal defect due to its rupture, which is very infrequent. The rupture of the interatrial septum should be taken into account in animals with degenerative mitral valve disease and should be considered in dogs with this disease which develop signs of right heart failure.

**Key words:** Degenerative chronic mitral valve disease, acquired atrial septal defect.

## NIVELES DE CADMIO EN HÍGADO DE AVES DE CAZA DE DIFERENTES ZONAS DE ESPAÑA

Urrutia, V.; Romero, D.

\***Autor para correspondencia:** Valentín Urrutia Matarín . Email:valentin.urrutia@um.es . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

### RESUMEN

El cadmio (Cd) es un metal pesado sin función biológica conocida en los organismos superiores. Su presencia en el medio ambiente puede tener un origen natural o antropogénico, debido a varias actividades como la minería, la incineración de pilas o plásticos, o la aplicación de ciertos abonos fosfatados. Junto con los riñones, el hígado es el órgano que más Cd acumula en el organismo de las aves. En el presente estudio hemos analizado muestras de hígado de 178 aves de diferentes especies procedentes de la actividad cinegética, de 7 zonas del territorio español, con el objetivo de analizar la concentración de este elemento presente en este órgano. Los resultados pusieron de manifiesto una mayor concentración de Cd en la paloma torcaz (*Columba palumbus*) de la provincia de Zamora, con una mediana de 0.695 mg kg<sup>-1</sup>, y altas concentraciones también en las muestras de Madrid, Zamora y Ciudad Real. Se encontraron diferencias significativas entre aves adultas y jóvenes (con más concentración de Cd en las primeras), mientras que en individuos procedentes de diferentes entornos (rural vs urbano), esta diferencia no fue significativa (mayor concentración en ejemplares de entorno urbano). La paloma torcaz fue la especie que presentó mayor concentración de Cd, repitiéndose esto en todas las zonas con muestras de esta especie, lo que nos lleva a pensar que de todos las especies de aves evaluadas, la paloma torcaz es la que más bioacumula este metal, siendo la que nos puede dar una mejor idea de la carga de este elemento en el ambiente.

**Palabras clave:** Cinegética, hígado, paloma torcaz, Zamora.

### ABSTRACT

Cadmium is a heavy metal without biological functions on living organisms. It can be found on the environment as a result of several processes with natural or human origin. Generally is present in marine phosphates and sedimentary rocks. The principal human activities that release this metal are mining, refinery of non-ferrous metals, the burning of fossil fuels, incineration of some materials as batteries and plastics, application of phosphates fertilizers or forest fires. Cadmium can firmly adhere to the organic matter and be incorporated to the trophic chain by plants and invertebrates and also be eaten by other animals like birds, mammals and humans. Some of its toxic effects are kidney tubular dysfunction, osteoporosis, pneumonia and Itai-Itai disease.

For the biomonitoring of this element in this studio we used birds from the hunting activities around the Spanish territory. As hunting animals, no special permissions are required to be used as experimentation subjects. In birds, the principals cadmium's ways in to the organism are inhalation and ingestion, accumulating in liver and kidneys, where it can be found 90% of body cadmium (in the liver can accumulate 50% of body cadmium). Absorption is dosis-dependent. In this studio 178 liver samples from different species were recollected. The birds where hunted in authorized zones between August 2016 and March 2017, except for Navarra (taken from a farm) and the taken on urban environments (in Madrid and Valencia's airport), taking 0.5-1 gr liver samples of each bird. The species used were: Common wood pigeon (*Columba palumbus*), feral pigeon (*Columba livia*), stock dove (*Columba oenas*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), european turtle dove (*Streptotelia turtur*), barbary partridge (*Alectoris barbara*) and common quail (*Coturnix coturnix*). The determination of cadmium was made with inductively coupled plasma optical emission spectrometry, and the detection limit for cadmium was 0.001 $\mu$ g g-1. For statistical analysis, SPSS v.19.0 for Windows was used, calculating median, minimum and maximum values. Firstly were studied the differences between the study groups (constituted by the species and the hunting zone). Later we studied the presence of statistically significance differences of cadmium concentrations focusing on: age (young and adult), gender (male and female), species, geographic zone (Zamora, Madrid, Alicante, Navarra, Valencia, Ciudad Real and La Gomera), environment (rural and urban) and origin of the animals (wild, farm and acclimated). For the comparisons non-parametric models were used, being 0.05 the significance level. 56.18% of samples were below 0.1 mg kg-1, and only 5.06% reach 1 mg kg-1 concentration. The median was 0.091 mg kg-1 with a maximum concentration of 2.873 mg kg-1. We find the highest median in the common wood pigeon of Zamora, with values of 0.695 mg kg-1 and also the highest maximum value (2.873 mg kg-1). Even those values are below the toxic dose of cadmium, determined by some authors in birds as 45-70 ppm. We found significative differences between the wood pigeon of Zamora and all the others samples in Zamora and the rest of localitacions. Also, in every zone wood pigeon was present, it had a higher concentration of cadmium than the other birds, what can makes us think that the wood pigeon is able to accumulate more cadmium in the liver. The three locations with higher concentrations of cadmium were Madrid (0.177 mg kg-1), Zamora (0.104 mg kg-1) and Ciudad Real (0.103 mg kg-1). In the other hand, with the red-legged partridge in Ciudad Real and Navarra we found higher concentrations than with the same species in Zamora. Is possible that these two locations have a major concentration of cadmium than Zamora, but we don't have common wood pigeons in neither Ciudad Real nor Navarra, so we can't do a proper comparison. We found higher concentrations of Cd in adults birds from an urban environment. An elevated traffic density can free cadmium to the air, and be inhaled by living beings or be deposited in the soils to be absorbed by plants and water, and finally reach animals and humans. Also, one the principal ways for the cadmium to enter in the birds' organism is the digestive absorption, together with its long half-life (it can be over 20 years in humans), seems logical thinking that adults birds have more cadmium than younger ones. On the other hand, we didn't found significative differences between males or females birds. It seems that common wood pigeon accumulates more cadmium than feral pigeon, an usual bioindicator. Maybe the standard use of common wood pigeon could gives better information about cadmium content in the environment, and compares the results, considering that we will be using the same species. We could analyze the cadmium concentration in kidneys and compare it the liver ones, so we can determinate if the exposition to this metal has been chronic (little doses in a long a time) or acute (high doses in a short time).

**Key words:** Hunting, liver, wood pigeon, Zamora.



## SEGUIMIENTO ECOGRÁFICO Y ADMINISTRACIÓN DE PGF2A EN BOVINOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS MADURADOS *IN VIVO* MEDIANTE OPU

Zaytseva, Z.; Ruiz, S.\*

\***Autor para correspondencia:** Salvador Ruiz López. Email: sruiz@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Telf: +34868 884 790

### RESUMEN

Este Trabajo de Fin de Grado ha tenido como objetivo la obtención de ovocitos madurados *in vivo* de hembras bovinas sin estimulación hormonal previa. Estos ovocitos serán utilizados posteriormente, en un proyecto de investigación más amplio, en el que se pretende incrementar la eficiencia en la producción de embriones *in vitro* tanto cuantitativa como cualitativamente, gracias a la determinación del perfil completo de metilación del ADN durante el periodo preimplantacional en la vaca. Se ha trabajado con 3 hembras bovinas, a las que se les han ido realizando ecografías transrectales de los ovarios a lo largo de 5 periodos semanales con revisiones ecográficas seriadas diarias de lunes a jueves; administrando todos los lunes durante el experimento una dosis de prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ), para producir la regresión del cuerpo lúteo. Mediante seguimiento ecográfico se ha determinado el tamaño óptimo de los folículos a puncionar y la regresión completa de los cuerpos lúteos. Los ovocitos se obtuvieron mediante punción y aspiración de folículos del ovario con la ayuda de ecografía transvaginal, técnica conocida como OPU (Ovum pick-up). Al concluir la experiencia, se han obtenido 7 ovocitos de un total de 15 sesiones, con una eficiencia de recogida del 47%. Este resultado se puede considerar aceptable tal y como refieren otros autores con eficiencias del 50-70% de ovocitos recogidos, si valoramos que se ha puncionado un único folículo preovulatorio en cada sesión y que no se ha empleado estimulación hormonal previa. Así mismo, el intervalo de PGF2 $\alpha$ -OPU eficiente en diestro ha sido de 48-72 h en los animales utilizados en el estudio, tal y como se cita en la bibliografía. Finalmente, podríamos concluir que existen variaciones individuales en los resultados en función de la edad, raza, condición corporal y variabilidad genética individual, pues factores tales como la alimentación, estado de lactación, estrés o ambiente eran semejantes en los animales ensayados.

**Palabras clave:** ecografía, PGF2 $\alpha$ , bovino, ovocito, OPU.

### ABSTRACT

This Final Degree Project has had the aim of obtaining matured oocytes *in vivo* from bovine females without previous hormonal stimulation. These oocytes will be used afterwards in a wider research project, called "Obtaining of healthy offspring by assisted reproductive technologies mimicking physiological conditions"

(Ref. AGL2015-66341-R), from the “Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad” implemented by Physiology of Reproduction Research Group within Physiology Department of Veterinary Faculty from the University of Murcia. A part of this project aims to obtain bovine oocytes matured *in vivo* without previous stimulation of gonadotrophic hormones, to later analyze DNA methylation of these cells during preimplantation period. These results will be compared with other ones that we acquired from the same bovine females with a previous stimulation with GnRH and FSH. Actually, the research is in progress so there are not results yet, but in the future all that information is expected to increase the efficiency of embryo production *in vitro* both quantitative and qualitatively, thankfully to the complete profile of DNA methylation obtained in both cells types, so that could prevent some important diseases in adult period and ageing. We have worked with three bovine females (two cows and one heifer) and by transrectal echography of ovaries during five weekly periods daily from Monday to Thursday. We administrated each Monday during the experiment a dose of prostaglandin (PGF2 $\alpha$ ) to produce the regression of the corpus luteum. With the help of the monitoring echography every 24 h, we have established the optimum size of the follicle to puncture and the complete regression of corpora lutea. The oocytes have been obtained by puncture and aspiration of the ovarian follicles. Therefore, the minimum diameter of the preovulatory follicle that has been punctured was of 15 mm with the aid of transvaginal echography, by ovum pick-up (OPU) technique. The collected oocytes were evaluated and classified by their morphology and characteristics of their cytoplasm and cumulus cells. At the end of the experience we have obtained 7 oocytes from a total of 15 sessions, with a recovery efficiency of 47%. This result can be considered acceptable as other authors refer efficiencies of 50% to 70% of collected oocytes, if we value that it has been punctured one unique preovulatory follicle in each session and it has not been used hormonal stimulation previously. Likewise, the PGF2 $\alpha$ -OPU efficient interval in diestrus has been from 48 to 72 h in the animals used in the study, as it has been cited in the bibliography. Also the time passed from the administration of PGF2 $\alpha$  until an efficient OPU session has been variable among the animals used in our experience. In the Holstein females, the PGF2 $\alpha$ -OPU interval has been 48 h, comparing with Alpine Brown cow, in which this period was 72 h. We could conclude that there exist individual variations in the results based on the age, race, corporal condition and individual genetic variation, so factors such as the diet, milking or dry condition, stress or the environment were similar in the tested animals. Finally, this Final Degree Project is, above all, a methodological study, considering that in this project, we have applied different reproductive techniques (echography, OPU, etc.) for the consecution of the final objective, obtain matured oocytes *in vivo* for epigenetic and DNA methylation analysis during the preimplantation period in the cow.

**Key words:** echography, PGF2 $\alpha$ , bovine, oocyte, OPU.