



PREMIOS ICOVV

ILUSTRE COLEGIO
OFICIAL · DE
VETERINARIOS
DE · VALENCIA

Trabajos ganadores de la edición 2024

ÍNDICE

■	Resumen galardonados PREMIOS ICOVV.....	3
■	Categoría Vicente Dualde Pérez.....	6
	Primer premio.....	7
	Segundo premio.....	29
	Tercer premio.....	54
■	Categoría Juan Morcillo Olalla.....	75
■	Categoría Fotografía Veterinaria.....	78
	Primer premio.....	79
	Segundo premio.....	81
	Tercer premio.....	83

CATEGORÍA VICENTE DUALDE PÉREZ

SUBCATEGORÍA ARTÍCULO INÉDITO

1^{er} PREMIO

Clinical and biochemical effects of intra-articular autologous conditioned serum and triamcinolone in an equine model of sinovitis.

Autores: Ana Velloso Álvarez (3126), Anne Wooldridge, Fred Caldwell, Sandra Zetterström y Bruno Menarim.

2^o PREMIO

Coinfecciones en perros de la Comunidad Valenciana: epidemiología e implicaciones clínicas.

Autores: María del Carmen Catalá Tetuán (3533) y Jesús Cardells Peris (1269).

3^o PREMIO

Aplicabilidad de un sistema de sensores inerciales para la optimización del rendimiento de caballos de doma clásica.

Autores: Tamara Martín Giménez (2931), Paola Marescaux, Ignacio de Blas Giral y Antonio M. Cruz Madorran (2806).

SUBCATEGORÍA DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

1^{er} PREMIO

Anaesthetic mortality in dogs: A worldwide analysis and risk assessment.

Autores: José Ignacio Redondo García (1319), Pablo E. Otero, Fernando Martínez-Taboada, Luis Doménech, Eva Zoe Hernández Magaña (2538) y Jaime Viscasillas (2928).

2^o PREMIO

Evaluation of the effect of etamsylate on thromboelastographic traces of canine blood with and without the addition of heparin.

Autores: Vicente Herrería Bustillo (1727), Maite Masiá Carrillo (2799), Helen R P Phillips y Laura Gil Vicente (1632).

3^o PREMIO

Machine Learning Techniques for Canine Myxomatous Mitral Valve Disease Classification.

Autores: Javier Enguel Manchado (1169), Jose Alberto Montoya Alonso, Luis Doménech, Oscar Monge-Utrilla, Yamir Reina-Doreste, Jorge Isidoro Matos, Alicia Caro-Vadillo, Laín García-Guasch, José Ignacio Redondo (1319).

CATEGORÍA JUAN MORCILLO

SUBCATEGORÍA ARTÍCULO INÉDITO

1^{er} PREMIO

Desierto

2^o PREMIO

Desierto

3^o PREMIO

Desierto

SUBCATEGORÍA DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

1^{er} PREMIO

Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in household domestic ferrets (Mustela putorius furo) in Spain, 2019-2023.

Autor: Jacobo Giner (1051).

2^o PREMIO

Desierto

3^o PREMIO

Desierto

CATEGORÍA FOTOGRAFÍA VETERINARIA

1^{er} PREMIO

La vida se abre paso.

Autor: Vicente Soriano Benet (1301).

2^o PREMIO

Escherichia coli, de la huerta a la placa.

Autor: Carlos Martínez Gil (1771).

3^o PREMIO

Pasando lista.

Autora: Patricia Carulla Pascual (2990).



PREMIOS
ICOVV

ILUSTRE COLEGIO
OFICIAL DE
VETERINARIOS
DE VALENCIA

CATEGORÍA VICENTE DUALDE PÉREZ

Clínica Veterinaria de pequeños animales, exóticos, equino y producción animal

1^{er} premio

PRIMER PREMIO

Clinical and biochemical effects of intra-articular autologous conditioned serum and triamcinolone in an equine model of sinovitis.

Ana Velloso Álvarez (3126), Anne Wooldridge, Fred Caldwell, Sandra Zetterström y Bruno Menarim.

Clinical and biochemical effects of intra-articular autologous conditioned serum and triamcinolone in an equine model of synovitis

ABSTRACT

All metacarpo/metatarsophalangeal(fetlock) joints of six healthy, adult horses were randomly assigned to treatment with the following: phosphatebuffered saline (PBS), IL-1 β (100 ng), ACS, IL-1 β +ACS, and IL-1 β +TA. Clinical signs of lameness, heat, joint swelling, and synovial effusion were scored and recorded for 72 hours after each treatment. Synovial fluid was collected at 0-, 8-, 24-, and 48 hours post-injection (PIH) for cytology and measurement of PGE2 and glycosaminoglycan. Fetlock joints injected with IL-1 β +TA or PBS had lower heat, swelling, and effusion compared to fetlock joints injected with IL-1 β , ACS, or IL-1 β +ACS groups ($P < 0.05$). IL-1 β +ACS produced a significant reduction in lameness compared to IL-1 β at 24, 36, and 72 PIH ($P = 0.005$, 0.005 , and 0.01 respectively) and to IL-1 β +TA group at 36 and 72 hours ($P = 0.02$ and 0.03). IL- 1 β +ACS had the highest total nucleated cell count (TNCC) ($40,625 \pm 11.01$ cells/ μ L) and TP (3.73 ± 0.63 g/dl) of all groups. At 8 PIH, PGE2 concentrations were increased with IL-1 β treatment but this peak was not observed with IL- β combined with TA or ACS ($P < 0.001$) treatment. The glycosaminoglycan (GAG) concentration in synovial fluid was higher at 24 and 48 PIH ($P < 0.001$) for the IL- 1 β +TA group. Overall, TA was effective in reducing joint effusion and swelling scores, while ACS reduced lameness induced by IL-1 β . However, ACS treatment increased the TNCC without an increase in GAG production while improving lameness, showing better chondroprotection than TA. In conclusion, ACS treatment could improve joint homeostasis in the treatment of acute synovitis.

KEYWORDS

horse; synovitis; autologous conditioned serum.

INTRODUCTION

Synovitis, plays a critical role in the development and progression of OA (1-3). Cross-talk that occurs between the articular cartilage and synovial membrane during synovial inflammation is important for promoting the production of proinflammatory cytokines and catabolic enzymes, which destroy articular cartilage (2). However, it has been shown that this initial inflammatory response by the innate immune system is needed to promote restoration of synovial homeostasis, known as inflammatory resolution (4, 5). Macrophages, especially those present within the synovial membrane, play a key role in orchestrating this response through their production of synovial fluid, anti-inflammatory cytokines, chemokines, and growth factors, released in response to the initial inflammatory insult (4-6). Induced models of synovitis are essential to better understand how rapid and effective treatment may promote innate immune cells in their response to reduce further damage to the

1^{er} premio

synovial compartment. Currently, the mainstay of intraarticular therapeutics is focused on modifying the signs of disease through temporary reduction of inflammation via intra-articular administration of corticosteroids. However, there is concern regarding the use of these medications and potential deleterious effects on articular cartilage metabolism (7,8). Given our current understanding of the critical role that synovitis plays in the development of OA, treatment of synovitis should not only be directed to the modification of clinical signs (i.e., lameness) but also be directed toward modification of the synovial environment to reduce progression of disease. Synovitis is an important inflammatory condition of the synovial environment in which appropriate therapeutic intervention could have positive long-lasting effects on the long-term health of the joint (9, 10).

Autologous conditioned serum (ACS) is an intra-articularly administered biologic, derived from the patient's blood and used by many equine practitioners to treat OA. Incubation of blood with activating surfaces (conditioning) results in increased production of important anti-inflammatory cytokines, pro-resolving mediators, and growth factors (11). The conditioned serum contains increased concentrations of several anti-inflammatory cytokines and growth factors including interleukin-1 receptor antagonist protein (IL-1rap), interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor- β (TGF- β), and insulin-like growth factor (IGF-1) (12). In humans, ACS appeared to improve synovial homeostasis better than platelet-rich plasma(13). Therefore, these anti-inflammatory cytokines and growth factors contained in equine ACS may have the potential to modulate the innate immune response of the synovium and support anabolic matrix metabolism of the articular cartilage (2, 14).

In human and equine medicine, intra-articular treatment with corticosteroids remains the mainstay of treatment for OA (15, 16). Due to the potent antiinflammatory effect of corticosteroids, intra-articular administration is also common in the treatment of sterile synovitis. However, due to the proposed deleterious time- and dose- dependent effects of corticosteroids on articular cartilage, some clinicians may turn to other articular medications such as ACS to resolve acute synovial inflammation without deleterious effects to the articular cartilage. A direct comparison of these two treatments in the face of acute, sterile synovial inflammation (synovitis) has not been performed. The objectives of this study were to compare the clinical and biochemical effects of treatment with TA and ACS in a mild, temporary model of synovitis within the metacarpo/metatarsophalangeal joints of six healthy horses using IL-1 β . The hypotheses were: 1) IL-1 β would induce mild, self-limiting synovitis in normal metacarpo/metatarsophalangeal joints (MCPJ/ MTPJ). Maximum severity of synovitis was expected at 8 post-injection hours (PIH) with resolution within 24-36 PIH, and 2) ACS and TA would improve clinical signs of synovitis and similarly protect the articular cartilage extracellular matrix, but ACS would cause a stronger anti-inflammatory effect reducing concentration of PGE2 more efficiently than TA treatment.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

This study was performed in accordance with Institutional and NIH guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, and the study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at Auburn University (protocol #2017-3043). Six adult male horses (3 Quarter horses, 2 Warmbloods, and 1 Thoroughbred, aged 14.6 ± 4.99 years) free of systemic disease were used. Horses were not free of lameness, but pain was not localized to the metacarpo/metatarsophalangeal joints (MCPJ/ MTPJ) based on negative response to fetlock flexion tests using an objective analysis of gait before and after flexion tests (17). Baseline lameness evaluations were performed using an inertial sensor system (The Lameness Locator® by Equinosis). Horses that exhibited a positive response to fetlock flexion based on subjective and objective assessment were excluded from the study.

Study Design

The study was a blinded, 5 sequence, 5 period, and 5-treatment crossover design. Each treatment period was defined as 72 hours, followed by at least 2- weeks between study periods (18). The first 4 randomized treatments of MCP/MTP joints included: phosphate-buffered saline (PBS, negative control), IL-1 β induced synovitis (positive control), IL-1 β induced synovitis treated with ACS, and IL-1 β induced synovitis treated with triamcinolone acetonide (TA) (Figure 1). Each MCP/MTP joint received only one of the 1st 4 treatments at each treatment period. Sequence and treatment were randomly assigned using commercially available software. After analyzing raw data regarding the synovial response to treatments by an unblinded investigator (LB), a fifth treatment group involving the same horses was created. For this group, ACS alone was administered into a randomly selected fetlock. This was elected to understand the effect of ACS without IL-1b within the joint. This treatment was administered 3 months after the last study period. Investigators (FC, JS, AW, and LB were not blinded to treatment), but investigators (AVA, SZ) that evaluated the clinical effects of intraarticular treatment [objective lameness evaluation, and evaluating synovial response (heat, effusion, circumference)] were blinded to treatment.

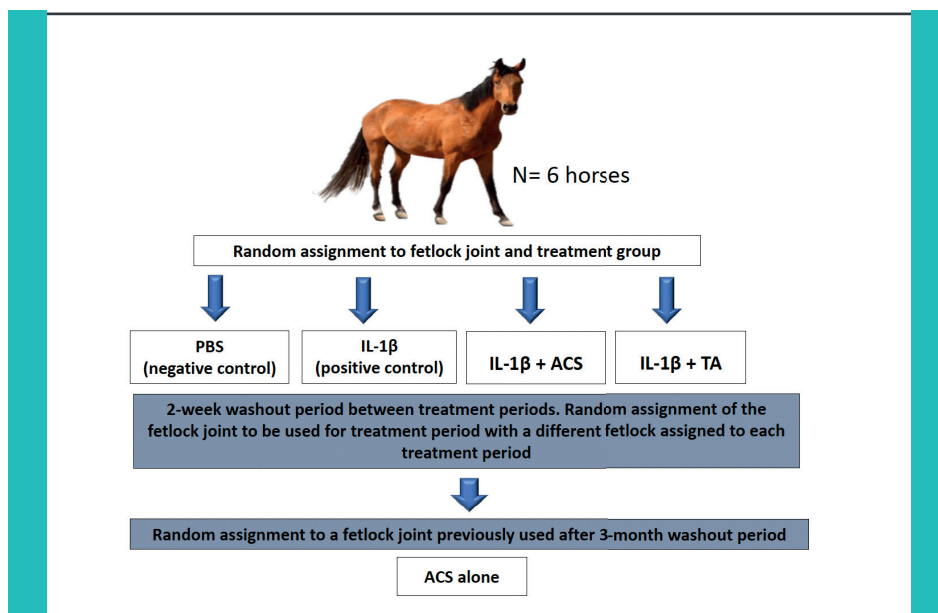


Figure 1. Study design. Random assignment to groups: Negative control, positive control Autologous Conditioned Serum (ACS) and Triamcinolone (TA).

Autologous conditioned serum (ACS) preparation

ACS (Orthokine®; Overland Park, KS) was prepared according to manufacturer's instructions. Briefly, blood was collected aseptically and processed according to the manufacturer's instructions to produce ACS. ACS administered during the study was processed for each horse before starting the study to avoid the possibility that stress might influence results of the study. Twenty-four hours before initiation of the study, horses were restrained within stocks. Sixty ml of blood was withdrawn aseptically into a commercially available syringe containing glass beads. Blood was incubated at 37°C for 24 hours, then centrifuged at 3,000 rcf for 10 min and serum was collected. ACS was sterilely aliquoted into 6 ml syringes (4 ml ACS/syringe) and stored at -80 °C.

Intra-articular treatments

Intra-articular injections were administered in 4-4.5 ml volumes as follows by the unblinded investigator (LB), each group was performed individually and a 2-week washout period was allowed between treatments:

- 1) Negative control: 4 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS).
- 2) Positive control: 100 ng equine recombinant IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN) diluted in 4 ml of sterile PBS to a concentration of 25 ng/ml, in a sterile fashion. This dose of IL-1 β used for study of equine synovitis caused well-documented in vivo response (19).
- 3) ACS: 4 ml of ACS injected intra-articularly.
- 4) IL-1 β + ACS: 100 ng of IL-1 β diluted in 500 μ l of PBS injected immediately prior to injection of 4 ml of ACS.
- 5) IL-1 β + TA: 100 ng of IL-1 β diluted in 500 μ l of PBS injected immediately prior to injection of 4 mg of TA (0.4 ml) mixed with 3.6 ml of sterile PBS.

1^{er} premio**Evaluation of Clinical Response**

During the 5 study periods, the clinical response was evaluated by two investigators blinded to treatment (AVA, SZ).

1.- Physical examination:

Rectal temperature, heart rate, and respiratory rate were measured, and clinical signs of pain were monitored. These parameters were recorded every 2 hours until PIH 8, every 4 hours until PIH 16, and then every 12 hours until PIH 72.

2.- Metacarpo/Metatarsophalangeal (MCPJ/MTPJ) joint evaluation:

The MCPJ or MTPJ regions were subjectively scored for heat using digital palpation at PIH 0, 8, 16, 24, 36, 48 and 72 hrs. Joint effusion and maximal degree of fetlock flexion were also measured at these times. Heat was graded from 0 to 3 (0 = none, 1 = minor, 2 = moderate, and 3 = severe). Joint circumference and degrees of flexion were measured with a standard measuring tape and a protractor, respectively. In addition, a digital infrared thermometer (ThermoPro, Toronto, ON) was used to measure the temperature of the skin at the synoviocentesis site. Horses were kept for 10 minutes at room temperature inside a building to allow acclimatization before the measurements. These temperatures were compared to skin temperature measured at the same site on the contralateral limb.

Joint swelling was subjectively graded from 0 to 4 (0 = no swelling; 1 = minimal swelling localized to the injection site; 2 = mild swelling localized to the MCP/MTPJ; 3 = moderate swelling extending proximally toward the carpus or tarsus; and 4 = marked swelling extending to or above the carpus or tarsus). Joint circumference (mm) was measured at the level of the proximal sesamoid bones, 2 cm proximal to the ergot (20), using a standard cloth measuring tape. The site for circumferential measurement was marked prior to intra-articular injection by clipping the hair away on a horizontal line on the dorsal aspect of and palmar/plantar aspect of the joint. This ensured that joint circumference was consistently measured at the same site on the limb during the study period.

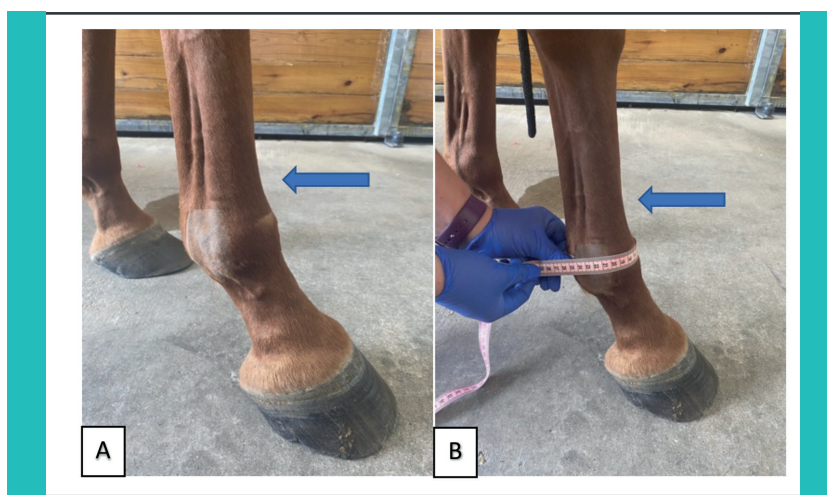


Figure 2. Joint circumference measurement.

A) Initial landmarks (blue arrow) and B) measurement following the landmark.

1^{er} premio

Passive flexion was done until obtaining a painful reaction and it was subjectively graded from 0 to 3 (0= none; 1= minor; 2= moderate; 3= severe). Additionally, a protractor (placed centered on the MCPJ/MTPJ) was used to objectively measure the maximum range of flexion (Figure 3). The angle measurement was obtained by flexing the fetlock until a painful response was noted and then measuring the angle at that point.

Clinical evaluations were performed on each horse prior to each study period and prior to synovial fluid collection.



Figure 3. Degree of the maximum flexion was measured objectively with a protractor placed over the center of the fetlock joint. The protractor was placed over the lateral side of the joint in extension (A) and the joint was flexed until a pain response was noted and then measured (B).

3.- Lameness evaluation:

Lameness was evaluated objectively using an inertial sensor system (Lameness locator, Equinosis LLC, Columbia, Missouri, USA) at 0, 8, 16, 24, 36, 48, and 72 hours PIH. The Vector Sum data, which measures the intensity of the lameness (differences between the DiffMax and DiffMin in mm) was compared to the baseline in all the treatment groups. Horses could show lameness on baseline unrelated to pathology within the fetlock joint. Differences between baseline and treatment Vector Sum was calculated.

Synovial fluid cytology

1.- Synovial Fluid collection:

At the start of each study period, horses were sedated with xylazine hydrochloride (0.02-0.8 mg/kg IV). The fetlock assigned for treatment during that study period was clipped and aseptically prepared. The collateral sesamoidean ligament approach to the metacarpophalangeal joint was used because synovial fluid is more readily obtained uncontaminated with blood from this site (21). Approximately 3 ml of synovial fluid were collected. Treatment syringes were prepared by unblinded investigators (LB, FC, JS) and placed in non-transparent syringes for administration. Without removing the needle, the prepared treatment was injected into the fetlock joint. Synovial fluid was collected using the same technique at PIH 8, 24, and 48 hrs by a blinded investigator (AVA).

1^{er} premio

2.- Synovial fluid analysis:

Synoviocentesis was performed at each time point obtaining a maximum of 3 mL. The samples were divided and 500 µL of synovial fluid were transferred to a collection tube containing EDTA for cytological analysis: Total nucleated cell count (TNCC) was measured on an automated processor (Advia 2120 hematology analyzer; Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Germany) and validated on direct cytology preparations. Total protein (TP) was measured on a handheld refractometer. Cytological findings and differential cell counts were performed by two board-certified veterinary clinical pathologists (ECG and TJT), who were blinded to the sample treatments. The remaining synovial fluid was aliquoted into Eppendorf tubes, centrifuged (600 RMP for 10 minutes at 4°C), supernatant removed and stored at -80°C until further analysis.

PGE₂ concentrations in synovial fluid

Thawed samples (200 µL) were hyaluronidase-digested (10 µL of 100 IU hyaluronidase/mL acetate buffer; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) for 30 minutes at 37°C, centrifuged (12,000 RPM for 10 min; 4°C), and supernatant recovered. PGE₂ was quantified by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Briefly, hyaluronidase-digested samples were solid-phase extracted (500 µL synovial fluid in 490 µL 100% ethanol and 10 µL glacial acetic acid incubated at 23°C for 5 minutes), centrifuged (600 RPM for 8 min; 4°C), and supernatant collected (22). Samples were diluted at 1:20, and PGE₂ measurements were performed in duplicate according to the manufacturer's instructions. This colorimetric assay was not equine-specific; however, it has been previously referenced and validated for cross-reactivity in equine synovial fluid (23-25). Standards provided for the ELISA were used to prepare a standard curve following manufacturer's instructions.

1,9-dimethyl methylene blue assay (DMMB)

DMMB assay was performed to measure GAG concentration in the synovial fluid. Synovial samples were digested with hyaluronidase as previously described and the supernatant recovered. The 1,9-dimethyl methylene blue dye (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared following the method of Farndale et al (26). The standard curve was created by preparing solutions containing 0 to 65 µg of chondroitin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Briefly, using a 96-well flat-bottom transparent plate (Stellar Scientific, Baltimore, MD, USA) 50 µL of diluted digested synovial fluid (1:10 dilution in distilled water) were mixed with 200 µL of DMMB dye (1 mM hydrochloric acid, 0.06% DMMB, 40 mM glycine, 27 mM NaCl pH 3) and the plate was shaken on a horizontal orbital microplate shaker (0.12" orbit) at 500 RPM for 5s. Measurement of the total GAG content was performed by a direct spectrophotometric method. Optical density was measured at 525 nm on a microplate reader (SpectraMax ID3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (27). Samples were measured in triplicate.

Statistical analysis

Linear or generalized linear mixed models were used to analyze each clinical or biochemical variable. Cell counts were not normally distributed, and it was natural log-transformed to obtain normality.

1^{er} premio

prior analysis. The generalized linear mixed models (GLMM) for heat, swelling, joint effusion and pain to flexion included fixed factors for treatment, time, and a treatment by time interaction effect. The linear mixed models (LMM) for angle, circumference, heart rate, temperature, respiratory rate, white blood cell count, total protein, red blood cell count, specific gravity, front limb lameness, hind limb push lameness and hind limb impact lameness included fixed factors for treatment, time and a treatment by time interaction effect. The LMM for temperature on limb included fixed factors for treated (yes/none), location, time, and treatment and all 2-, 3- and one 4-way interaction effects. Random intercepts were included in all GLMMs and LMMs for each horse and fetlock within each horse was included to account for within horse and within fetlock correlations. Model residuals for LMMs were examined to evaluate the assumption of normality. Simple effects were tested to compare treatments at each time and multiple comparisons were adjusted for using Tukey's test. Satterthwaite degrees of freedom method was used in all models.

RESULTS

Clinical parameters

No differences between treatments for respiratory rate ($P = 0.431$) or rectal temperature ($P = 0.717$) were observed for all time points. Differences in heart rate between ACS alone and PBS, IL-1 β , IL-1 β + TA, and IL-1 β + ACS groups were observed at 6, 8, 12 and 24 hours PIH (Figure 4). At 6, 8, 12 and 24 PIH, the heart rate was lower in the group receiving ACS compared to IL-1 β alone ($P = 0.03$, $P = 0.001$, $P = 0.02$ and $P = 0.01$, respectively). At 8 and 12 PIH, the ACS group had a lower heart rate compared to IL-1 β + TA group ($P = 0.001$ and $P = 0.03$).

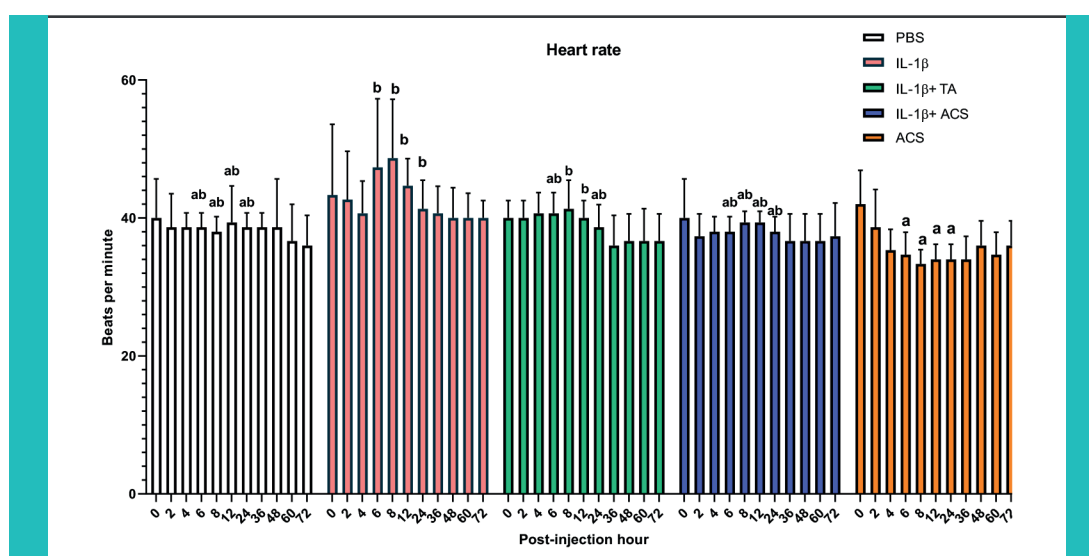


Figure 4. Heart rate after injecting a fetlock joint with phosphate-buffered saline (PBS), Equine recombinant IL-1 β (IL-1 β), IL-1 β + triamcinolone (TA), IL-1 β + autologous conditioned serum (ACS), or ACS. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) between groups at 6, 8, 12 and 24 PIH. Bar graphs indicate the mean and standard deviation.

Metacarpo/Metatarsophalangeal joint (MCPJ/MTPJ) evaluation

The skin over the joints injected with IL-1 β , IL-1 β + TA, and IL-1 β + ACS had a higher temperature than the skin of the contralateral joint at all the time points ($P < 0.05$). Differences in heat scores between treatment groups were observed at 8, 16-, 36-, 48-, and 72-hours post-injection (Figure 5). Eight hours postinjection, the cutaneous heat score in the ACS group was lower than the cutaneous heat scores of PBS, IL-1 β , and IL-1 β + ACS groups ($P = 0.001$). At 16 hours, the IL-1 β + TA group had a lower cutaneous heat score compared to PBS ($P = 0.04$), IL-1 β ($P = 0.01$) and IL-1 β + ACS ($P = 0.03$) groups. At 36- and 48- hours post-injection, the IL-1 β + TA group still had lower cutaneous heat score than all treatment groups ($P = 0.001$), though at 72 hours, the ACS group had a significantly lower cutaneous heat score temperature than all the other groups ($P = 0.001$).

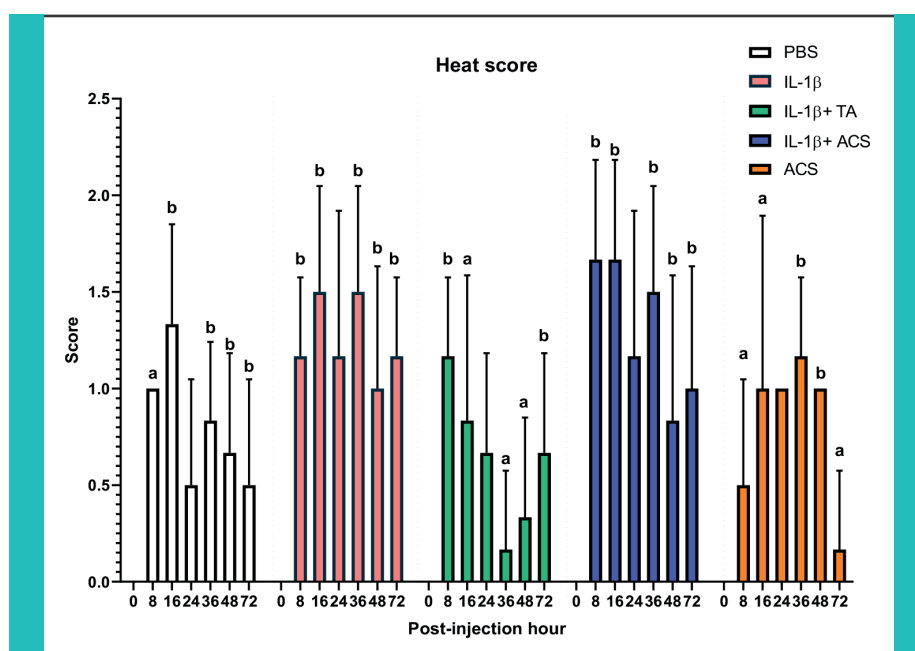


Figure 5. Cutaneous heat scores after injecting a fetlock joint with phosphatebuffered saline (PBS), Equine recombinant IL-1 β (IL-1 β), IL-1 β + triamcinolone (TA), IL-1 β + autologous conditioned serum (ACS), or ACS. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) between groups at 8, 16, 36, 48 and 72 PIH. Bar graphs indicate the mean and standard deviation.

Swelling was more severe at 72 hours in the PBS, IL-1 β , IL-1 β + TA, and IL-1 β + ACS compared to the ACS group. Differences in swelling scores between treatment groups were observed at 8, 16, 24, 36, 48, 72 hours post-injection (Figure 6). Eight hours post-injection, the swelling score in the ACS group was lowest compared to the rest of the groups ($P = 0.001$). At 16 hours, the ACS group had decreased swelling compared to IL-1 β ($P = 0.03$) and IL-1 β + ACS ($P = 0.04$). At 24 and 36 hours post-injection, IL-1 β + TA had lower swelling scores compared to IL-1 β ($P = 0.001$ and $P = 0.003$), IL-1 β + ACS ($P = 0.001$ for both time points), and ACS ($P = 0.01$ and $P = 0.03$) groups. The groups IL-1 β + TA and ACS group had lower swelling scores compared to the IL-1 β and IL-1 β + ACS at 48 hours ($P = 0.001$) and 72 hours ($P = 0.002$).

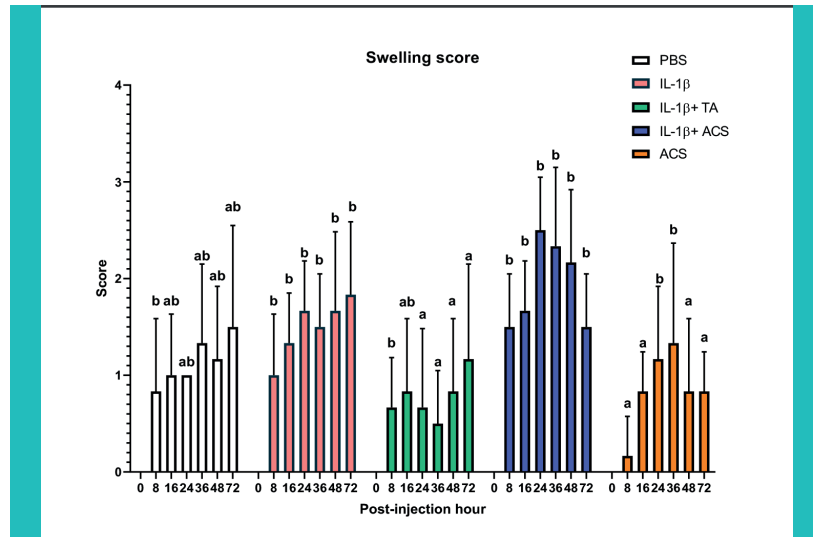
1^{er} premio

Figure 6. Swelling score after injecting a fetlock joint with phosphate-buffered saline (PBS), Equine recombinant IL-1 β (IL-1 β), IL-1 β + triamcinolone (TA), IL-1 β + autologous conditioned serum (ACS), or ACS. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) between groups at 8, 16, 24, 36, 48 and 72 PIH. Bar graphs indicate the mean and standard deviation.

Differences in joint effusion scores between treatment groups were observed at 8, 16, 24, 36, 48, 72 hours post-injection (Figure 7). At all-time points postinjection, the IL-1 β and IL-1 β + ACS had more joint effusion than other groups ($P = 0.001$). IL-1 β + TA group had the lowest joint effusion scores at 36, and 48 PIH ($P = 0.001$). No differences in pain response to flexion were found between groups at any time point. When measuring the range of flexion with a protractor, the IL-1 β group had a reduced range of flexion compared to IL-1 β + TA ($P = 0.04$) and ACS ($P = 0.03$) at 48 hours.

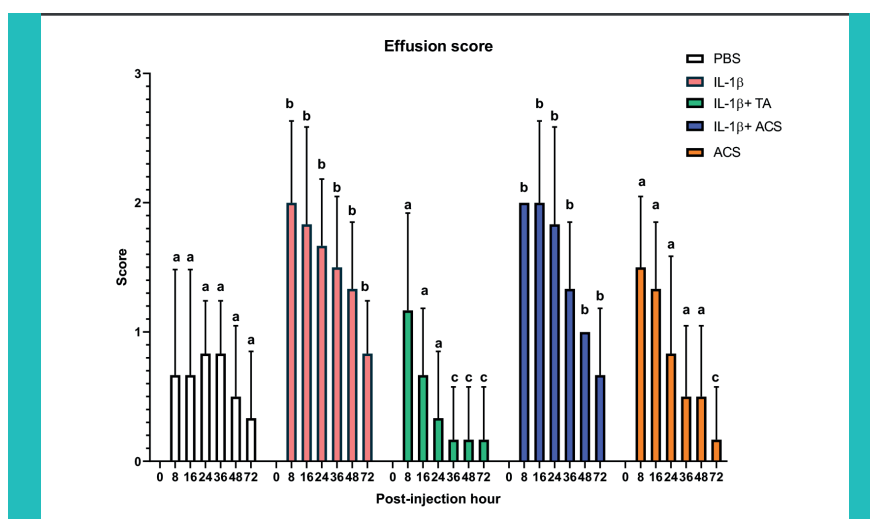


Figure 7. Joint effusion scores after injecting a fetlock joint with phosphatebuffered saline (PBS), Equine recombinant IL-1 β (IL-1 β), IL-1 β + triamcinolone (TA), IL-1 β + autologous conditioned serum (ACS), or ACS. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) between groups at 8, 16, 24, 36, 48 and 72 PIH. Bar graphs indicate the mean and standard deviation.

1^{er} premio

Lameness evaluation

The lameness score (vector sum value) obtained for each time point was compared to baseline, and each treatment group was compared at 8, 16, 24, 36, 48 PIH (Figure 8). In the groups where IL-1 β was injected alone or combined with TA or ACS, a mild to moderate increase in lameness was observed (12.5 ± 3.22 mm). Injection of IL-1 β + ACS induced less lameness than injection of IL-1 β alone at 24, 36, and 72 PIH ($P = 0.005$, 0.005 , and 0.01 respectively). Curiously, for all horses whose joints were injected with ACS alone lameness improved from baseline compared to each time point. When comparing IL-1 β + TA and IL-1 β + ACS groups, lameness was less marked with the addition of ACS to IL-1 β compared to the addition of TA to IL-1 β at 36 and 72 PIH ($P = 0.02$ and 0.03).

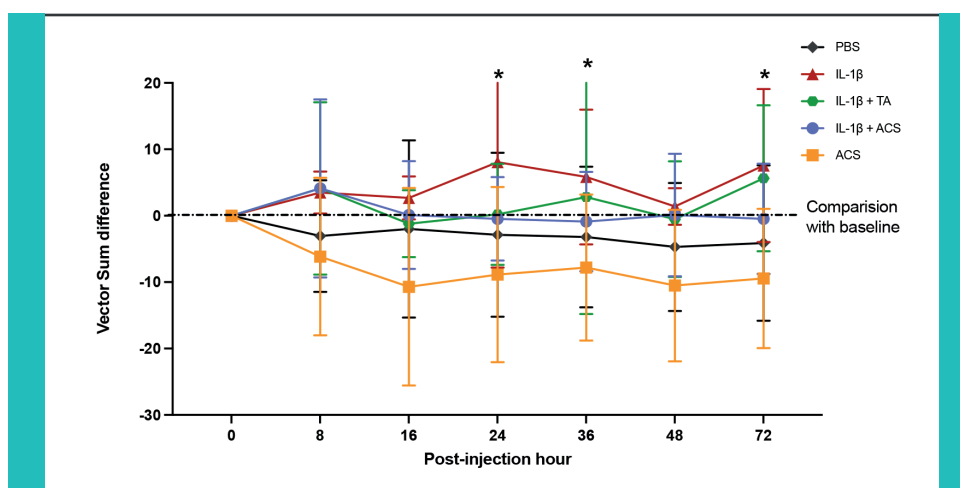


Figure 8. Lameness measured objectively compared to baseline after injection of phosphate-buffered saline (PBS), Equine recombinant IL-1 β (IL-1 β), IL-1 β + triamcinolone (TA), IL-1 β + autologous conditioned serum (ACS), or ACS treatment groups. The symbols represent the mean, and the error bars the standard deviation. *Denotes significant difference between groups at the same time point, $p < 0.05$.

Synovial fluid cytology

Synovial fluid was obtained from all horses for all study periods and time points (Figure 9). At 8 and 24 PIH, the TNCC was higher in all groups compared to PBS ($P = 0.01$). At 8 PIH horses injected with IL-1 β , IL-1 β + ACS, and ACS alone had a significant increase in TNCC compared to PBS and IL-1 β + TA ($P < 0.001$) that gradually decreased over time, with no significant difference noted at 48 PIH. This increase was primarily owing to an increase in neutrophils, which were significantly lower in the PBS treatment group compared to remaining treatments ($P < 0.001$). At 24 and 48 PIH, the percentage of monocytes was increased in the ACS treatment group compared to IL-1 β , IL-1 β + TA, and IL-1 β + ACS group ($P = 0.001$). When comparing between groups, the IL-1 β + ACS group produced the highest TNCC ($40,625 \pm 11.01$ cells/ μ L; $P = 0.001$). Similarly, IL-1 β , IL-1 β + ACS, and ACS alone had a significant increase in TP in synovial fluid at 8 PIH compared to baseline ($P < 0.001$). This increase in TP remained in the IL-1 β + ACS and ACS groups at 24 PIH ($P = 0.001$ and 0.01 respectively), but no differences between groups were observed at 48 PIH.

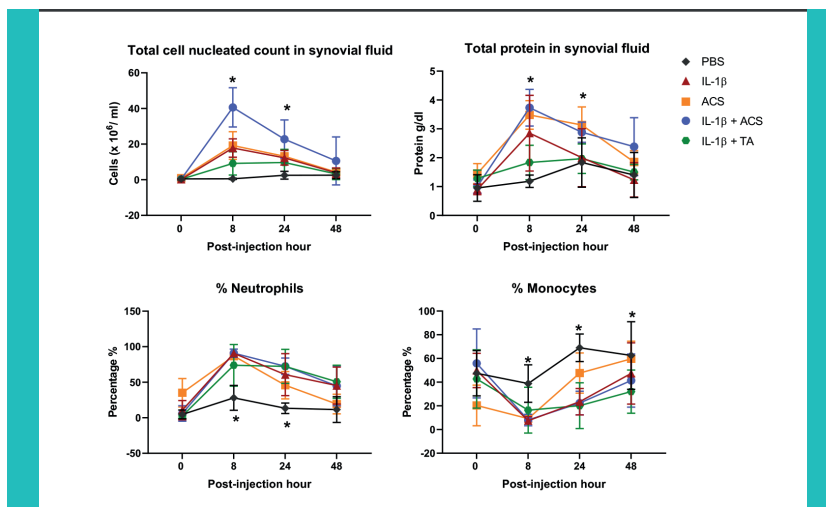


Figure 9. Synovial fluid analysis parameters after injection phosphate-buffered saline (PBS), Equine recombinant IL-1 β (IL-1 β), IL-1 β + triamcinolone (TA), IL-1 β + autologous conditioned serum (ACS), or ACS treatment groups. The symbols represent the mean, and the error bars the standard deviation. *Denotes significant difference between groups at the same time point, $p < 0.05$.

PGE₂ concentrations in synovial fluid

PGE₂ synovial fluid concentration was evaluated at 0, 8, 24, and 48 PIH (Figure 10) for all the groups. PGE₂ was increased by 1.6-fold in the IL-1 β group ($P < 0.001$) compared to baseline, but no significant increase in PGE₂ concentration was observed for all other treatments at any time point. One horse, after injection of IL-1 β , had an increase of PGE₂ 5.7 times higher at 8 PIH than the average PGE₂ of five other horses in the same group.

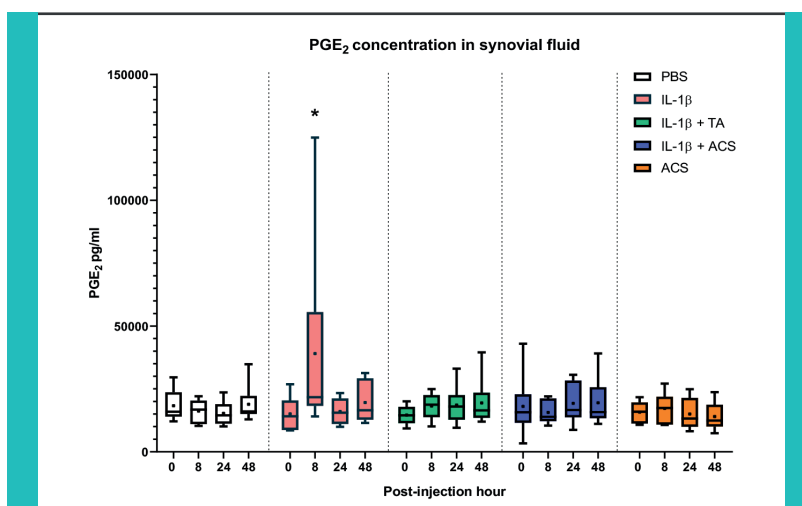


Figure 10. PGE₂ concentrations in the synovial fluid at 0, 8, 24, and 48 hours after injecting a fetlock joint with phosphate-buffered saline (PBS), Equine recombinant IL-1 β (IL-1 β), IL-1 β + triamcinolone (TA), IL-1 β + autologous conditioned serum (ACS), or ACS. The boxplots represent the interquartile range (IQR) of $n = 6$. The black lines represent the median values, the black dot represent the mean, and the whiskers represent the values outside the IQR. *Denotes significant difference between IL-1 β group at 8 PIH compared to the rest of the groups at the same time point, $P < 0.05$.

1^{er} premio

1,9-dimethyl methylene blue assay (DMMB)

GAG concentration was measured in synovial fluid at 0, 8, 24, and 48 PIH (Figure 11). No significant difference was observed in the median GAG concentration in the PBS, IL-1 β , IL-1 β + ACS, and ACS groups during any time points. When comparing treatment groups, an increased concentration of GAG was measured in the IL-1 β + TA group at 24 and 48 PIH ($P < 0.001$).

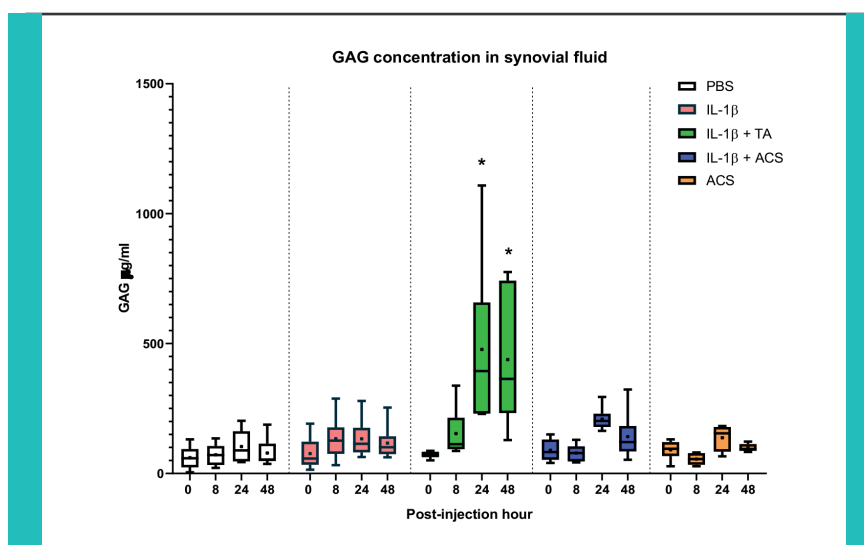


Figure 11. GAG concentrations in the synovial fluid at 0, 8, 24, and 48 hours after injecting a fetlock joint with phosphate-buffered saline (PBS), Equine recombinant IL-1 β (IL-1 β), IL-1 β + triamcinolone (TA), IL-1 β + autologous conditioned serum (ACS), or ACS. The boxplots represent the interquartile range (IQR) of $n = 6$. The black lines represent the median values, black dot represent the mean, and the whiskers represent the values outside the IQR. *Denotes significant difference between IL-1 β + TA group at 24 and 48 PIH compared to the rest of the groups at the same time point, $P < 0.05$.

DISCUSSION

The joint innate immune system responds to a pathogen with an initial rapid onset inflammatory response in which an increased number of neutrophils, macrophages, monocytes, and dendritic cells are observed (5). The problem arises when this initial high cell count and synovial response becomes overwhelmed maintaining a low-grade inflammation, that might lead to the establishment of OA (6, 9, 28). As hypothesized, the combination of IL-1 β with ACS or TA decreased inflammation demonstrated by decreasing PGE2 concentration in synovial fluid at 8 PIH. However, the effects on clinical signs, synovial fluid cellularity, and GAG concentration were different upon each treatment. IL-1 β + ACS induced the most marked neutrophilic response in synovial fluid, yet this treatment produced the most significant reduction in lameness. TA combined with IL-1 β decreased heat, swelling, and effusion from the fetlock joint, but GAG concentration was higher at 24 and 48 hours in joints treated with IL-1 β and TA indicating possible cartilage damage. Because an increase in GAG was not seen in joints injected with IL-1 β and ACS, ACS may be superior to TA in providing chondroprotection, despite a relative increase in synovial fluid cellularity.

1^{er} premio

Synovitis leads to activation of the inflammatory cytokine cascade that can produce articular destruction of cartilage matrix leading to OA. Response from the synovial membrane following an injury can initiate synovitis and promote OA (3, 29). The effects of intra-articular treatment with TA or ACS have been evaluated in both disease-free and OA-afflicted joints in horses (23, 30-32), but no studies have evaluated the effect of these therapeutics in an in vivo model of synovitis. Different synovitis models have been described in the horse, but IL-1 β was selected for this model since it is one of the most important pro-inflammatory cytokines participating in the development of OA, and IL-1 β has been validated in the horse as a synovitis model for the middle carpal joint (19). The intra-articular injection of IL-1 β produced mild synovitis that could be observed clinically, cytologically, and by production of a peak in PGE₂ concentration at 8 PIH.

The primary goal of intra-articular therapies is to modify the inflammatory cascade to reduce cartilage destruction. ACS was shown to have diseasemodifying properties in human and equine studies by reducing clinical signs of joint disease and reducing the cellular response in synovial fluid, increasing the concentration of IL-1rap in synovial fluid, and improving histologic scores in the synovial membrane (23, 33-35). In this study, the injection of IL-1 β with ACS produced the highest TNCC and total protein in synovial fluid, but ACS alone produced an increase in the TNCC and total protein similar to IL-1 β alone. An increase in TNCC and total protein have been considered an undesired combination for a healthy synovial environment (36). However, previous research has demonstrated that intra-articular injection of platelet-rich products or mesenchymal stem cells into joints of horses produced a transient inflammatory reaction that can be seen both clinically (increase synovial effusion) and cytologically (increased TNCC, neutrophil population, and total protein in synovial fluid), not only without deleterious effects but associated with inflammation resolution (37-39). Injection of TA produced a less marked increase of TNCC and reduced the clinical signs of joint disease such as heat and synovial effusion compared to other treatments but caused detrimental cartilaginous effects. In a previous study where synovitis was induced with lipopolysaccharide, TA did not reduce the TNCC and total protein but significantly improved the lameness and synovial effusion (20). Despite the induction of mild yet temporary synovitis, PGE₂ concentration in the ACS alone group was not elevated at any time point. PGE₂ is considered a pro-inflammatory mediator within the joint (40). Because the concentration of PGE₂ in synovial fluid did not increase after injecting IL-1 β combined with ACS or TA in joints indicates a beneficial effect of these intraarticular treatments.

According to a meta-analysis evaluating the effects of intra-articularly administered corticosteroids in people and other species, a low dose of TA may have chondral protection effects on articular cartilage, but the effect became detrimental when the dose of TA in a joint equaled or exceeded an 18-mg cumulative dose per joint (41). In vivo, TA administration produced an increase of catabolic cartilage biomarkers and downregulation of collagen and aggrecan gene expression (30, 42), leading to the conclusion that TA could have detrimental effects when repeatedly administered intra-articularly. In our study, the combination of IL-1 β with TA improved heat, swelling, and joint effusion scores, without an increase in PGE₂ concentration in synovial fluid. However, the increased concentration in GAG at 24 and 48 hours indicates that the administration TA in inflamed joints is possibly chondrodestructive. In two human studies, where TA was compared to ACS for treatment

1^{er} premio

of hip OA or lumbar radicular compression, ACS significantly ameliorated the patient's pain compared to similar treatment with TA (43, 44). In our study, the addition of ACS produced a cellular response, but improved lameness compared to baseline. When comparing treatments, TA did not abolish the effect of IL-1 β to generate lameness and lameness was significantly improved in the IL-1 β +ACS group. Although no other studies have compared effects of TA and ACS in a synovitis model, Jostingmeir et al. reported that lameness scores in horses with naturally occurring OA of the distal interphalangeal joint improved more substantially when injected with ACS compared to a combination of betamethasone and hyaluronic acid (45).

Previous synovitis studies in horses with lipopolysaccharide or IL-1 β have measured PGE2 and GAG concentration in synovial fluid as outcome measurements for synovitis (19, 46-48). Increased concentration of PGE₂ and GAG in synovial fluid correlates with repeated arthrocentesis in a previous study (49). However, in the current study, the group injected with PBS received the same number of arthrocentesis, and the synovial fluid cytology, PGE₂, and GAG concentrations in synovial fluid were not affected. A previous study showed treatment of IL-1 β stimulated synovial and cartilage explants in co-culture with ACS, significantly decreased PGE2 concentration in media, while TA did not (50). An increased concentration of PGE2 and GAG was correlated with OA changes in experimentally induced OA in horses (50). In this study, the intra-articular injection of ACS also reduced lameness scores and PGE2 concentration compared to the control group (PBS) (23). In the present study, reduced lameness was correlated with decreased PGE2 concentration.

Previous studies using an IL-1 β synovitis model in the middle carpal joint showed higher synovial cell concentrations at 8 hours (170.70 ± 37.58 cells/ μ L) than the same model in the fetlock used in this study (17.80 ± 5.12 cells/ μ L) (19). Previously, Colbath et al. reported that the same intra-articular dose of IL-1 β elicits a significantly different response in the middle carpal joint compared to the tarsocrural joint. There is only one study in which IL-1 β was used to stimulate synovitis in the metatarsophalangeal joint of the horse (46). However, in this study, the model was used to evaluate the efficacy of perineural local anesthetics, and synovial fluid was not analyzed after stimulation. Pain (lameness) was used as a positive indicator for induction of synovitis (51). The metacarpo/metatarsophalangeal joint may respond differently than the middle carpal and tibiotarsal joints, possibly explaining our lower TNCC compared to previous studies performed on different synovial joints. Other indicators of synovial inflammation, including an increase in clinical parameters (lameness, joint effusion, and heat) and synovial fluid biomarkers (PGE2 and GAG), indicated induction of mild synovitis in the present study.

This study had limitations that warrant further discussion. Inflammatory resolution is a novel concept described as an active process orchestrated primarily by macrophages to restore joint homeostasis (52). In particular, IL-10 production by the macrophages seems to play an essential role in establishing synovial homeostasis (53). The inflammatory process resulting in production of IL-10 is necessary for a joint to recover from an inflammatory insult, which makes researchers question if total inhibition of the inflammatory reaction could be detrimental. Measurement of IL-10 in synovial fluid was not performed in this study and could have helped better determine if the inflammatory process occurring after ACS injection was beneficial rather than detrimental (6, 10).

1^{er} premio

The initial experimental design did not include the use of ACS alone, but because of a marked increase in the TNCC and TP observed in the IL-1 β + ACS group, unblinded investigators chose to evaluate the intra-articular effect of ACS when administered alone. Variation in the treatment effect of ACS could have been affected by the inherent variation of ACS cytokine composition that has been described in horses (12). As an example, surgical stress after castration has been shown to interfere with the cytokine concentration in ACS (11). Therefore, ACS in the current study was processed on each horse before starting the study to avoid any possible interference due to stress. The model induced a short and mild synovitis in the metacarpo/metatarsophalangeal joint of the horses compared to previous studies using the same dose in the middle carpal or tarsocrural joint, making the evaluation of outcomes measured during the study difficult. Additionally, variability in response to IL-1 β between individuals and manufacturing concerns such as different lots, methods of reconstitution, and storage has been reported to lead to varying levels of activity of intra-articularly administered IL-1 β (18, 19, 46, 54). For the present study, all IL-1 β administered were from the same lot and stored and reconstituted identically. Future studies evaluating different dosages of IL-1 β to stimulate synovitis in the metacarpo/metatarsophalangeal joint are warranted. Also, measurement of more specific anabolic cartilage biomarkers such as CPII and CS-846 or different proinflammatory cytokines in synovial fluid could aid our understanding of the intraarticular effects of TA and ACS in horses with synovitis.

CONCLUSIONS

Intra-articular administration of ACS alone produces a mild, but transient inflammatory response with increased heat over the joint, joint swelling and effusion, increased TNCC in synovial fluid without producing lameness. In horses with synovitis, intra-articular treatment with ACS might be more beneficial than treatment with TA. Both treatments appeared to decrease production of PGE₂, but ACS treatment did not produce an increase in GAG concentration in synovial fluid, thus having the potential to decrease cartilage catabolism compared to the potentially deleterious effect of intra-articularly administered corticosteroids. A deeper understanding of how biological therapeutics modify the acutely inflamed synovial environment is needed.

1^{er} premio

BIBLIOGRAPHY

- 1.- PALMER JL, BERTONE AL. *Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease*. Equine veterinary journal. 1994;26(4):263-77.
- 2.- MCILWRAITH CW, FRISBIE DD, KAWCAK CE. *The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis*. Bone Joint Res. 2012;1(11):297-309.
- 3.- SUTTON S, CLUTTERBUCK A, HARRIS P, GENT T, FREEMAN S, FOSTER N, et al. *The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis*. Veterinary journal (London, England : 1997). 2009;179(1):10-24.
- 4.- MENARIM BC, GILLIS KH, OLIVER A, NGO Y, WERRE SR, BARRETT SH, et al. *Macrophage Activation in the Synovium of Healthy and Osteoarthritic Equine Joints*. Frontiers in veterinary science. 2020;7.
- 5.- ESTRADA McDERMOTT J, PEZZANITE L, GOODRICH L, SANTANGELO K, CHOW L, DOW S, et al. *Role of Innate Immunity in Initiation and Progression of Osteoarthritis, with Emphasis on Horses*. Animals (Basel).m2021;11(11):3247.
- 6.- MENARIM BC, GILLIS KH, OLIVER A, MASON C, WERRE SR, LUO X, et al. *Inflamed synovial fluid induces a homeostatic response in bone marrow mononuclear cells in vitro: Implications for joint therapy*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.m2020;34(3):4430-44.
- 7.- SESHADRI V, COYLE CH, CHU CR. *Lidocaine potentiates the chondrotoxicity of methylprednisolone*. Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association. 2009;25(4):337-47.
- 8.- MURRAY RC, ZNAOR N, TANNER KE, DEBOWES RM, GAUGHAN EM, GOODSHIP AE. *The effect of intraarticular methylprednisolone acetate and exercise on equine carpal subchondral and cancellous bone microhardness*. Equine veterinary journal. 2002;34(3):306-10.
- 9.- GONCARS V, KALNBERZS K, JAKOBSONS E, ENGELE I, BRIEDE I, BLUMS K, et al. *Treatment of Knee Osteoarthritis with Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Injection: 12-Month Follow-up*. Cartilage. 2019;10(1):26-35.
- 10.- MENARIM BC, MACLEOD JN, DAHLGREN LA. *Bone marrow mononuclear cells for joint therapy: The role of macrophages in inflammation resolution and tissue repair*. World Journal of Stem Cells. 2021;13(7):825-40.
- 11.- FJORDBAKK CT, JOHANSEN GM, LOVAS AC, OPPEGARD KL, STORSET AK. *Surgical stress influences cytokine content in autologous conditioned serum*. Equine veterinary journal. 2015;47(2):212-7.

1^{er} premio

- 12.- HRAHA TH, DOREMUS KM, MCILWRAITH CW, FRISBIE DD. *Autologous conditioned serum: the comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood*. Equine veterinary journal. 2011;43(5):516-21.
- 13.- SHIROKOVA L, NOSKOV S, GOROKHOVA V, REINECKE J, SHIROKOVA K. *Intra-Articular Injections of a Whole Blood Clot Secretome, Autologous Conditioned Serum, Have Superior Clinical and Biochemical Efficacy Over Platelet-Rich Plasma and Induce Rejuvenation-Associated Changes of Joint Metabolism: A Prospective, Controlled Open-Label Clinical Study in Chronic Knee Osteoarthritis*. Rejuvenation Res. 2020;23(5):401-10.
- 14.- MCILWRAITH CW. *From arthroscopy to gene therapy--30 years of looking in joints*. Proceedings of the annual convention - American Association of Equine Practitioners. 2005;51:65-113.
- 15.- ZANOTTO GM, FRISBIE DD. *Current joint therapy usage in equine practice: Changes in the last 10 years*. Equine veterinary journal. 2021.
- 16.- MCALINDON TE, LAVALLEY MP, HARVEY WF, PRICE LL, DRIBAN JB, ZHANG M, et al. *Effect of Intraarticular Triamcinolone vs Saline on Knee Cartilage Volume and Pain in Patients With Knee Osteoarthritis: A Randomized Clinical Trial*. Jama. 2017;317(19):1967-75.
- 17.- VAN WEEREN R. *Equine biomechanics: From an adjunct of art to a science in its own right*. Equine veterinary journal. 2012;44(5):506-8.
- 18.- TOTH F, SCHUMACHER J, SCHRAMME MC, HECHT S. *Effect of anesthetizing individual compartments of the stifle joint in horses with experimentally induced stifle joint lameness*. American journal of veterinary research. 2014;75(1):19-25.
- 19.- ROSS TN, KISIDAY JD, HESS T, MCILWRAITH CW. *Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide*. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society. 2012;20(12):1583-90.
- 20.- KAY AT, BOLT DM, ISHIHARA A, RAJALA-SCHULTZ PJ, BERTONE AL. *Anti-inflammatory and analgesic effects of intra-articular injection of triamcinolone acetone, mepivacaine hydrochloride, or both on lipopolysaccharide-induced lameness in horses*. American journal of veterinary research. 2008;69(12):1646-54.
- 21.- MISHEFF MM, STOVER SM. *A comparison of two techniques for arthrocentesis of the equine metacarpophalangeal joint*. Equine veterinary journal. 1991;23(4):273-6.
- 22.- MENARIM BC, GILLIS KH, OLIVER A, MASON C, NGO Y, WERRE SR, et al. *Autologous bone marrow mononuclear cells modulate joint homeostasis in an equine in vivo model of synovitis*. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2019;33(12):14337-53.

1^{er} premio

- 23.- FRISBIE DD, KAWCAK CE, WERPY NM, PARK RD, MCILWRAITH CW. *Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis*. American journal of veterinary research. 2007;68(3):290-6.
- 24.- CARRADE HOLT DD, WOOD JA, GRANICK JL, WALKER NJ, CLARK KC, BORJESSON DL. *Equine mesenchymal stem cells inhibit T cell proliferation through different mechanisms depending on tissue source*. Stem cells and development. 2014;23(11):1258-65.
- 25.- MANINCHEDDA U, LEPAGE OM, GANGL M, HILAIRET S, REMANDET B, MEOT F, et al. *Development of an equine groove model to induce metacarpophalangeal osteoarthritis: a pilot study on 6 horses*. PloS one. 2015;10(2):e0115089.
- 26.- FARNDAL RW, BUTTLE DJ, BARRETT AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochim Biophys Acta. 1986;883(2):173-7.
- 27.- OKE SL, HURTIG MB, KEATES RA, WRIGHT JR, LUMSDEN JH. *Assessment of three variations of the 1,9- dimethylmethylene blue assay for measurement of sulfated glycosaminoglycan concentrations in equine synovial fluid*. American journal of veterinary research. 2003;64(7):900-6.
- 28.- EVERETT JB. *Bone Marrow Mononuclear Cell for Equine Joint Disease*: Virginia Tech; 2020.
- 29.- MATHIESSEN A, CONAGHAN PG. *Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications*. Arthritis Res Ther. 2017;19(1):18.
- 30.- Celeste C, Ionescu M, Robin Poole A, Laverty S. Repeated intraarticular injections of triamcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolism measured by biomarkers in synovial fluid. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2005;23(3):602-10.
- 31.- DE GRAUW JC, VISSER-MEIJER MC, LASHLEY F, MEEUS P, VAN WEEREN PR. *Intra-articular treatment with triamcinolone compared with triamcinolone with hyaluronate: A randomised open-label multicentre clinical trial in 80 lame horses*. Equine veterinary journal. 2016;48(2):152-8.
- 32.- LASARZIK J, BONDZIO A, RETTIG M, ESTRADA R, KLAUS C, EHRLE A, et al. *Evaluation of Two Protocols Using Autologous Conditioned Serum for Intra-articular Therapy of Equine Osteoarthritis—A Pilot Study Monitoring Cytokines and Cartilage-Specific Biomarkers*. Journal of Equine Veterinary Science. 2018;60:35- 42.e2.
- 33.- BALTZER AW, MOSER C, JANSEN SA, KRAUSPE R. *Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis*. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society. 2009;17(2):152-60.

1^{er} premio

- 34.- DARABOS N, HASPL M, MOSER C, DARABOS A, BARTOLEK D, GROENEMEYER D. *Intraarticular application of autologous conditioned serum (ACS) reduces bone tunnel widening after ACL reconstructive surgery in a randomized controlled trial*. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA. 2011;19 Suppl 1(1):S36-46.
- 35.- CARLSON ER, STEWART AA, CARLSON KL, DURGAM SS, PONDENIS HC. *Effects of serum and autologous conditioned serum on equine articular chondrocytes treated with interleukin-1beta*. American journal of veterinary research. 2013;74(5):700-5.
- 36.- FRISBIE D, JOHNSON A. *Synovial Joint Biology and Pathobiology*. In: Auer JA, Stick JA, Kummerle JM, Prange T, editors. Equine Surgery (Fifth Edition). Saint Louis: W.B. Saunders; 2019. p. 1326-48.
- 37.- TEXTOR JA, TABLIN F. *Intra-Articular Use of a Platelet-Rich Product in Normal Horses: Clinical Signs and Cytologic Responses*. Veterinary Surgery. 2013;42(5):499-510.
- 38.- PIGOTT JH, ISHIHARA A, WELLMAN ML, RUSSELL DS, BERTONE AL. *Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses*. Vet Comp Orthop Traumatol. 2013;26(6):453-60.
- 39.- SMIT Y, MARAIS HJ, THOMPSON PN, MAHNE AT, GODDARD A. *Clinical findings, synovial fluid cytology and growth factor concentrations after intra-articular use of a platelet-rich product in horses with osteoarthritis*. Journal of the South African Veterinary Association. 2019;90(1):1-9.
- 40.- LEE AS, ELLMAN MB, YAN D, KROIN JS, COLE BJ, VAN WIJNEN AJ, et al. *A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain*. Gene. 2013;527(2):440-7.
- 41.- WERNECKE C, BRAUN HJ, DRAGOO JL. *The Effect of Intra-articular Corticosteroids on Articular Cartilage: A Systematic Review*. Orthop J Sports Med. 2015;3(5):2325967115581163-.
- 42.- KNYCH HK, VIDAL MA, CHOUICHA N, MITCHELL M, KASS PH. *Cytokine, catabolic enzyme and structural matrix gene expression in synovial fluid following intra-articular administration of triamcinolone acetonide in exercised horses*. Equine veterinary journal. 2017;49(1):107-15.
- 43.- BECKER C, HEIDERSDORF S, DREWLO S, DE RODRIGUEZ SZ, KRAMER J, WILLBURGER RE. *Efficacy of epidural perineural injections with autologous conditioned serum for lumbar radicular compression: an investigatorinitiated, prospective, double-blind, reference-controlled study*. Spine (Phila Pa 1976). 2007;32(17):1803-8.
- 44.- BALTZER AW, OSTAPCZUK MS, STOSCH D, SEIDEL F, GRANRATH M. *A new treatment for hip osteoarthritis: clinical evidence for the efficacy of autologous conditioned serum*. Orthop Rev (Pavia). 2013;5(2):59-64.

1^{er} premio

- 45.- JOSTINGMEIER U, REINECKE J, HERTSCH B. *Comparison of intraarticular injection of autologous conditioned serum (ACS, irap) vs sodium hyaluronate and corticosteroid in front limb coffin joint derived lameness*. The Australian Equine Veterinarian. 2010;2010(3):75-
- 46.- COLBATH AC, DOW SW, HOPKINS LS, PHILLIPS JN, MCILWRAITH CW, GOODRICH LR. *Induction of Synovitis Using Interleukin-1 Beta: Are There Differences in the Response of Middle Carpal Joint Compared to the Tibiotarsal Joint?* Frontiers in veterinary science. 2018;5:208.
- 47.- LUCIA JL, COVERDALE JA, ARNOLD CE, WINSKO KN. *Influence of an intra-articular lipopolysaccharide challenge on markers of inflammation and cartilage metabolism in young horses*. Journal of animal science. 2013;91(6):2693-9.
- 48.- COLBATH AC, DOW SW, HOPKINS LS, PHILLIPS JN, MCILWRAITH CW, GOODRICH LR. *Single and repeated intra-articular injections in the tarsocrural joint with allogeneic and autologous equine bone marrowderived mesenchymal stem cells are safe, but did not reduce acute inflammation in an experimental interleukin-1beta model of synovitis*. Equine veterinary journal. 2020;52(4):601-12.
- 49.- VAN DEN BOOM R, VAN DE LEST CH, BULL S, BRAMA RA, VAN WEEREN PR, BARNEVELD A. *Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E2 and glycosaminoglycans in healthy equine joints*. Equine veterinary journal. 2005;37(3):250-6.
- 50.- VELLOSO ALVAREZ A, BOONE LH, PONDUGULA SR, CALDWELL F, WOOLDRIDGE AA. *Effects of Autologous Conditioned Serum, Autologous Protein Solution, and Triamcinolone on Inflammatory and Catabolic Gene Expression in Equine Cartilage and Synovial Explants Treated With IL-1 β in Co-culture*. Frontiers inveterinary science. 2020;7(323).
- 51.- COLERIDGE M, SCHUMACHER J, DEGRAVES F. *Comparison of lameness scores after a low 4-point nerve block to lameness scores after additional desensitisation of the dorsal metatarsal nerves in horses with experimentally induced pain in the metatarsophalangeal joint*. Equine Veterinary Education. 2018;32(4):199- 203.
- 52.- FULLERTON JN, GILROY DW. *Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier*. Nat Rev Drug Discov. 2016;15(8):551-67.
- 53.- BUCKLEY CD, GILROY DW, SERHAN CN. *Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation*. Immunity. 2014;40(3):315-27.
- 54.- NELSON BB, KING MR, FRISBIE DD. *Assessment of a novel equine tarsocrural experimental joint disease model using recombinant interleukin-1 β and arthroscopic articular sampling of the medial malleolus of the tibia on the standing sedated horse*. The Veterinary Journal. 2017;229:54-9.

2º premio

SEGUNDO PREMIO

*Coinfecciones en perros de la Comunidad Valenciana:
epidemiología e implicaciones clínicas.*

Autores: Maria del Carmen Catalá (3533) y Jesús Cardells (1269).

2º premio

Coinfecciones en perros de la Comunidad Valenciana: epidemiología e implicaciones clínicas

RESUMEN

El cambio climático, las modificaciones del terreno y de los hábitats han hecho que se produzca un incremento del movimiento de los reservorios, lo que ha llevado a un aumento de las enfermedades caninas transmitidas por vectores. Hay enfermedades emergentes y reemergentes siendo algunas de ellas zoonóticas. Por su prevalencia y gravedad, tanto para los perros como para las personas, en el levante español cabe destacar la leishmaniosis, transmitida por flebotomos, la babesiosis, borreliosis (enfermedad de Lyme), anaplasmosis y ehrlichiosis, estas cuatro últimas transmitidas por garrapatas ixodidas. La infección de un patógeno no excluye de la infección de otro, pudiéndose dar co-infecciones de dos o más patógenos al mismo tiempo. Los órganos del animal pueden ser atacados por uno o más patógenos a la vez, pudiendo la patogenia ser aditiva de cada uno de los patógenos o incrementarse de manera exponencial, siendo mucho más grave para el animal. El objetivo de este estudio es doble, por una parte, conocer la seroprevalencia en perros de las co-infecciones transmitidas por vectores en el levante español, y por otra parte, conocer si la co-infección altera los parámetros bioquímicos de manera significativa respecto a la infección por un único patógeno. Las co-infecciones que se han observado son muy elevadas, 82,7 % (144/174). El proteinograma es el biomarcador que se afecta con más frecuencia, estando más alterado cuantos más patógenos coinciden en el mismo animal.

PALABRAS CLAVE

Leishmania, Ehrlichia, Babesia, Anaplasma, Borrelia

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de los perros transmitidas por vectores (Canine vector-borne diseases-CVBDs) son actualmente un problema emergente y presentan un carácter zoonótico, por lo que los perros pueden servir de centinelas de las infecciones humanas (1, 2). Las CVBDs están causadas tanto por bacterias como por parásitos. Los parásitos más importantes pertenecen al phylum Protozoa y son *Leishmania infantum* y *Babesia canis*, y las bacterias más frecuentes e importantes que afectan a estos cánidos son *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* y están transmitidas por garrapatas y mosquitos (1,2,3,4). Estas infecciones son muy frecuentes en climas tropicales, subtropicales y en regiones templadas (5).

2º premio

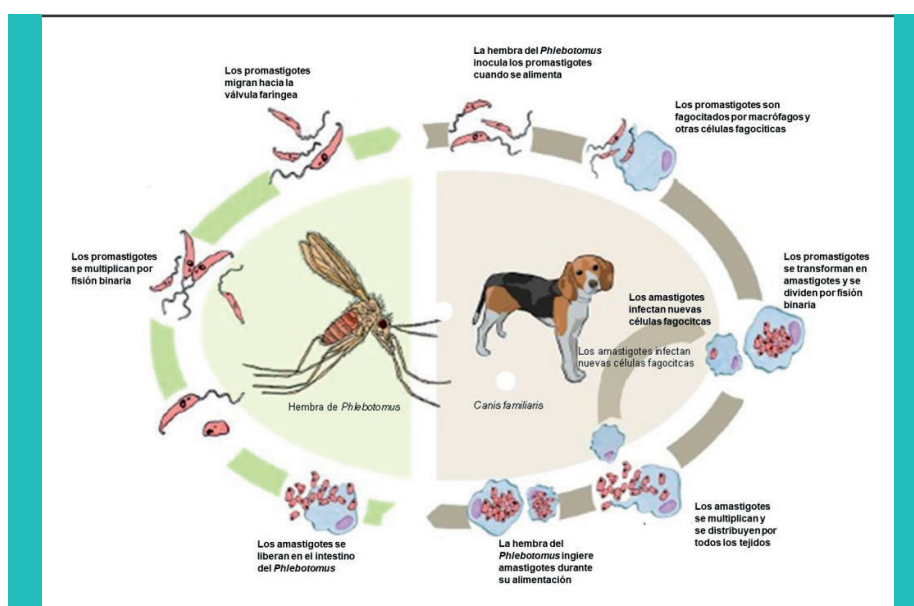
Principales agentes patógenos transmitidos por vectores en perros

1.- *Leishmania infantum*

a) Etiología y ciclo biológico

El protozoo *Leishmania* produce la leishmaniosis, enfermedad zoonótica de amplia distribución mundial. La infección se produce principalmente por la picadura del mosquito *Phlebotomus* (6). Son varias las especies que componen el género, siendo *Leishmania infantum* la más frecuente y distribuida por todo el mundo (7). También, cabe destacar que es la especie que predomina en el Mediterráneo (8). En zonas endémicas, existe una población reservorio que no presenta signos clínicos evidentes y el riesgo de transmisión está ligado al ciclo biológico del *Phlebotomus*, que necesita temperaturas cálidas y materia orgánica, estos factores están relacionados con las condiciones climáticas locales (9, 10, 11).

El ciclo biológico de *Leishmania spp.* es de tipo indirecto, en el hospedador vertebrado se encuentra en forma de amastigote, dentro de los macrófagos. La hembra del flebotomo cuando pone huevos necesita un aporte de proteína extra y consume sangre. En la succión, la hembra ingiere macrófagos infectados por amastigotes de *Leishmania*, y estos en el aparato digestivo del mosquito se convierten en promastigotes. En pocos días migran a las piezas bucales y se transforman en promastigotes metacíclicos, y, cuando la hembra vuelve a ingerir sangre los inocula en el hospedador vertebrado. En el tejido subcutáneo los promastigotes se transforman en amastigotes y son fagocitados por los macrófagos, el parásito se multiplica dentro de la vacuola parasitaria (figura 1) (12).

Figura 1.- Ciclo biológico *Leishmania infantum* (7).

2º premio

b) Patogenia y signos clínicos

La leishmaniosis es una enfermedad multisistémica con una gran variedad de mecanismos patógenos implicados en su evolución. El elemento patógeno primario es la supervivencia y multiplicación del parásito en el sistema fagocítico mononuclear. Esta parasitación produce la alteración funcional, con disminución de la capacidad fagocítica y de la actividad como células presentadoras de antígenos (13). Tradicionalmente, los perros infectados se han clasificado como sensibles o resistentes. Respecto a los primeros, el parásito se multiplica sin restricciones en múltiples órganos. Por el contrario, en los perros resistentes se produce la muerte del parásito en el interior de los macrófagos (14). El mecanismo patógeno primario no justifica por sí solo la clínica ni las lesiones producidas, existe un segundo mecanismo patógeno, responsable de gran variedad de alteraciones con respuesta inmunitaria ineficaz, en la que los mecanismos celulares y humorales constituyen elementos inmunopatológicos. Los mecanismos inmunitarios celulares dan lugar a un proceso reactivo tisular, más o menos generalizado, cuyo componente fundamental es una reacción inflamatoria proliferativa. Esta reacción está caracterizada por un infiltrado celular, compuesto por macrófagos (parasitados o no), linfocitos, y células plasmáticas, que crea un proceso degenerativo y necrótico que va causando de manera progresiva una alteración estructural y funcional de los órganos afectados (15). La mayoría de los perros afectados presentan anorexia, apatía, adelgazamiento y debilidad, signos poco específicos (16). Habitualmente, se ve una alteración en el proteinograma caracterizada por hipergammaglobulinemia con hipoalbuminemia y reducción del cociente albúmina/globulina (16,17).

c) Diagnóstico

La presentación de signos clínicos compatibles con leishmaniosis en animales en zonas endémicas debe llevar a realizar pruebas de diagnóstico etiológico, ya sean métodos directos, para confirmar la presencia del parásito en el hospedador, o métodos indirectos que midan la respuesta del hospedador mediante test serológicos (18).

Los métodos directos van desde la confirmación de la presencia del parásito en un aspirado de un nódulo linfático y posterior tinción, hasta técnicas moleculares como PCR, pero estos métodos no son usados habitualmente (19). La interpretación de los resultados de las pruebas directas hay que realizarla con cuidado, ya que la correlación entre infección y enfermedad debe basarse en la presencia de signos clínicos y anormalidades laboratoriales (18).

Las técnicas más comunes son la inmunofluorescencia indirecta (IFAT o IFI), la inmunocromatografía y test de ELISA. La inmunocromatografía es muy rápida, pero solo indica presencia o ausencia de anticuerpos, mientras que las otras son más sensibles y proporcionan concentración de anticuerpos, sirviendo para poder evaluar la gravedad de la infección, así como valorar el éxito de los tratamientos (7, 22).

2º premio

2.- *Babesia canis*

a) Etiología y ciclo biológico

Las babesias son hemoparásitos del orden Piroplasmida y junto al género *Theileria* se agrupan bajo el término de piroplásmidos, que reciben este nombre por su característica forma de pera dentro de los eritrocitos (23).

Gracias a los estudios moleculares se distinguen distintas especies y subespecies de *Babesia*; *Babesia canis*, de mayor tamaño que se subdivide en tres subespecies; *B. canis canis*, *B. canis vogeli* y *B. canis rossii* y *Babesia gibsoni* de pequeño tamaño (23).

El ciclo biológico es indirecto y consta de tres generaciones: gametogonia y esporogonia que se desarrollan en el hospedador invertebrado, en este caso en las garrapatas. La esquizogonia, tercera fase que se desarrolla en el mamífero, en el interior de los eritrocitos íntegramente.

La garrapata se infecta cuando ingiere sangre con eritrocitos parasitados, los merozoitos aspirados realizan la gametogonia en el intestino y el ooquinetos, migra a glándulas salivares y se produce la esporogonia. En el caso de *Babesia spp.* se coloniza el aparato reproductor, infectando así, todos los huevos de la garrapata y también estará presente en cada una de las mudas que realice la garrapata, transmisión transovárica y transestadial, respectivamente (figura 2) (24).

Estas piroplasmosis se transmiten por distintas garrapatas; *Dermacentor reticulatus* es el vector más importante de *Babesia canis*, y prefiere climas fríos y húmedos. *Rhipicephalus* que transmite *Babesia canis vogeli* y *B. canis rossii*; muy abundante en el área mediterránea. (25, 26).

b) Patogenia y signos clínicos

La severidad de la infección viene determinada por la especie y cepa del parásito, por la edad, estado inmunitario y también por la presencia de enfermedades concomitantes.

El mecanismo patógeno primario es la lisis eritrocitaria por la multiplicación del parásito en el interior de los hematíes, esto provoca una anemia hemolítica. La anemia conduce a anoxia, originando lesiones en hígado y bazo, y un aumento del metabolismo anaerobio celular que puede desencadenar en acidosis metabólica (23).

Los zoítos presentan enzimas proteolíticos que ayudan a la transformación de la precalicreína a calicreína y esto, por una parte, provoca la liberación de bradiquinina que ocasiona hipotensión, aumento de la permeabilidad vascular y edema. Por otro lado, se favorece la coagulación intravascular diseminada, pudiendo llegar en los casos más graves a muerte por shock hipovolémico (23, 27).

2º premio

Los signos clínicos de la enfermedad pueden ir desde infecciones subclínicas con animales asintomáticos (28) y cuadros no patognomónicos de leve apatía y trombocitopenia hasta un fallo renal agudo, coagulopatías, ictericia y hemólisis autoinmune con alteración del SNC (29).

c) Diagnóstico

En las zonas endémicas, la aparición de signos como fiebre, depresión, palidez de mucosas y anorexia es suficiente como para incluir la babesiosis en los diagnósticos diferenciales (23).

En casos agudos con hipertermia se puede realizar el diagnóstico parasitológico, haciendo una extensión de sangre y posterior tinción. Morfológicamente, se pueden distinguir las babesias grandes, que correspondería a *B. canis* y las babesias pequeñas que correspondería a *Babesia microti-like*. Los test serológicos, como el IFAT o ELISA ponen en evidencia la presencia de anticuerpos. No obstante, se debe tener en cuenta la duración de los anticuerpos en sangre, que pueden ser de hasta un año. Las pruebas moleculares han contribuido enormemente a descubrir la diversidad de especies y subespecies de *Babesia*. La PCR es útil para detectar la infección cuando la parasitemia es leve (26).

3.- *Borrelia burgdorferi*

a) Etiología y ciclo biológico

B. burgdorferi, es una espiroqueta transmitida por garrapatas del género *Ixodes*, y produce la enfermedad de Lyme tanto en humanos como en perros (30, 31). *B. burgdorferi* es transmitida principalmente por *I. ricinus*, la duración del ciclo de estas garrapatas es de hasta dos años. Las garrapatas del género *Ixodes* prefieren climas fríos y húmedos con abundante vegetación (32). También se ha documentado la transmisión por *Rhipicephalus sanguineus* (33, 34). La infección de los perros también puede ser ocasionalmente transplacentaria, por fluidos como sangre, orina o leche (30).

b) Patogenia y signos clínicos

La acción patógena de *B. burgdorferi* se debe a la multiplicación de la espiroqueta. La bacteria empieza a multiplicarse en el punto de inoculación de la garrapata, y crea una lesión redondeada y enrojecida con el centro blanquecino, desde allí migra a los linfonodos regionales y se produce una septicemia, pudiendo colonizar todos los órganos del individuo (35).

Los signos clínicos en el perro son fiebre esporádica, artritis aguda, dolor articular, cojera y glomerulopatía (30). Éstos, pueden desarrollarse entre dos y cinco meses después de la infección, y pueden persistir más de un año en perros no tratados, sobre todo, la cojera (36). Se calcula que sólo entre el 5 y el 10 % de los animales seropositivos desarrollan signos clínicos (35, 37).

2º premio

c) Diagnóstico

En perros, la serología es la única forma de evaluar la exposición a *B. burgdorferi*, históricamente han sido detectados anticuerpos mediante técnicas de ELISA, IFAT y Western Blot. Pero, mediante ELISA e IFAT no se puede discriminar si los anticuerpos son resultado de una exposición natural o por vacunación (tabla 1) (38,30).

	Uso común	Diferencias anticuerpos vacunales vs anticuerpos exposición natural	Cualitativo	Cuantitativo	Diferencias entre infección aguda vs infección crónica
Células enteras IFA o ELISA IgM and IgG		No		x	
SNAP4Dxplus® (IDEXX)	x	Si	x		
Quant C ₆	x	Si		x	
VetScan Rapaid® (Abaxis)	x	Posiblemente	x		Posiblemente
Accuplex4® (Antech)	x	Posiblemente	X		Posiblemente
Multiplex® (Cornell)	x	Posiblemente		x	Posiblemente
Adaptado (38)					

Tabla 1.- Test disponibles para *Borrelia burgdorferi*.

4.- *Anaplasma phagocytophilum*

a) Etiología y ciclo biológico

La anaplasmosis es una enfermedad zoonótica emergente transmitida por garrapatas, ampliamente distribuida. El agente etiológico de esta enfermedad es *A. phagocytophilum*, una bacteria gram-negativa que se desarrolla dentro de los granulocitos de manera estricta. La bacteria es transmitida por garrapatas del género *Ixodes* (39). Las garrapatas transmiten la bacteria entre las 24 y 48 horas después de la succión de sangre (40, 41).

b) Patogenia y signos clínicos

La bacteremia aparece en menos de 28 días, generalmente entre el cuarto y séptimo día (42). *A. phagocytophilum* se multiplica en los primeros días en las células endoteliales. Parece que estas células juegan un papel muy importante en el desarrollo y persistencia de la infección, ya que son estimuladas para expresar moléculas de superficie y citoquinas de manera que induzcan una respuesta inflamatoria (43). Posteriormente, *A. phagocytophilum* muestra un desarrollo bifásico, por una parte, las formas infectantes se unen a las células diana del hospedador y entran en los neutrófilos por endocitosis. Por otra, las células que se multiplican por fisión binaria en los

2º premio

fagosomas hasta formar mórulas. Tras la lisis celular, se inicia otra oleada de infección y se extiende a otros órganos, *A. phagocytophilum* presenta mecanismos para evitar o reducir la acción antimicrobiana del hospedador, por ejemplo, disminuyendo la adherencia endotelial, la movilidad, la trans migración, la fagocitosis y la degranulación, también pueden alterar la actividad oxidativa de los neutrófilos y retrasar la apoptosis (40, 44).

La infección por *A. phagocytophilum* alcanza rápidamente cualquier parte del organismo, provocando poliartitis que se traduce en cojera, fiebre, anemia y leucopenia que ocasiona debilidad, pérdida de peso, edemas, etc. y una linfadenopatía generalizada con esplenomegalia y hepatomegalia (39).

c) Diagnóstico

La anamnesis, los signos clínicos y los hallazgos laboratoriales son necesarios para confirmar el diagnóstico de la anaplasmosis. Las pruebas más utilizadas son test serológicos, IFAT o ELISA, pero hay que tener en cuenta que estos test se deben realizar a partir del décimo día post-infección. También se pueden realizar métodos directos como el frotis sanguíneo o métodos de diagnóstico molecular, como PCR (45).

5.- *Ehrlichia canis*

a) Etiología y ciclo biológico

La ehrlichiosis está ampliamente distribuida por todo el mundo, menos en Australia (46). Fue identificada por primera vez en Argelia en 1935, en perros que presentaban fiebre y anemia (47). *E. canis* es una bacteria gram-negativa intracelular obligatoria, típica de los miembros de la familia *Anaplasmataceae*, orden *Rickettsiales* (39). *E. canis* es transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* tanto transestadialmente como intraestadial (45, 48). Se ha demostrado experimentalmente la transmisión por *Dermacentor variabilis* (49).

b) Patogenia y signos clínicos

Las bacterias infectan células y generan un proceso inflamatorio. Signos clínicos como fiebre, depresión o letargia, anorexia, linfadenopatía generalizada, esplenomegalia, palidez de mucosas, hemorragias y anormalidades oculares son manifestaciones típicas en una infección natural por *Ehrlichia canis* (50). El periodo de incubación oscila desde los 8 a los 20 días, la enfermedad se manifiesta de tres formas, aguda, subaguda y crónica. La fase aguda tiene una duración variable de una a cuatro semanas, las demás fases pueden durar de meses hasta años (50, 51). Entre las anormalidades clínicas se puede observar una hipergammaglobulinemia y una elevación de las transaminasas (GPT y GOT) en sangre como resultados de la hepatotoxicidad (51).

2º premio

c) Diagnóstico

Existen diferentes técnicas de diagnóstico, que difieren en la especificidad, sensibilidad, precio, rapidez, etc. Las principales técnicas utilizadas son la citología, técnicas para evidenciar la presencia de anticuerpos (ELISA e IFAT), Western Blot y técnicas moleculares (PCR). También existen técnicas rápidas, los SNAP test basadas en la tecnología de los test de ELISA. El aislamiento de *E. canis* permite la aplicación de diferentes técnicas como la secuenciación del ADN (51).

Importancia de las co-infecciones

Las coinfecciones por varios patógenos son más frecuentes de lo que se piensa. Estas pueden inducir manifestaciones clínicas más graves que las infecciones simples, lo cual presenta un reto tanto para el diagnóstico como para el tratamiento (4). En la clínica veterinaria de zonas endémicas de leishmaniosis se infradiagnostican otros procesos sistémicos como babesiosis, ehrlichiosis, etc., ya que al propietario cuando le comunican el positivo a *Leishmania* no permite que sigan haciéndose más pruebas y pide que se administre el tratamiento y solucionar esa patología (1, 5).

OBJETIVOS

Conocer la seroprevalencia de las co-infecciones de agentes patógenos transmitidos por vectores (*L. infantum*, *B. canis*, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *E. canis*,) en perros (*Canis familiaris*) en el levante español.

Conocer si la co-infección altera los parámetros bioquímicos de manera significativa respecto a la infección por un único patógeno.

MATERIAL Y MÉTODOS**Características climáticas del área de estudio**

La Comunidad Valenciana presenta un clima mediterráneo, con veranos secos y calurosos e inviernos suaves. Según la clasificación de Köppen-Geiger (52) la Comunidad Valenciana presenta tres tipos de clima mediterráneo, el mediterráneo seco (Bsh-BsK), mediterráneo típico (Csa) y mediterráneo continental (Csa-BsK) (figura 3). Los perros muestreados habitaban en zonas de clima mediterráneo típico (Csa) entre la latitud de 40° 08' 27" N y 38° 50' 39" N.

2º premio

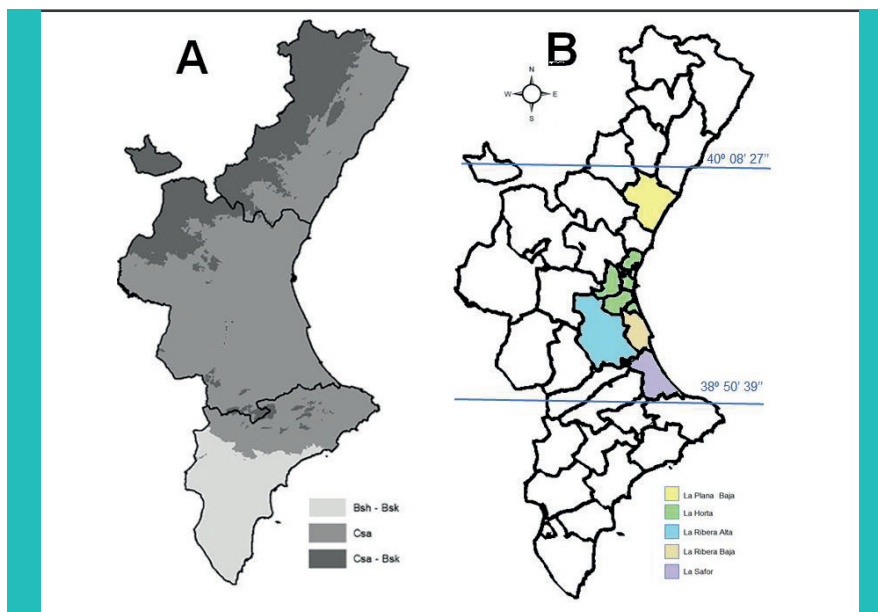


Figura 3.- A.- mapa del clima mediterráneo según la clasificación de Köppen-Geiger (52) Bsh-BsK mediterráneo seco; Csa mediterráneo típico; Csa-BsK mediterráneo continental. B. distribución geográfica de las comarcas de procedencia de los animales.

Muestras

Se obtuvieron 174 muestras de suero y plasma de perros (*Canis familiaris*), el 50 % (87/174) de los animales fueron machos y el otro 50 % fueron hembras, el rango de edad fue de entre los 10 meses hasta los 20 años. Todos los animales se les podría considerar *outdoor* (que viven o están gran parte del día en el exterior), la mayoría 97,12 % (169/174) viven en colectividades, en protectoras principalmente, y los otros cinco restantes viven en parcelas al exterior. En la provincia de Valencia, 61 animales pertenecían a la protectora VEDAMA en Oliva, 15 de la protectora SVPAP (Sociedad Valenciana de Animales y Plantas) en San Antonio de Benagéber, 16 de Alzira de varios refugios, 57 de Sueca de los cuales 37 de la protectora Can Tirolina en Sueca y 20 del Refugi Els Angels en Sueca y ocho animales de propietarios que salen con frecuencia al campo por la Sierra Calderona. En la provincia de Castellón, 17 animales en la protectora Manada Feliz de Castellón.

Todos los animales cumplían la condición de vivir en colectividad o salir con mucha frecuencia al campo. Se extraía entre 2 y 3 mL de sangre, 1 mL de sangre se colocaba en un tubo con heparina-litio y el resto se introducía en un tubo sin aditivo. Las muestras se transportaron refrigeradas a 4 °C hasta el laboratorio y se mantenían refrigeradas hasta el día siguiente. Las muestras se centrifugaban a 3500 rpm durante 10 minutos, para separar el suero y plasma. El suero se colocó en una caja de serología y el plasma se guardó en un ependorff, todas las muestras se conservaron hasta su análisis a -80 °C.

La investigación se ha llevado a cabo con la autorización del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera, el número de expediente es el CEEA 22_044.

2º premio

Pruebas laboratoriales

1.- Pruebas serológicas

Se realizaron pruebas serológicas, en concreto test de ELISA comercial, para la determinación de anticuerpos, IgG. Se seleccionaron estas pruebas por dos razones, la primera proporciona un histórico de la infección y la otra razón es de tipo funcional se puede procesar gran número de muestras en poco tiempo y con menor coste económico. Para la determinación de anticuerpos para los diferentes patógenos se utilizaron kits de test comerciales (tabla 2). En todos los test se siguieron las instrucciones del fabricante, tanto para la realización como para el cálculo de los resultados.

Patógeno	Kit y laboratorio	Sensibilidad	Especificidad
<i>Leishmania infantum</i>	LeiSscan ® Hipra (Amer, Girona, Spain)	92,5 %	100 %
<i>Babesia canis</i>	BABESIA-ELISA DOG® Afosa (Blankenfelde-Mahlow, Germany)	91,6 %	95,4%
<i>Borrelia burgdorferi</i>	VetLine Borrelia® NovaTec (Dietzenbach, Germany)	95 %	92,9 %
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	VetLine Anaplasma® NovaTec (Dietzenbach, Germany)	92 %	94,1 %
<i>Ehrlichia canis</i>	MegaELISA® EHRLICHIA canis Diagnostik MEGACOR (Hörbranz, Austria)	97 %	100 %

Tabla 2.- Relación de los kits de ELISA utilizados para los diferentes patógenos objeto de estudio con la sensibilidad y especificidad de cada uno de ellos.

2.- Pruebas bioquímicas

Para la evaluación del estado de cada animal se utilizaron biomarcadores para determinar el estado del riñón (urea, creatinina, SDMA) y del hígado (GPT, GOT, ALP, bilirrubina total) así como de un proteinograma. Debido a la imposibilidad de realizar la medición de estos parámetros en todos los animales, se decidió realizarlo en una muestra representativa de 70 animales, la mitad de los animales negativos a Leishmania y la otra mitad con anticuerpos frente a Leishmania. Y con el fin de poder comparar resultados se establecieron varios grupos (tabla 3).

2º premio

Acrónimo	Descripción del grupo
Cero	No tener anticuerpos para ningún patógeno estudiado
L1	Tener anticuerpos para <i>Leishmania</i> y no para el resto de patógenos estudiados
L2	Tener anticuerpos para <i>Leishmania</i> y otro patógeno
L345	Tener anticuerpos para <i>Leishmania</i> y dos, tres y/o cuatro patógenos más
LN1	No tener anticuerpos para <i>Leishmania</i> y si para otro patógeno
LN2	No tener anticuerpos para <i>Leishmania</i> y si para dos patógenos
LN34	No tener anticuerpos para <i>Leishmania</i> y si para tres o más patógenos

Tabla 3.- Grupos de animales según la presencia de anticuerpos y el número de patógenos

3.- Análisis estadístico

Con la finalidad de conocer la existencia de diferencias significativas entre los datos obtenidos se aplicó la prueba de χ^2 en el programa Excel del paquete de Microsoft 365. Y para la determinación de los intervalos de confianza, se realizó mediante el programa Quantitative Parasitology 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Seroprevalencias

La mayoría de los perros del presente trabajo presentan anticuerpos para uno o dos patógenos de los cinco. Las muestras con anticuerpos frente a *E. canis* son las más frecuentes con casi el 46 % (80/174; IC95% 30,7-45,6 %) junto a *B. burgdorferi* 43,68 % (76/174; IC95% 36,2-51,4 %), no existiendo diferencias significativas entre dichas proporciones (figura 4).

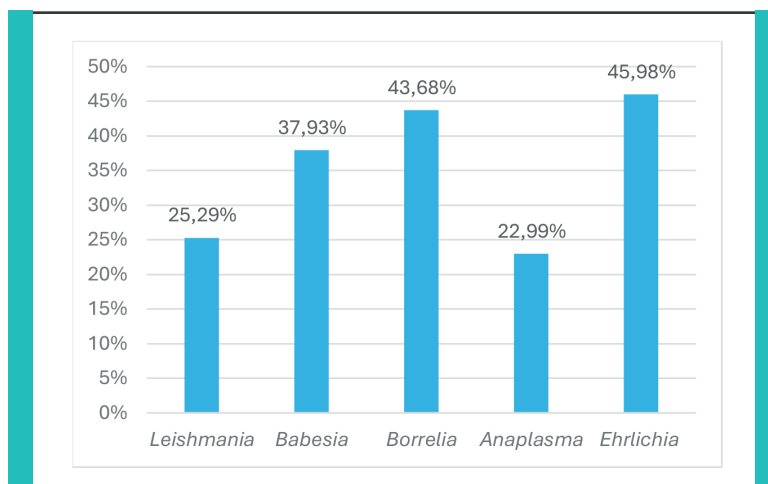


Figura 4.- Seroprevalencias obtenidas para los diferentes patógenos estudiados.

2º premio

Los animales del estudio habitaban en el área biogeográfica cinco en un clima mediterráneo típico según la clasificación de Köppen-Geiger (52) y entre la latitud 40° 08' 27" N y 38° 50' 39" N (figura 3B). Es conocido que existen pequeñas modificaciones en el clima que pueden influenciar la distribución de los patógenos o de los hospedadores intermediarios. Con el objetivo de conocer si influía la distribución geográfica, se agruparon a los animales según su origen en comarcas, estableciéndose cinco grupos según la comarca de procedencia, de norte a sur, comarca de La Plana Baja, L'Horta, La Ribera Alta, La Ribera Baja y La Safor (figura 3B).

La seroprevalencia más elevada para *Leishmania* se ha presentado en la comarca de La Ribera Alta (62,5 %; IC95%: 35,4-84,8 %), existiendo diferencias significativas con el resto de las comarcas, y la seroprevalencia más baja para este patógeno se encontró en la comarca de La Plana Alta (23,5 %; IC95%: 10,7-42,2 %) (tabla 4).

La seroprevalencia de *B. canis* más elevada se encontró en la comarca de L'Horta (62,5 %; IC95%: 40,6-81,2 %), con diferencias significativas con todas las comarcas excepto con la Ribera Alta (50,0 %; IC95%: 24,7-75,3 %). *B. burdorgferi* presentó mayor seroprevalencia en la comarca de La Safor (71,7 %; IC95%: 58,6-82,5 %) y sólo presentó diferencias significativas con las seroprevalencias de La Plana Alta y La Ribera Baja, siendo esta última la más baja (17,5 %; IC95%: 8,7-29,9 %). Las seroprevalencias de *A. phagocytophilum* no presentaron diferencias significativas entre las distintas comarcas, considerándose todas semejantes, siendo la más elevada en L'Horta (29,2 %; IC95%: 12,6-51,1%) y la más baja en La Ribera Alta (18,8 %; IC95%: 1-45,6 %). *E. canis* presentó mayor seroprevalencia en los perros de la comarca de La Ribera Baja (66,7 %; IC95%: 52,9-78,6 %) y estableciéndose diferencias significativas con las muestras de todas las comarcas excepto con La Plana Alta. La seroprevalencia más baja para *E. canis* se encontró en La Ribera Alta con ningún caso positivo (tabla 4).

	<i>Leishmania</i>	<i>Babesia</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Ehrlichia</i>
Total estudio	25,3% 44/174 19,0-32,4%	37,9% 66/174 30,7-45,6%	43,7% 76/174 36,2-51,4%	23,0% 40/174 17,0-30,0%	46,0% 80/174 38,4-53,7%
La Safor	33,3% ^{a,b} 20/60 21,7-46,7%	38,3% ^{f,g} 23/60 26,1-51,8%	71,7% ^{k,l} 43/60 58,6-82,5%	21,7% 13/60 12,1-34,2%	43,3% ^{r,s} 26/60 30,6-56,8%
La Ribera Alta	62,5% ^{a,c,d,e} 10/16 35,4-84,8%	50,0% ^h 8/16 24,7-75,3%	56,2% ^{m,n} 9/16 29,9-80,2%	18,8% 3/16 4-45,6%	0% ^{r,t,u,v} 0/16 0-20,6%
La Ribera Baja	10,5% ^{b,c} 6/57 4-21,5%	31,6% ⁱ 18/57 19,9-45,2%	17,5% ^{k,m,p} 10/57 8,7-29,9%	26,3% 15/57 15,5-39,7%	66,7% ^{s,t,x} 38/57 52,9-78,6%
L'Horta	20,8% ^d 5/24 7,1-42,2%	62,5% ^{f,i,j} 15/24 40,6-81,2%	35,3% ^{p,q} 13/24 19,7-53,5%	29,2% 7/24 12,6-51,1%	33,3% ^{u,x} 8/24 15,6%
La Plana Alta	23,5% ^e 3/17 10,7-41,2%	47,1% ^{g,h,j} 3/17 29,8-64,9%	35,3% ^{l,n,q} 2/17 19,7-53,5%	20,6% 1/17 8,7-37,9%	38,2% ^v 8/17 22,2-56,4%
a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,p,q,r,s,t,u,v,x relación de diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)					

Tabla 4.- Resultados de las seroprevalencias de los patógenos estudiados según grupo de edad (% , n/N, IC95%).

2º premio

La leishmaniosis en la región mediterránea, en España se considera endémica y las prevalencias oscilan entre el 3,7 % y el 46,6 %, siendo las más elevadas en el sur y en el este de la Península Ibérica (6, 53). Concretamente en la Comunidad Valenciana en el 17,11 % (53) bastante inferior que en el presente trabajo que se cifra en el 25,29 % (IC95%: 19,0-32,4 %). Aunque en ambos trabajos se ha realizado serología, en este estudio se ha realizado test de ELISA mientras que en el trabajo de Montoya-Alonso et al. (2020) se realizó test rápidos de inmunocromatografía.

Las piroplasmosis se consideran enfermedades endémicas del área mediterránea por la presencia de garrapatas. En este estudio se ha obtenido una prevalencia relativamente elevada (37,9 %; IC95%: 30,7-45,6 %) para *B. canis* comparada con otro trabajo del área mediterránea. En Argelia se obtuvo una seroprevalencia en perros del 17,98 % (34/198), mediante IFAT, a diferencia del presente trabajo que se utilizó test de ELISA (54). En el centro y norte de Italia la seroprevalencia obtenida fue del 34 % utilizando test de inmunofluorescencia siendo semejante a la del presente estudio (55). En Rumania la seroprevalencia obtenida en perros de áreas rurales es semejante al presente estudio, un 28,4 % (19/67) frente al 15,4 % (20/130) de zonas urbanas (56). En este estudio se pone en evidencia la importancia del ambiente rural u outdoor como riesgo para la babesiosis, y podría explicar el porque en nuestro trabajo la prevalencia es más elevada, ya que todos los animales son de colectividad y outdoor, además que el clima de la Comunidad Valenciana es mucho más favorable para la supervivencia de las garrapatas.

La seroprevalencia para *B. burgdorferi* encontrada (43,7 %; IC95%: 36,2-51,4 %) es más alta que la que han presentado otros trabajos en España, posiblemente debido a la técnica utilizada, inmunocromatografía o IFI, y el área de muestreo, que se ha centrado en el norte de España. De hecho, en la provincia de León la seroprevalencia con pruebas IFI se cifra en un 2,10 % (2/95) (57). Y en la provincia de Soria la prevalencia de *B. burgdorferi* es del 21,9 % (32/146) (58). En el norte de España (Galicia, Asturias, Cantabria, País Vasco, Navarra, Aragón y Cataluña), la prevalencia con test rápidos basados en técnicas de inmunocromatografía se establece en un 0,72 % (4/556) (33). En el noroeste de España, en la provincia de Ourense y Pontevedra, la seroprevalencia obtenida mediante IFAT fue del 6,9 % (45/649). En este trabajo se establecieron dos grupos de perros, los de un estilo de vida urbano y los de protectoras o colectividades, este segundo grupo la prevalencia fue más elevada, 8,8 % (45/649) frente al 6,26 % (30/479) del primer grupo (59). Este último trabajo podría explicar la causa de que en el presente estudio la seroprevalencia para *Borrelia* es más elevada que en otros trabajos, ya que todos los perros del estudio son de estilo de vida de exterior. No se debe olvidar que la Comunidad Valenciana presenta mejores condiciones climáticas para el hospedador intermediario, y la técnica de diagnóstico son test ELISA. Algunos trabajos consideran que los test de ELISA son más sensibles y específicos que los IFI o IFAT (60, 61).

La anaplasmosis se considera también enfermedad endémica en la región mediterránea. En el presente trabajo la prevalencia es más elevada (23 %; IC95%: 17,0-30,0 %) que en otros estudios similares en España que es del 5,06 % y en la Comunidad Valenciana en el 6,95 % (53), en esta diferencia posiblemente influyan tres factores; por una parte, la técnica realizada, en el presente trabajo es un test de ELISA, mientras que en la investigación de Montoya-Alonso et al. (2020) es un test rápido de inmunocromatografía. Por otra parte, la procedencia de los animales se podrían

2º premio

considerar de colectividad, mientras que en el trabajo referenciado son animales que acuden a los hospitales clínicos veterinarios y no se indica el hábitat de los mismos. Y la tercera causa, podría ser el aumento de la población de garrapatas que se ha evidenciado en los últimos años.

La ehrlichiosis también se puede considerar una enfermedad endémica en la Península Ibérica, relacionada con la infestación por garrapatas. En el presente trabajo la seroprevalencia es superior a la reportada por Montoya-Alonso et al. (2020) en la Comunidad Valenciana (46 %; IC95%: 38,4-53,7 % y 9,09 %, respectivamente). Las causas de estas diferencias podrían ser las mismas que se han mencionado en relación a la anaplasmosis. *Ehrlichia* presenta la prevalencia más alta en este trabajo y entre los patógenos transmitidos por garrapatas, este podría deberse a que su vector más importante, *Rhipicephalus sanguineus*, está más extendido y aclimatado al clima mediterráneo que otros vectores como *Demacentor* e *Ixodes*, (3, 26).

El 1,15 % (2/174; IC95%: 0,1-4,1 %) presentó anticuerpos frente a todos los patógenos estudiados en el presente trabajo. En el 17,24 % de los animales (30/174; IC95%: 11,9-23,7 %) no se han encontrado anticuerpos frente ninguno de los cinco patógenos estudiados (figura 5 y tabla 5). El 82,7 % (144/174; IC95%: 76,3-88,1 %) presentaban algún tipo de co-infecciones. Las co-infecciones de otros trabajos son inferiores, seguramente porque incluyen menos patógenos en el estudio y por las técnicas de diagnóstico (test rápidos) por ejemplo, en un estudio en España para cuatro patógenos (*Leishmania*, *Dirofilaria immitis*, *Anaplasma* y *Ehrlichia*) la seroprevalencia de co-infección es del 15 % (53). En Chipre para perros urbanos-mascota se halló una seroprevalencia del 12 % (6/50) para la co-infección *Leishmania* y *Ehrlichia* (62), En Brasil, zona endémica de leishmaniosis, el 6,7 % (6/96) presentaban anticuerpos frente a *Leishmania*+*Ehrlichia* y el 9,3 % (9/96) para *Babesia*+*Ehrlichia*, y no se encontró ningún caso positivo a *Leishmania*+*Babesia*+*Ehrlichia* al mismo tiempo (5). Este resultado es diferente al que se ha encontrado en el presente trabajo que tres perros mostraron anticuerpos para los tres patógenos.

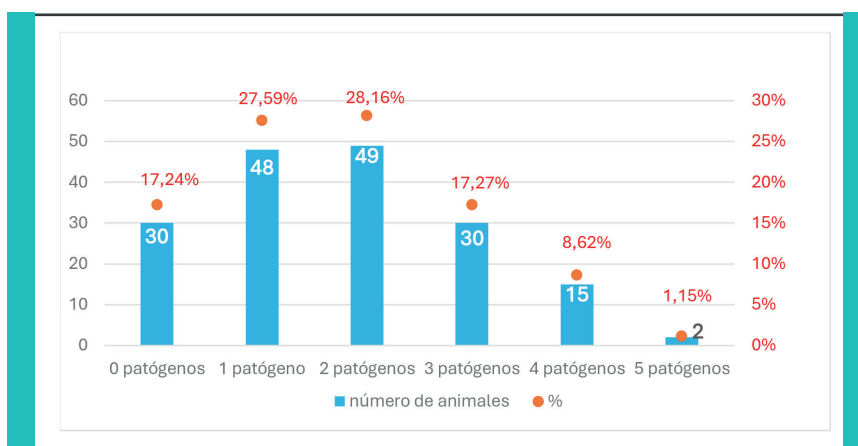


Figura 5.- Valores absolutos y relativos de las coinfecciones.

2º premio

	<i>Leishmania</i>	<i>Babesia canis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
	25,28% 44/174	14,36% 25/174	14,36 % 25/174	6,89 % 12/174	9,77 % 17/174
<i>Leishmania</i>		37,93 % 66/174	19,54 % 34/174	12,06% 21/174	18,39 % 32/174
<i>Babesia canis</i>			43,67 % 76/174	13,79 % 24/174	10,91 % 19/174
<i>Borrelia burgdorferi</i>				22,98 % 40/174	10,34 % 18/174
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>					45,97 % 80/174
<i>Ehrlichia canis</i>					

Tabla 5.- Prevalencia de co-infecciones de los patógenos objeto de estudio (en negrita) y la prevalencia de infecciones simples

Las seroprevalencias obtenidas entre machos y hembras para cada patógeno estudiado no mostraron diferencias significativas, no siendo el sexo un factor que pudiera influenciar en los resultados (tabla 6). Resultados semejantes a los obtenidos por otros grupos de investigadores, que no encontraron diferencias significativas entre las prevalencias en animales de diferente sexo (1, 62).

	<i>Leishmania</i>	<i>Babesia</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Ehrlichia</i>
♀	28,74% 25/87 19,5-39,4%	34,48% 30/87 24,6-45,4%	42,53% 37/87 32,0-53,6%	26,44% 23/87 17,6%-37,0%	42,53% 37/87 32,6-53,6%
♂	21,84% 19/87 13,7-32,0%	41,38% 36/87 30,9-52,4%	44,83% 39/87 34,1-55,9%	19,54% 17/87 11,8-29,4%	49,43% 43/87 38,5-60,4%

Tabla 6.- Resultados de las seroprevalencias de los patógenos estudiados según el sexo (% , n/N, IC95%).

Con el fin de valorar si la edad pudiera influir en los resultados se establecieron tres grupos de edad, animales de menos de dos años, animales entre los dos y ocho años, y animales de más de ocho años. Las seroprevalencias entre los distintos grupos de edad para cada patógeno son semejantes, de hecho, solo se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la seroprevalencia para *Leishmania* entre los animales de menos de dos años y los de más de ocho años, es decir entre los jóvenes y los seniors (tabla 7). Estos resultados son semejantes a otros estudios donde se estudiaba la edad como un factor de riesgo (62). La media de número de patógenos por edad es menor en los animales más jóvenes, 1,5 patógenos por animal, mientras que en los adultos y seniors fue de 1,85 y 1,83, respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ellos.

	<i>Leishmania</i>	<i>Babesia</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Ehrlichia</i>
< 2 años	14,29% ^a 6/42 5,4-28,5%	28,57% 12/42 15,7-44,6%	50,00% 21/42 34,2-65,8%	14,29% 6/42 5,4-28,5%	42,86% 18/42 27,7-59,0%
2-<8 años	22,78% 18/79 14,4-33,6%	37,97% 30/79 27,3-49,6%	46,84% 37/79 35,5-58,4%	30,38% 24/79 20,5-41,8%	46,84% 37/79 35,5-58,4%
>8 años	37,74% ^a 20/53 24,8-52,1%	45,28% 24/53 31,6-59,6%	33,96% 18/53 21,5-48,3%	18,87% 10/53 9,4-32,0%	47,17% 25/53 33,3-61,4%

^a Existen diferencias significativas entre estos dos grupos

Tabla 7.- Resultados de las seroprevalencias de los patógenos estudiados según grupo de edad (% , n/N, IC95%).

2º premio

Parámetros bioquímicos

El proteinograma parece ser que se altera con mayor facilidad cuando los animales presentan alguna de las infecciones objeto de estudio (tabla 8).

Como se ha mencionado en el apartado de material y métodos, son animales aparentemente sanos, pero a pesar de ello se pueden observar valores de los parámetros bioquímicos fuera de rango y diferencias entre los distintos grupos. Los animales que tienen mayor número de infecciones presentan mayores alteraciones del proteinograma. Las alteraciones son mayores en los grupos de animales que tienen dos o más patógenos que en el grupo que no presenta infección, presentando diferencias significativas. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los distintos grupos de animales en marcadores de daño renal y hepático.

Se han evidenciado diferencias significativas entre el número de parámetros alterados del proteinograma en el grupo de animales con anticuerpos para Leishmania, más tres, cuatro y/o cinco patógenos (L345) con el resto de los grupos (tabla 8).

Cuando se observa la media y los rangos de los valores de los marcadores estudiados para daño renal y daño hepático se evidencia que el grupo que tiene anticuerpos frente a Leishmania más otros patógenos (L345) presenta más valores fuera de rango. El grupo que sólo tiene anticuerpos frente a un patógeno y que no es Leishmania (LN1) presenta también muchos valores fuera de rango. Pero, esto se debe a que dos animales tienen valores muy alterados, y a que este grupo son pocos animales y no ha sido posible compensar estos valores tan elevados (tabla 9). Los valores de GOT están en rango en todos los grupos y no muestran diferencia significativas.

	Marcadores de daño renal		Marcadores de daño hepático ^A	Proteinograma alterado % n/N	Núm. parámetros proteinograma alterados Media Rango
	SDMA % n/N	Urea y/o creatinina % n/N			
cero	12,50 % 1/8	12,50 % 1/8	35,50% 3/8	37,50% 3/8	1,33 1-2
L1	25,0 % 1/4	0,00% 0/4	25,0% 1/4	50,00% 2/4	2,5 2-3
L2	7,14% 1/14	0,00% 0/14	28,57% 4/14	85,71% 12/14	2,5 1-6
L345	5,88% 1/17	11,76% 2/17	17,65% 3/17	100,00% 17/17	3,5 2-5
LN1	22,22% 2/9	11,11% 1/9	33,33% 3/9	66,67% 6/9	2 1-3
LN2	0,00% 0/9	11,11% 1/9	44,44% 4/9	88,89 8/9	1,75 1-3
LN34	22,22% 2/9	11,11% 1/9	22,22% 2/9	100,00% 9/9	2 1-4

Cero: animales seronegativos para todos los patógenos; L1: animales con anticuerpos para Leishmania y no para el resto de los agentes patógenos; L2: grupo de animales con anticuerpos para Leishmania y otro patógeno objeto de estudio; L345: grupo de animales con anticuerpos contra Leishmania y con más de dos patógenos objeto del estudio; LN1: grupo de animales negativo a Leishmania y con anticuerpos contra un patógeno; LN2: Grupo de animales negativo a Leishmania y con anticuerpos contra dos patógenos objeto del estudio. LN34: grupo de animales negativo a Leishmania y con más de dos tipos de anticuerpos contra patógenos objeto del estudio.

^A Marcadores de daño Hepático (GPT, GOT, ALP, bilirrubina total)

Tabla 8.- Frecuencia de anomalías en la bioquímica.

2º premio

Como se ha mencionado anteriormente, el proteinograma aparece más alterado cuantos más patógenos estén involucrados, existiendo muchas diferencias significativas entre los grupos estudiados y los parámetros del proteinograma (tabla 10). El grupo L345 es el que más diferencias significativas expone con el resto de los grupos y en todos los parámetros los valores están fuera de rango excepto en la α -2 globulina.

Grupos	cero	L1	L2	L345	LN1	LN2	LN34	
	Valores referencia	$\bar{X}$ Rango	$\bar{X}$ Rango	$\bar{X}$ Rango	$\bar{X}$ Rango	$\bar{X}$ Rango	$\bar{X}$ Rango	
SDMA	0-13	10,1 7,7-12,6	10,4 7,2-13,5	8,4 5,1-11,7	10,2 4,05-16,3	13,6 4,2-23,0	8,8 6,8-10,9	11,3 9,1-13,5
creatinina	0,6-1,4	1,07 0,91-1,21	1,11 0,96-1,25	1,03 0,79-1,27	1,05 0,68-1,42	1,63 0,34-2,91	1,05 0,77-1,33	1,08 0,87-1,30
urea	17-58	40,3 13,8-66,9	33,8 21,8-45,6	35,1 23,8-46,5	43,4 10,4-76,5	54,78 4,7-114,3	36,4 28,2-44,7	29,7 20,8-38,5
bilirrubina total	0-0,3	0,25 0,06-0,44	0,22 0,11-0,33	0,15 0,12-0,19	0,14 0,07-0,21	0,43 0,21-0,92	0,4 0,12-0,92	0,21 0,08-0,34
ALP	0-135	67,1 6,1-128,1	39,5 28,4-50,7	61,1 10,7-132,8	46,8 9,7-83,9	39,9 0,8-79,0	64,7 26,7-102,8	38,8 4,5-73,1
GPT	13-88	80,75 17,0-144,4	69 10,9-127,0	40,9 17,5-64,4	25,2 17,4-33,1	32,9 22,3-43,4	73,7 27,3-174,6	28,3 18,8-37,9

$\bar{X}$: promedio; R Rango: en rojo los límites fuera de los rangos normales

Tabla 9.- Resultados de marcadores de daño renal y hepático según grupo de animales.

grupos	cero	L1	L2	L345	LN1	LN2	LN34	
	Valores referencia	$\bar{X}$ Rango	$\bar{X}$ Rango	$\bar{X}$ Rango	$\bar{X}$ Rango	$\bar{X}$ Rango	$\bar{X}$ Rango	
albumina	2,9-3,9	3,17 2,76-3,57	3,46 3,10-3,81	3,23 2,60-3,87	3,12 2,28-3,96	3,52 3,24-3,80	3,52 3,34-3,70	3,15 2,85-3,46
α 1 globulina	0,2-0,4	0,36 0,32-0,41	0,4 0,35-0,45	0,42 0,32-0,52	0,49 0,27-0,72	0,39 0,33-0,45	0,41 0,34-0,48	0,34 0,24-0,45
α 2 globulina	0,6-1,2	0,8 0,60-0,99	0,72 0,45-0,98	0,90 ^a 0,64-1,15	0,82 ^b 0,68-0,96	0,67 0,38-0,96	0,81 0,64-0,98	0,69 ^{a,b} 0,62-0,77
β globulina	0,8-1,3	1,14 ^c 0,83-1,45	1,09 0,81-1,36	1,33 ^d 0,96-1,70	1,99 ^{c,d} 1,08-2,90	1,38 0,77-1,99	1,47 1,00-1,94	1,58 1,00-2,15
γ globulina	0,4-1	0,61 ^{e,f} 0,36-0,85	0,77 ^g 0,62-0,92	0,96 ^h 0,47-1,45	1,53 ^{a,h,i,j} 0,66-2,40	0,82 ⁱ 0,51-1,13	0,86 ^j 0,61-1,10	1,00 ^{f,g} 0,83-1,18
A/G	0,8-1,6	1,19 0,71-1,67	1,22 ^{k,l} 0,88-1,56	0,94 ^m 0,63-1,26	0,71 ^{k,m,n,p} 0,40-1,03	1,11 ⁿ 0,81-1,42	1,01 ^p 0,82-1,20	0,90 ^l 0,71-1,09

$\bar{X}$: promedio; R Rango, a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,p diferencias significativas (p<0.05)

Tabla 10.- Valores de los parámetros del proteinograma por grupo de animales.

Las alteraciones del proteinograma, como la hiperglobulinemia policlonal, la hipoalbuminemia y la disminución de la ratio A/G están asociados a la progresión de la enfermedad (63, 64, 65). En los grupos de dos patógenos o más se observa hiperglobulinemia policlonal y disminución de la ratio A/G, se podría deducir que en estos animales son más evidentes las alteraciones.

2º premio

La hipoalbuminemia se puede deber a un déficit en la ingesta de alimento, a una disminución de la producción por síntesis hepática insuficiente, a una pérdida de proteínas por enteropatía perdedora de proteínas, por ejemplo. Y de manera menos frecuente, por un secuestro de albumina por peritonitis o por aumento del catabolismo. Las α -1-2 globulinas se elevan por respuestas de fase aguda en caso de lesión tisular, neoplasia, inflamación aguda e infección o a consecuencia de un síndrome nefrótico. Las β -globulinas aumentadas representan una inflamación más crónica que en los casos de hiperalfaglobulinemia, enfermedad hepática activa o síndrome nefrótico de nuevo. Las γ -globulinas aumentadas en la mayoría de los casos es debido a una gammapatía policlonal como respuestas a procesos infecciosos o inmunomediados, pero en ocasiones, se debe a gammapatía monoclonal normalmente causada por neoplasias de linfocitos B o células plasmáticas (66).

También es importante evaluar la gráfica del proteinograma (figura 6). La gráfica A corresponde a un animal sano, sin alteraciones bioquímicas y negativo a enfermedades. En la gráfica B se observa un aumento de las β -y γ globulinas que puede deberse a un proceso infeccioso activo, este animal resultó positivo a cuatro patógenos. La gráfica C pertenece a un perro con valores renales muy alterados y presenta una hipoalbuminemia severa y aumento de las fracciones α y β globulinas compatibles con un síndrome nefrótico, gammapatía policlonal por proceso infeccioso activo y una ratio A/G disminuida que es signo de mal pronóstico.

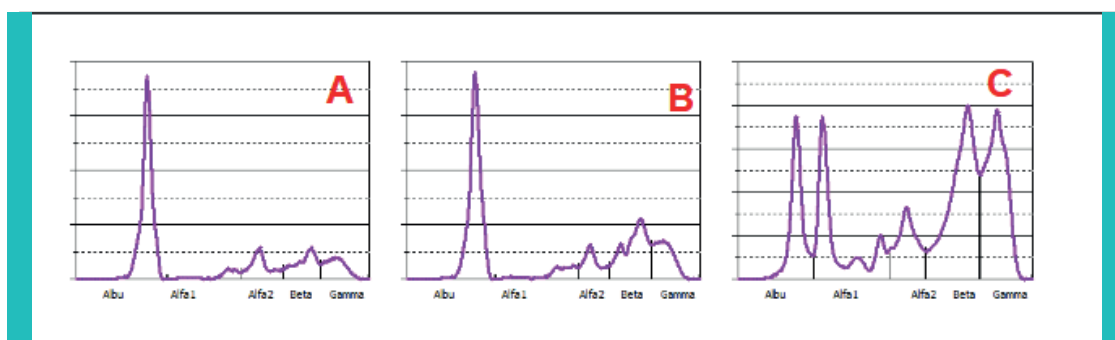


Figura 6.- Electroforesis capilar de proteínas séricas. A: perteneciente a un animal del grupo cero; B: perteneciente a un animal del grupo LN34; C: perteneciente al grupo L345.

CONCLUSIONES

Las co-infecciones son muy elevadas en perros que habitan en el este de la Península Ibérica, habiéndose encontrado co-infección a los cinco patógenos muy baja.

El proteinograma es el marcador que se afecta con más frecuencia, siendo mayor en función del número de patógenos el mismo animal, seguido de los valores renales y hepáticos.

2º premio

BIBLIOGRAFÍA

1. CAZAN CD, IONICĂ AM, MATEI IA, D'AMICO G, MUÑOZ C, BERRIATUA E, Y DUMITRACHE, M. O., *Detection of Leishmania infantum DNA and antibodies against Anaplasma spp., Borrelia burgdorferi s.l. and Ehrlichia canis in a dog kennel in South-Central Romania*, Acta Vet. Scand.2020; 62(1), 42. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13028-020-00540-4>
2. DAY MJ, *One health: the importance of companion animal vector-borne diseases*, Parasites & vectors. 2011a; 4, 49. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-49>
3. DAY MJ. *The immunopathology of canine vector-borne diseases*, Parasites & vectors.2011b; 4, 48. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-48>.
4. OTRANTO D, DANTAS-TORRES F, BREITSCHWERDT EB, *Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one*, Trends Parasitol. 2009; 25(4), pp. 157–163.
5. KRAWCZAK FDAS, REIS IA, SILVEIRA JA, AVELAR DM, MARCELINO AP, WERNECK GL, LABRUNA MB, PAZ GF, *Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods?*, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2015; 48(1), pp. 64–68.
6. GÁLVEZ R, MONTOYA A, CRUZ I, FERNÁNDEZ C, MARTÍN O, CHECA R, CHICHARRO C, MIGUELÁÑEZ S, MARINO V, MIRÓ G, *Latest trends in Leishmania infantum infection in dogs in Spain, Part I: mapped seroprevalence and sand fly distributions*, Parasites & vectors. 2020; 13(1), 204. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04081-7>
7. SOLANO-GALLEGO L, VILLANUEVA-SAZ S, CARBONELL M, TROTTA M, FURLANELLO T, NATALE A, *Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT*, Parasites & vectors. 2014; 7, 111. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-111>
8. HERNÁNDEZ L, *Estudio de la infección por Leishmania infantum en el perro: utilidad de las técnicas diagnósticas no invasivas y nuevas alternativas terapéuticas*, Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria, 2016; Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/38385/>
9. FOURIE JJ, EVANS A, LABUSCHAGNE M, CRAFFORD D, MADDER M, POLLMEIER M, SCHUNACK B, *Transmission of Anaplasma phagocytophilum (Foggie, 1949) by Ixodes ricinus (Linnaeus, 1758) ticks feeding on dogs and artificial membranes*, Parasites & vectors. 2019; 12(1), 136. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3396-9>
10. SHORT E E, CAMINADE C, THOMAS BN, *Climate Change Contribution to the Emergence or Re-Emergence of Parasitic Diseases*, Emerg. Infect. Dis. 2017; 10, 1178633617732296. <https://doi.org/10.1177/1178633617732296>

2º premio

11. SOLANO-GALLEGO L, MIRÓ G, KOUTINAS A, CARDOSO L, PENNISI MG, FERRER L, BOURDEAU P, OLIVA G, BANETH G, *The LeishVet Group, LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis*, Parasites & vectors. 2011; 4, 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
12. ARMUA-FERNÁNDEZ MT, VENZL JM, *Leishmaniosis: brief update*, Veterinaria (montev.). 2019; 55(211) pp. 29-36
13. QUINNELL RJ, KENNEDY LJ, BARNES A, COURTENAY O, DYE C, GARCEZ LM, SHAW MA, CARTER SD, THOMSON W, OLLIER WE, *Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism*, Immunogenetics, 2003; 55, pp. 23-28.
14. SARIDOMICHELAKIS MN, *Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications*, Vet. Dermatol, 2009; 20, pp.471-489
15. ALVAR J, CAÑAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J, *Canine leishmaniasis*, Adv. Parasitol. , 2004; 57, pp. 1-88.
16. MHADHBI M, CHAABOUNI A, BOUABID C, SASSI A, *Relationships between specific antibody responses and clinical signs of dogs living in Tunisian endemic areas of canine leishmaniasis caused by Leishmania infantum*, Acta Trop. 2021; 218. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105906>
17. BANETH G, SOLANO-GALLEGO L, *Leishmaniasis*, Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract. , 2022; 52(6), pp. 1359-1375.
18. PALTRINIERI S, GRADONI L, ROURA X, ZATELLI A, ZINI E, *Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis*, Vet. Clin. Pathol. 2016; 45(4), pp. 552-578.
19. ANDREADOU M, LIANDRIS E, GAZOULI M, TAKA S, ANTONIOU M, THEODOROPOULOS G, TACHTSIDIS I, GOUTAS N, VLACHODIMITROPOULOS D, KASAMPALIDIS I, IKONOMOPOULOS J, *A novel non-amplification assay for the detection of Leishmania spp. in clinical samples using gold nanoparticles*, J. Microbiol. Methods. 2014; 96, pp. 56-61.
20. KER HG, COURA-VITAL W, AGUIAR-SOARES RD, ROATT BM, DAS DORES MOREIRA N, CARNEIRO CM, MACHADO EM, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, GIUNCHETTI RC, ARAÚJO MS, COELHO EA, DA SILVEIRA-LEMOES D, REIS AB, *Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis*. Clin. Vaccine Immunol. 2013; 20(12), pp1792-1798. doi: 10.1128/CVI.00575-13.
21. SOUSA S, CARDOSO L, REED SG, REIS AB, MARTINS-FILHO OA, SILVESTRE R, DA SILVA AC. *Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry*, Plos Neglect. Trop. Dis. 2013; 7(8): e2371. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002371>

2º premio

22. MAIA C, CAMPINO L, *Biomarkers Associated with Leishmania infantum Exposure, Infection, and Disease in Dogs*, Front. cell. infect. microbiol. 2018; 8, 302. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00302>
23. CARDELLS J, GARIJO MM, *Nuevos aspectos sobre la babesiosis canina*, Consulta difusión veterinaria, 2016; 230 (24). pp.37-41.
24. SCHNITTGER L, RODRIGUEZ AE, FLORIN-CHRISTENSEN M, MORRISON DA, *Babesia: a world emerging, Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in Emerg. Infect. Dis.* 2012; 12(8), pp. 1788–1809.
25. KARASOVÁ M, TÓTHOVÁ C, GRELOVÁ S, FIALKOVIČOVÁ M, *The Etiology, Incidence, Pathogenesis, Diagnostics, and Treatment of Canine Babesiosis Caused by Babesia gibsoni Infection*, Animals 2022;12(6), 739. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ani12060739>
26. SOLANO-GALLEGU L, SAINZ Á, ROURA X, ESTRADA-PEÑA A, MIRÓ G, *A review of canine babesiosis: the European perspective*, Parasites & vectors. 2016; 9(1), 336. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1596-0>
27. TAYLOR MA, COOP RL, WALL RL, *Veterinary Parasitology*. 3d edition Oxford, UK, Blackwell Publishing; 2007.
28. CAMACHO-GARCÍA AT, *Piroplasma infection in dogs in northern Spain*, Vet. Parasitol. 2006; 138(1-2), pp. 97–102.
29. KONISHI K, SAKATA Y, MIYAZAKI N, JIA H, GOO YK, XUAN X, INOKUMA H, *Epidemiological survey of Babesia gibsoni infection in dogs in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay using B. gibsoni thrombospondin-related adhesive protein antigen*. Vet. Parasitol. 2008: 155(3-4), pp. 204–208.
30. LITTMAN MP, GOLDSTEIN RE, LABATO MA, LAPPIN MR, MOORE GE, *ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention*, J. Vet. Intern. Med. 2006; 20(2), pp. 422–434.
31. STEERE AC, *Lyme disease*, N. Engl. J. Med. 2001; 345(2), pp. 115–125.
32. VOYIATZAKI C, PAPAILIA SI, VENETIKOU MS, POURIS J, TSOUMANI ME, PAPAGEORGIOU EG, *Climate Changes Exacerbate the Spread of Ixodes ricinus and the Occurrence of Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis in Europe-How Climate Models Are Used as a Risk Assessment Approach for Tick-Borne Diseases*, Int. J. Environ. Res. Public Health. 2022; 19(11), 6516. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijerph19116516>

2º premio

33. DÍAZ-REGAÑÓN D, ROURA X, SUÁREZ ML, LEÓN M, SAINZ Á, *Serological evaluation of selected vector-borne pathogens in owned dogs from northern Spain based on a multicenter study using a commercial test*. Parasit & Vectors. 2020; Jun 10;13(1):301. doi: 10.1186/s13071-020-04172-5. PMID: 32522246; PMCID: PMC7288488.
34. TINOCO-GRACIA L, QUIROZ-ROMERO H, QUINTERO MT, RENTERIA-EVANGELISTA TB, BARRERAS-SERRANO A, HORI-OSHIMA S, TAMAYO A, RICO-DIEZ O, MORO M, VINASCO J, *Seroprevalence of Borrelia burgdorferi in dogs from a Mexico-U.S. border desert region: pilot study*, J. Anim. Vet. Adv. 2007; 6, pp. 787-789.
35. CHOMEL B, *Lyme disease*, Rev. Sci. Tech. (OIE). 2015; 34(2), pp. 569–576.
36. APPEL MJ, ALLAN S, JACOBSON RH, LAUDERDALE TL, CHANG YF, SHIN SJ, THOMFORD JW, TODHUNTER RJ, SUMMERS BA, *Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection*, The Journal of Emerg. Infect. Dis. 1993; 167(3), pp. 651–664.
37. LEVY SA, MAGNARELLI LA, *Relationship between development of antibodies to Borrelia burgdorferi in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis*, J. Am. Vet. Med. Assoc. 1992; 200(3), pp. 344–347.
38. LITTMAN MP, GERBER B, GOLDSTEIN RE, LABATO MA, LAPPIN MR, MOORE GE, *ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats*, J. Vet. Intern. Med. 2018; 32(3), pp. 887–903.
39. CARRADE DD, FOLEY JE, BORJESSON DL, SYKES JE, *Canine granulocytic anaplasmosis: a review*, J. Vet. Intern. Med. 2009; 23(6), pp. 1129–1141.
40. EL HAMIANI KHATAT S, DAMINET S, DUCHATEAU L, ELHACHIMI L, KACHANI M, SAHIBI H, *Epidemiological and Clinicopathological Features of Anaplasma phagocytophilum Infection in Dogs: A Systematic Review*, Front. vet. sci. 2021; 8, 686644. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.686644>
41. FOUQUE F, REEDER JC, *Impact of past and on-going changes on climate and weather on vector-borne diseases transmission: a look at the evidence*, Infect. Dis. Poverty. 2019; 8(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0565-1>
42. WOLDEHIWET Z, *The natural history of Anaplasma phagocytophilum*, Vet. Parasitol. 2010; 167(2-4), pp. 108–122.
43. LAI TH, KUMAGAI Y, HYODO M, HAYAKAWA Y, RIKIHISA Y, *The Anaplasma phagocytophilum PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic Di-GMP in host cell infection*, J. Bacteriol. 2009; 191(3), pp. 693–700.

2º premio

44. WANG J, DYACHENKO V, MUNDERLOH UG, STRAUBINGER RK, *Transmission of Anaplasma phagocytophilum from endothelial cells to peripheral granulocytes in vitro under shear flow conditions*, Med. Microbiol. Immunol., 2015; 204(5), pp. 593–603.
45. SAINZ Á, ROURA X, MIRÓ G, ESTRADA-PEÑA A, KOHN B, HARRUS S, SOLANO-GALLEGU L, *Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe*, Parasites & vectors. 2015; 8, 75. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
46. ZYKES JE, EHRLICHIOSIS EN: SYKES, J.E. 2014, *Canine and Feline*, Emerg. Infect. Dis. 2014, St. Louis, Elsevier /saunders, pp. 278-289.
47. DONATIEN A, LESTOQUARD F, *Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien 1935*; En: Sainz Á, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L, *Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe*, Parasites & vectors. 2015; 8, 75. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
48. BREMER WG, SCHAEFER JJ, WAGNER ER, EWING SA, RIKIHISA Y, NEEDHAM GR, JITTAPALAPONG S, MOORE DL, STICH RW, *Transstadial and intrastadial experimental transmission of Ehrlichia canis by male Rhipicephalus sanguineus*, Vet. Parasitol. 2005; 131(1-2), pp. 95–105.
49. JOHNSON EM, EWING SA, BARKER RW, FOX JC, CROW DW, KOCAN KM, *Experimental transmission of Ehrlichia canis (Rickettsiales: Ehrlichieae) by Dermacentor variabilis (Acari: Ixodidae)*, Vet. Parasitol. 1998; 74(2-4), pp. 277–288.
50. MYLONAKIS ME, HARRUS S, BREITSCHWERDT EB, *An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis)*. Vet. J.2019; 246, pp. 45–53.
51. SALAZAR H, BURITICA EF, *Infección por Ehrlichia canis: patogenia, diagnóstico y recomendaciones terapéuticas*, RECIA, 2011; 4(1) pp.103-106.
52. KOTTEK M, GRIESER J, BECK C, RUDOLF B, RUBEL F, *World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated*, Meteorol. 2006; 15(3), pp. 259–263.
53. MONTOYA-ALONSO JA, MORCHÓN R, COSTA-RODRÍGUEZ N, MATOS JI, FALCÓN-CORDÓN Y, CARRETÓN E, *Current Distribution of Selected Vector-Borne Diseases in Dogs in Spain*, Front. vet. sci. 2020; 7, 564429. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.564429>
54. KIOUANI A, AZZAG N, TENNAH S, GHALMI F, *Infection with Babesia canis in dogs in the Algiers region: Parasitological and serological study*, Vet. World. 2020; 13(7), pp.1351–1357.
55. CASSINI R, ZANUTTO S, FRANGIPANE DI REGALBONO A, GABRIELLI S, CALDERINI P, MORETTI A, TAMPIERI MP, PIETROBELLI M, *Canine piroplasmiasis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts*, Vet. Parasitol. 2009; 165(1-2), pp. 30–35.

2º premio

56. IMRE M, FARKAS R, ILIE M, IMRE K, HOTEA I, MORARIU S, MORAR D, DĂRĂBUȘ G, , *Seroprevalence of Babesia canis infection in clinically healthy dogs from western Romania*, J. Parasitol. 2013; 99(1), pp.161–163.
57. ROJO-VÁZQUEZ J, *Seroprevalencia de la infección por Borrelia burgdorferi y Rickettsia conorii en población humana y canina de La Zona Básica de Salud de San Andrés del Rabanedo (Leon, España)*, Rev. Esp. Salud Pública, 1997; 71(2), pp.173–180.
58. MERINO FJ, SERRANO JL, SAZ JV, NEBRED A T, GEGUNDEZ M, BELTRAN M, *Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria (Spain)*, Eur. J. Epidemiol. 2000; 16(2), pp. 97–100.
59. AMUSATEGUI I, TESOURO MA, KAKOMA I, SAINZ A, *Serological reactivity to Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Neorickettsia risticii, Borrelia burgdorferi and Rickettsia conorii in dogs from northwestern Spain*, Vector Borne Zoonotic Dis. 2008; 8(6), pp. 797–803.
60. HARRUS S, WANER T, *Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): an overview*, Vet. J. 2011. 187(3), pp. 292–296.
61. HARRUS S, ALLEMAN AR, BARK H, MAHAN SM, WANER T, *Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with Ehrlichia canis*, Vet Microbiol, 2002; 86(4), pp. 361–368.
62. ATTIPA C, SOLANO-GALLEG O L, PAPASOULIOTIS K, SOUTTER F, MORRIS D, HELPS C, CARVER S, TASKER S, *Association between canine leishmaniosis and Ehrlichia canis co-infection: a prospective case-control study*, Parasites & vectors. 2018; 11(1), 184. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2717-8>
63. MAIA C, CAMPINO L, *Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection*. Vet. Parasitol. 2008; 158, pp. 274–287.
64. MELÉNDEZ-LAZO A, ORDEIX L, PLANELLAS M, PASTOR J, SOLANO-GALLEG O L. *Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with Leishmania infantum: Comparison of five different clinical classification systems*, Res. J. Vet. Sci. 2018; 117, pp. 18–27.
65. KOUTINAS AF, POLIZOPOULOU ZS, SARIDOMICHELAKIS MN, ARGYRIADIS D, FYTIANOU A, PLEVRAKI KG, *Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996)*, J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 1999; 35(5), pp. 376–383.
66. CIDONCHA A, GALLEG O A, PÉREZ-LUCENA E, VINUESA-LÓPEZ A, ZARO MJ, ZAFRA A, VALENCIA-ROLDÁNA C, *El proteinograma en la práctica clínica*, Medicina integral, 2001; 38, pp. 127-133.

3^{er} premio

TERCER PREMIO

Aplicabilidad de un sistema de sensores inerciales para la optimización del rendimiento de caballos de doma clásica.

Autores: Tamara Martín Giménez (2931), Paola Marescaux, Ignacio de Blas Giral y Antonio M. Cruz Madorran (2806).

Aplicabilidad de un sistema de sensores inerciales para la optimización del rendimiento en caballos de doma clásica

RESUMEN

En equitación, el tempo consiste en el número de apoyos por minuto (apm) que las extremidades tocan el suelo. Este parámetro puede ser medido de forma objetiva empleando sensores inerciales de movimiento. Los objetivos de este estudio fueron: 1) caracterizar de forma objetiva el tempo, 2) evaluar la precisión del binomio jinete/caballo en la ejecución de los aires paso, trote y galope y sus respectivos subaires (medio y alargado) y 3) evaluar el efecto del jinete. Se incluyeron 6 binomios (categoría alevín y juvenil) incluidos en el Plan Nacional de Tecnificación Deportiva. El tempo determinado con el sistema de sensores inerciales fue en el paso medio y alargado de 108 apm y 109 apm respectivamente, en el trote medio y alargado de 160 apm y 164 apm respectivamente y en el galope medio y alargado de 98 apm y 100 apm respectivamente. Estos tempos comparados con los óptimos fijados mediante metrónomo, mostraron una mayor precisión al galope (-1% medio y +1% alargado) respecto al paso (+3,7% medio y +4,3% alargado) y al trote (+1,7% medio y +3,6% alargado). El tempo fue estadísticamente diferente ($p < 0.050$) entre los distintos binomios demostrando la influencia del jinete en la ejecución de los aires. Estos resultados sugieren que los jinetes tienden a ser más precisos al galope, aunque la precisión del tempo es más dependiente del binomio que del aire del caballo. El uso de sensores inerciales durante los entrenamientos permite una valoración del tempo y así dotar al jinete de información objetiva inmediata para facilitar una mayor precisión en la ejecución de sus movimientos.

PALABRAS CLAVE

tempo; duración tranco; precisión; competición

INTRODUCCIÓN

La doma clásica es una disciplina ecuestre con gran seguimiento mundial. Se caracteriza por buscar una unión elegante y armónica entre el jinete y su caballo durante la realización de una prueba o reprise consistente en la realización de una serie de ejercicios complejos y preestablecidos, que se ejecuta en una pista de 20 m x 60 m. En su nivel más alto se realizan los movimientos de mayor complejidad, como los desplazamientos laterales, las piruetas, los cambios de pie al galope o la ejecución de aires como el Piaffé o el Passage. Para ello es necesaria una gran preparación atlética y psicológica del binomio jinete/caballo.

La ejecución de la reprise es evaluada por varios jueces considerando tanto la calidad técnica como artística del binomio (1).

3^{er} premio

La ejecución de estos movimientos exige al caballo coordinación y regularidad en los diferentes aires y el uso de su propio impulso de forma elegante y equilibrada. La regularidad del movimiento se valora por el “tempo” del caballo, siendo éste la frecuencia a la cual sus cascos tocan el suelo.

Es importante diferenciar entre tempo y ritmo, siendo este último en el contexto ecuestre una secuencia recurrente y característica de la sincronización de fases de apoyo y fases aéreas. De esta manera, se dice que el paso tiene un ritmo a 4 golpes, el trote un ritmo a 2 golpes y el galope un ritmo a 3 golpes (2). El tempo puede ser valorado de forma objetiva con un metrónomo. Cuando un entrenador experimentado reconoce el momento en el cual el binomio jinete/caballo está transmitiendo esa armonía tan buscada en doma clásica, puede medir el tempo del caballo con un metrónomo que marcará la frecuencia por minuto de un evento determinado dentro del ciclo del movimiento. El jinete debe de entrenar la capacidad de interiorizar el tempo óptimo puesto que en competición no dispone de dicha herramienta. La forma de valorar los movimientos en doma clásica es subjetiva. Sin embargo, ciertos parámetros que componen el movimiento del caballo no son visibles a simple vista de manera adecuada (3) y la evaluación visual del movimiento en caballos depende en gran medida del evaluador (4). Por ello aquellos métodos que objetivizan el movimiento resultan de especial interés para la optimización del rendimiento especialmente en la alta competición.

El avance de los métodos de análisis del movimiento equino

Actualmente, existen varios métodos de análisis del movimiento que permiten su valoración de forma objetiva, para establecer rangos normativos y proporcionar datos empíricos. Estos métodos se utilizan de forma complementaria a los métodos subjetivos, para ayudar a los entrenadores y jueces en la detección y corrección de errores en los movimientos del binomio jinete/caballo (5). Existen varias modalidades para medir de forma objetiva el movimiento en los caballos. La primera fue descrita en 1870 con el análisis fotográfico imagen por imagen (6) y que fue origen de la cinematografía. Más tarde, llegaron nuevos métodos de análisis que se pueden diferenciar en dos grandes grupos: 1) los que estudian la cinemática del movimiento (estudio del movimiento del cuerpo o de puntos sin considerar la masa o las fuerzas del movimiento) y 2) los que estudian su cinética (estudio de las fuerzas que ejercen el movimiento) (7).

El método cinemático más importante es la optoelectrónica 3D (8). Éste se caracteriza por la colocación de marcadores retroreflectantes sobre el cuerpo del caballo mientras varias cámaras graban su desplazamiento. Posteriormente con un programa informático se analiza el movimiento de dichos puntos de referencia, permitiendo el estudio tridimensional de parámetros cinemáticos (longitud de los segmentos corporales, ángulos de las articulaciones, etc.) (9,10). En cuanto a los métodos cinéticos, para el análisis de los trancos y el análisis de las cojeras, el método de referencia son las placas de fuerza (11). Consiste en un método cinético básico que mide el tiempo de apoyo y el pico de fuerza vertical al apoyo y despegue de la extremidad en los distintos aires (12). En la misma línea conceptual, se han desarrollado diferentes modelos de herraduras, más o menos ligeras y con más o menos sensores capaces de medir la fuerza de reacción terrestre (13).

3^{er} premio

Otros métodos de análisis del movimiento equino se basan en la deformación o estiramiento de los tejidos corporales. Entre ellos destacan, la implantación de fibras unidireccionales sobre los tejidos para medir las fuerzas ejercidas en apoyo de los tendones y ligamentos (14). Asimismo, la electromiografía se puede emplear en un caballo en movimiento para estudiar la función fisiológica y patológica de los músculos ya que permite medir la actividad eléctrica producida por la contracción muscular (13).

Los sensores inerciales

En los últimos años se han desarrollado las unidades de medición inercial (IMUs) también conocidos como sensores inerciales (8). Los IMUs están compuestos de un acelerómetro (miden la aceleración lineal), un giroscopio (miden la velocidad angular), un reloj interno y un magnetómetro. Los acelerómetros y giroscopios pueden ser uni- o triaxiales siendo más precisos los triaxiales. El tamaño miniatura de sus componentes hacen de los sensores un material muy ligero y portátil pero robusto. Esto les confiere la ventaja respecto a los sistemas optoelectrónicos de poder ser colocados sobre las extremidades del caballo sin interferir en su cinética ni cinemática (13).

En función del tipo de sensor y de su posición, se puede analizar distintos parámetros. El desarrollo de un sistema con dos acelerómetros uniaxiales, dispuestos uno de ellos en la cresta nuchal y otro sobre la grupa en la línea media equidistante de ambos tubérculos coxales, permite el estudio del desplazamiento vertical de la cabeza y de la pelvis. Esto, combinado con el uso de un giroscopio sobre la zona distal de una de las extremidades anteriores, permite determinar la duración y la sincronización del tranco y, por lo tanto, detectar asimetrías en el movimiento y deducir de qué extremidad cojea el animal (15). Los sistemas inerciales también pueden instalarse sobre la silla para analizar la aceleración de los trancos, esto permitió la creación de un caballo mecánico con simulación de paso, trote, galope y salto (16).

En el ámbito de la investigación, existe un sistema de sensores compuesto por un GPS y 8 sensores que llevan cada uno un acelerómetro triaxial y tres giroscopios distribuidos en tres ejes ortogonales. Dos sensores se disponen sobre los metacarpos, 2 sobre los metatarsos, 2 sobre los radios y 2 sobre las tibias. Este sistema permite el análisis de las regiones metacarpianas y metatarsianas durante el ciclo completo de un tranco (17), así como el rango de flexión y de extensión de los corvejones y carpos. Por lo tanto, el uso de los IMUs permite un estudio más completo del movimiento del caballo respecto a los demás métodos. Su aplicabilidad es amplia, ya que permite la determinación de variables espaciales y temporales de los trancos.

Las nuevas tecnologías son cada vez más utilizadas en el mundo del deporte, ya sea para monitorizar la salud de los atletas, dotar de un arbitraje justo durante un partido o mejorar el rendimiento de los entrenamientos entre otros. En la hípica, lo que hace que este deporte sea diferente de los demás es la existencia de un binomio entre animal y humano. La relación entre los dos puede ser difícil de entender y de medir. Sin embargo, en doma clásica, se pide una precisión extrema en la ejecución de los diferentes ejercicios, y los IMUs pueden contribuir en este ámbito.

3^{er} premio**Los Planes de Tecnificación Nacionales de Doma**

La Real Federación Hípica Española (RFHE) es el organismo deportivo responsable de la coordinación y regulación de las distintas disciplinas ecuestres en España. Dentro de sus competencias, están el desarrollar el deporte al nivel nacional y la representación a nivel internacional.

La RFHE organiza un total de 12 Planes Nacionales de Tecnificación Deportiva (PNTD) de doma para ayudar a los jinetes a mejorar su nivel, ganar precisión y mejorar su rendimiento con el objetivo de promocionar de nivel hasta alcanzar el nivel profesional/elite. Estos se desarrollan durante determinados periodos a lo largo de la temporada y en distintas localizaciones geográficas (Valencia, Andalucía, Madrid y Cataluña). Los PNTD están dirigidos por un equipo de profesionales que consta de: un director técnico (exjinete olímpico), un preparador físico (Licenciado en Ciencias de la Actividad Física y el Deporte) y un psicólogo (Licenciado en Psicología). Durante varios días, generalmente en fin de semana, el equipo al completo desarrolla talleres y un simulacro de competición con los jinetes y amazonas asistentes. Se trata de una concentración deportiva para proveer de las mejores condiciones de entrenamiento y así optimizar el rendimiento de los atletas.

Durante la *reprise* ejecutada en el simulacro de competición, el equipo al completo evalúa la calidad técnica (director), la salud mental del jinete (psicólogo) y la correlación entre su frecuencia cardíaca y la del caballo (preparador físico). Por su parte, el equipo veterinario y el presente estudio se ha incorporado como parte del PNTD para optimizar el rendimiento de los binomios a través del estudio de variables biomecánicas del movimiento del caballo.

OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio fueron:

1. Caracterizar de forma objetiva y cuantitativa la duración del tranco del caballo a distintos aires: paso, trote y galope y sus correspondientes subaires (medio y alargado) mediante el uso de sensores inerciales.
2. Determinar el nivel de precisión alcanzado por los binomios jinete/caballo, en condiciones de simulación de competición.
3. Estudiar el efecto del jinete sobre la variación del tempo en los diferentes aires y subaires.

MATERIAL Y MÉTODOS**Diseño del estudio**

Para la realización del presente trabajo, se llevó a cabo un estudio observacional transversal analítico durante el desarrollo del Plan Nacional de Tecnificación Deportiva (PNTD) de Doma Clásica de la Real Federación Hípica Española (RFHE) para jóvenes jinetes desarrollado en Cataluña y la Comunidad Valenciana durante los años 2019 y 2020.

3^{er} premio

Jinetes-Amazonas y caballos

En total se evaluaron 28 parejas correspondientes a 12 binomios jinete/caballo (Tabla 1). En cuanto a los caballos participantes, se incluyeron distintas razas, todos presentaban una buena condición corporal y una conformación de acuerdo con su estándar racial.

Binomio	Caballo			Jinete/Amazona			PNTD
	Raza	Edad*	Sexo	Edad*	Categoría	Sexo	Localización
1	Poni B	18	M.E	12	Alevín	M	BCN
2	Poni D	16	M.C	12	Alevín	M	VLC
3	CDE	6	Y	15	Juvenil	H	VLC
4	PRE	9	M.C	15	Juvenil	M	VLC
5	Oldenburgo	13	Y	14	Juvenil	M	VLC
6	PRE	7	M.C	15	Juvenil	M	VLC

* En años en la fecha de realización del PNTD. CDE; Caballo de Deporte Español. PRE; Pura Raza Española. M.E; Macho Entero. M.C; Macho Castrado. Y; Yegua. M; Mujer. H; Hombre. BCN; Barcelona. VLC; Valencia.

Tabla 1. Variables demográficas de los binomios jinete-caballo incluidos en el estudio

Ante la naturaleza no invasiva de las pruebas a realizar no se precisó la aprobación de un comité ético, sin embargo, se solicitó a los padres o tutores legales de los participantes la firma de un consentimiento informado dado que todos los jinetes-amazonas eran menores de edad donde se plasmó por escrito los objetivos del estudio y el personal implicado en el mismo.

Criterios de inclusión

- Para participar en el estudio los binomios jinete-caballo debían haber sido seleccionados y haber formado parte del PNTD de Doma Clásica celebrado en Barcelona (mayo 2019) o bien en Valencia (marzo 2020).
- Los jinetes o amazonas debían pertenecer a las siguientes categorías: alevín (9-12 años), infantil (12-14 años) o juvenil (14-18 años).
- Los binomios debían ejecutar una reprise previamente conocida por los jueces, entrenadores y evaluadores del estudio. Las reprises eran diferentes para cada binomio pero se debían ejecutar como mínimo 5 trancos en línea recta para cada uno de los aires (paso, trote y galope) a valorar.
- Ninguno de los caballos mostró ningún signo de cojera previamente a la realización de la prueba según el criterio del equipo veterinario del presente estudio (siendo uno de los miembros especialista diplomado por el colegio americano en Medicina Deportiva Equina y Rehabilitación).

Adquisición de datos

La recolección de los parámetros cinemáticos fue obtenida con el sistema patentado (Whalley A, Hodgins D. Assessment of gait. Patent number US 8,715,208 B2, May 6, 2014, United States of America) Gait Smart TM Pegasus (European Technology for Business Ltd., ETB, Hertfortshire, UK).

3^{er} premio

Dicho sistema cuenta de unas unidades inerciales de medición (Inertial Measurement Units, IMU) o sensores de movimiento con los que los caballos fueron instrumentados previamente a la realización de la reprise, un programa informático propio (Poseidon 9.0, European Technology for Business Ltd., ETB, Hertfortshire, UK) y un ordenador. Los IMU, son unos pequeños dispositivos de 54 g con unas dimensiones de 19 (profundidad) x 36 (anchura) x 73 (altura) cm que constan de un GPS, un acelerómetro triaxial 5g y 3 giroscopios ortogonales (1200 deg/s), un reloj de precisión, un magnetómetro y un dispositivo de almacenamiento interno de memoria (tarjeta SD).

Para ello se colocaron unos protectores específicos con sujeción de velcro que aseguran la fijación a la extremidad y que constan de un bolsillo ajustado y cerrado donde se alojan los dispositivos, sobre la región próximo-lateral metacarpiana y metatarsiana de las cuatro extremidades (Figura 1) y alineados mediante apreciación visual con el eje largo del segmento óseo.

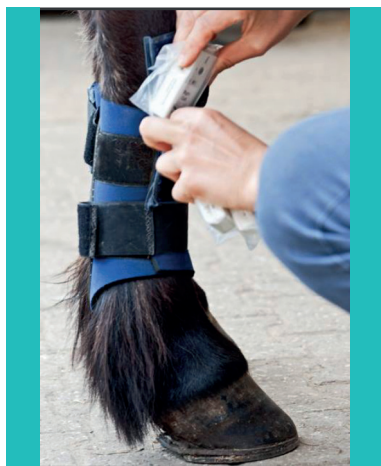


Figura 1. Detalle del protector de la extremidad empleado en el estudio donde se alojan los sensores



Figura 2. Momento de la instrumentación de cada una de las extremidades. previo al inicio de la simulación de competición.

En cuanto a la equipación, los participantes montaron sus propios caballos y utilizaron sus propias monturas y embocaduras de doma correctamente ajustadas. Además, todos los caballos, se montaron de forma estandarizada, es decir, tan sólo llevaron los protectores específicos descritos anteriormente y las vendas de trabajo o protectores propios fueron retirados y sustituidos en el momento de la instrumentación de los animales (Figura 2).

Los binomios calentaron de forma habitual (30 minutos aprox.) en la pista asignada para ensayo y la colocación de los protectores se realizó de 3 a 5 minutos antes de la salida a pista del binomio para permitir la adaptación de los caballos a los protectores empleados en el estudio. En el momento de la colocación en el interior del bolsillo los IMU se encendieron y se solicitó a los jinetes-amazonas un periodo de 10 segundos de parada, para ayudar a los sensores a encontrar un período estacionario para autocalibrarse y así permitir la sincronización con el programa informático del ordenador donde se registran los datos cinemáticos.

3^{er} premio

Los binomios realizaron la reprise acordada con sus entrenadores en condiciones de simulación de competición; casco homologado, vestimenta aprobada por la RFHE, silla y embocaduras autorizadas, presencia de 3 jueces en posición reglamentaria, uno de ellos pertenecientes a la FEI y pista de dimensiones 60 x 20 metros.

Durante los ensayos previos a las jornadas del PNTD y bajo el criterio conjunto de los entrenadores y el director técnico del PNTD (L.L. jinete Olímpico de Doma Clásica, JJOO Atlanta 1996 y Sydney 2000) se fijaron los tempos óptimos de cada binomio con un metrónomo en cada uno de los aires a ejecutar en la simulación de la competición. Estos valores óptimos eran conocidos por los jinetes y amazonas, así como por los entrenadores y el objetivo durante la simulación de competición era su reproducción con la mayor exactitud posible. Durante la realización del presente estudio y por lo tanto de la simulación de la competición, cuando el binomio estaba ejecutando el aire requerido (paso, trote o galope) al tempo óptimo, el director técnico del PNTD hacía una señal al inicio y fin del ejercicio al equipo investigador para proceder a su registro.

Procesamiento y análisis de datos

Una vez terminada la reprise, dos miembros del equipo investigador se acercaron a los caballos, apagaron y retiraron los sensores. A continuación, estos fueron conectados al ordenador con el sistema informático Poseidon 9.0 para proceder a la descarga de los datos recogidos en la tarjeta de memoria de cada uno de los IMU a través de una conexión USB.

El programa informático captura simultáneamente todo el ciclo de movimiento de las regiones metacarpiana y metatarsiana de los caballos. Los sensores se programaron para determinar el ciclo asociado con cada tranco a través de un algoritmo patentado y específico. El sistema ha sido validado previamente (17, 18).

El programa analiza los datos e ilustra en una gráfica el movimiento del caballo. De este modo, el sistema es capaz de identificar el aire del caballo y codificarlo por colores. Gracias a la sincronización temporal realizada entre el programa informático y los IMU cuando éstos se colocaron y con los tiempos registrados, se pudieron localizar los tramos de interés en las gráficas que genera el sistema. La selección de la secuencia de los trancos generada por el programa informático para cada aire fue realizada siempre por el mismo evaluador entrenado. Una vez seleccionados todos los tramos de interés, el programa selecciona el tranco más representativo y detalla sus características. De los parámetros obtenidos se extrajeron los datos correspondientes a la duración del tranco, su valor mínimo y su valor máximo. Con estos datos y los valores de tempo óptimo previamente establecidos se diseñaron unas hojas de cálculo con el programa Microsoft Excel (Anexo), donde se registraron las variables para su posterior análisis estadístico.

3^{er} premio**Análisis estadístico**

Las variables cuantitativas fueron descritas utilizando la media $\pm$ desviación estándar (DE) y el rango (mínimo y máximo). La precisión del binomio se expresó en números absolutos (n) y en frecuencias relativas (%). El sistema Pegasus determina los valores correspondientes a la duración del tranco (stride duration) (DT) expresada esta, en segundos. Para poder ser comparados y analizados respecto a los valores determinados por el metrónomo, los resultados fueron transformados a “apoyos” por minuto para normalizar las mediciones. En cuanto al paso y al trote donde hay dos “apoyos” por tranco correspondientes a cada diagonal, la medición del tempo se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Tempo (Nº apoyos por minuto)} = 2 * \frac{60 (s)}{\text{duración (s) de un tranco}}$$

Sin embargo, para el galope, donde solo existe un “apoyo” en cada tranco, la medición del tempo se hizo a través de la fórmula siguiente:

$$\text{Tempo (Nº apoyos por minuto)} = \frac{60 (s)}{\text{duración (s) de un tranco}}$$

Se aplicó un Modelo Lineal Generalizado (GLM) para cada medida y relación entre estas (descritas usando medias marginales estimadas $\pm$ errores residuales) usando el aire (paso, trote y galope), el subaire (medio o alargado) y el binomio como efectos fijos y también las interacciones entre el aire y el subaire. Los GLM permiten evaluar variables cuantitativas, datos expresados como proporciones, variables de densidad, tasas de incidencia acumulada o variables con respuesta binaria que presenten distribuciones de probabilidad diferentes a la normal y varianzas inconstantes (20). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa informático SPSS 19.0 para Windows (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

RESULTADOS

Se evaluaron un total de doce binomios (7 Valencia, 5 Barcelona) jinete/caballo. De ellos, 6 cumplieron el criterio de 5 trancos consecutivos registrados en línea recta en los siguientes aires: paso medio y alargado, trote medio y alargado, galope medio y alargado, y por tanto fueron incluidos en el estudio (Tabla 1). El 83.3% (n=5) de los binomios los compusieron amazonas y el 16.6% (n=1) jinetes, con una media de edad de 13.83 ± 1.47 años (rango 12-15 años). De los caballos participantes el 50% (n=3) eran machos castrados, 33.3% (n=2) eran yeguas y el 16,6% (n=1) eran machos enteros con una media de edad de $11,5 \pm 4,93$ (rango 7-18 años).

La duración del tranco obtenida durante la simulación de competición mediante el uso de IMUs al paso, trote y galope con sus correspondientes subaires (medio y alargado) se presenta en las Tablas 2, 3 y 4. Asimismo se muestran los tempos equivalentes calculados (según la formula mencionada anteriormente), expresados como apm, para cada una de las mediciones obtenidas.

3^{er} premio

Binomio	DT Paso medio (Pegasus)			Tempo Paso Medio			DT Paso alargado (Pegasus)			Tempo Paso Alargado		
	Med (s)	Mín (s)	Máx (s)	Med (apm)	Min (apm)	Max (apm)	Med (s)	Mín (s)	Máx (s)	Med (apm)	Min (apm)	Max (apm)
1	1,05	1,02	1,09	114	109	117	1,01	0,97	1,04	119	115	124
2	1,07	1,04	1,11	112	108	115	1,07	0,96	1,09	112	110	125
3	1,14	1,11	1,24	105	97	108	1,15	1,13	1,2	104	100	106
4	1,18	1,14	1,2	102	100	105	1,17	1,07	1,22	103	98	112
5	1,18	1,17	1,2	102	100	103	1,19	1,12	1,22	101	98	107
6	1,04	0,96	1,08	115	111	125	1,04	1,01	1,06	115	113	119
Medias	1.11	1.07	1.15	108	104	112	0.93	0.88	0.96	109	105	115

*DT: Duración del Tranco; Med: Medio; Min; Mínimo; Max: Máximo; s: segundos; apm: apoyos por minuto

Tabla 2. Duración del tranco medido por el sistema Pegasus al paso medio y paso alargado y su tiempo equivalente una vez transformado a apoyos por minuto.

Binomio	DT Trote medio (Pegasus)			Tempo Trote Medio			DT Trote alargado (Pegasus)			Tempo Trote Alargado		
	Med (s)	Mín (s)	Máx (s)	Med (apm)	Min (apm)	Max (apm)	Med (s)	Mín (s)	Máx (s)	Med (apm)	Min (apm)	Max (apm)
1	0,65	0,63	0,70	185	171	190	0,58	0,56	0,61	207	197	214
2	0,74	0,73	0,74	162	162	164	0,72	0,69	0,74	167	162	174
3	0,77	0,74	0,78	156	154	162	0,76	0,70	0,73	158	164	171
4	0,76	0,74	0,76	158	158	162	0,76	0,61	0,62	158	194	197
5	0,84	0,84	0,86	143	140	143	0,87	0,74	0,9	138	133	162
6	0,78	0,76	0,8	154	150	158	0,78	0,76	0,79	154	152	158
Medias	0,75	0,73	0,77	158	155	162	0,73	0,67	0,72	161	164	177

*DT: Duración del Tranco; Med: Medio; Min; Mínimo; Max: Máximo; s: segundos; apm: apoyos por minuto

Tabla 3. Duración del tranco medido por el sistema Pegasus al trote medio y trote alargado y su tiempo equivalente una vez transformado a apoyos por minuto.

Binomio	DT Paso medio (Pegasus)			Tempo Paso Medio			DT Paso alargado (Pegasus)			Tempo Paso Alargado		
	Med (s)	Mín (s)	Máx (s)	Med (apm)	Min (apm)	Max (apm)	Med (s)	Mín (s)	Máx (s)	Med (apm)	Min (apm)	Max (apm)
1	1,05	1,02	1,09	114	109	117	1,01	0,97	1,04	119	115	124
2	1,07	1,04	1,11	112	108	115	1,07	0,96	1,09	112	110	125
3	1,14	1,11	1,24	105	97	108	1,15	1,13	1,2	104	100	106
4	1,18	1,14	1,2	102	100	105	1,17	1,07	1,22	103	98	112
5	1,18	1,17	1,2	102	100	103	1,19	1,12	1,22	101	98	107
6	1,04	0,96	1,08	115	111	125	1,04	1,01	1,06	115	113	119
Medias	1.11	1.07	1.15	108	104	112	0.93	0.88	0.96	109	105	115

*DT: Duración del Tranco; Med: Medio; Min; Mínimo; Max: Máximo; s: segundos; apm: apoyos por minuto

Tabla 4. Duración del tranco medido por el sistema Pegasus al galope medio y galope alargado y su tiempo equivalente una vez transformado a apoyos por minuto.

3^{er} premio

El análisis de la precisión de cada binomio fue evaluado sustrayendo el valor de tiempo óptimo (determinado previamente por el equipo técnico del PNTD usando un metrónomo) del valor del número de apm calculado a partir de los datos obtenidos con el sistema Pegasus (Tablas 5, 6, 7).

Teniendo en cuenta que un valor de precisión de "0" indica ausencia de diferencia/variación entre el tiempo óptimo y el medido durante la competición, cuanto más cerca de 0 apm es la diferencia de tiempos, más preciso es el binomio en ir a su tiempo óptimo en los aires correspondientes.

De los tres aires analizados, la precisión de forma global y de la mayoría de los binomios fue mayor durante la ejecución de los movimientos al galope (desfase de -1% y 1% al galope medio y alargado respectivamente). Seguido del trote (desfase de 1,7% y 3,6% al trote medio y alargado respectivamente). El paso fue el aire donde menor precisión se alcanzó (desfase de 3,7% y 4,3% al paso medio y alargado respectivamente).

Binomio	Tempo (metrónomo)	Paso medio (Pegasus)	Precisión (apm)		Paso alargado (Pegasus)	Precisión (apm)	
	Paso (apm)	Medio (apm)	n	%	Medio (apm)	n	%
1	120	114	-6	-5.0	119	-1	-0.8
2	104	112	8	7.7	112	8	7.7
3	100	105	5	5.0	104	4	4.0
4	100	102	2	2.0	103	3	3.0
5	100	102	2	2.0	101	1	1.0
6	104	115	11	10.6	115	11	10.6
Medias	105	108	4	3.7	109	4	4.3

*apm; Apoyos por minuto.

Tabla 5. Diferencias absolutas y relativas en el nº de apoyos por minuto entre los tiempos óptimos determinados con metrónomo y los tiempos medidos con el sistema Pegasus durante el paso medio y alargado.

Binomio	Tempo (metrónomo)	Trote medio (Pegasus)	Precisión (apm)		Trote alargado (Pegasus)	Precisión (apm)	
	Trote (apm)	Medio (apm)	n	%	Medio (apm)	n	%
1	192	185	-7	-3.6	207	15	7.8
2	152	162	10	6.6	167	15	9.9
3	152	156	4	2.6	158	6	3.9
4	152	158	6	3.9	158	6	3.9
5	144	143	-1	-0.7	138	-6	-4.2
6	152	154	2	1.3	154	2	1.3
Medias	157	160	2	1.7	164	6	3.8

*apm; Apoyos por minuto.

Tabla 6. Diferencias absolutas y relativas en el nº de apoyos por minuto entre los tiempos óptimos determinados con metrónomo y los tiempos medidos con el sistema Pegasus durante el trote medio y alargado.

3^{er} premio

Binomio	Tempo (metrónomo)	Galope medio (Pegasus)	Precisión (apm)		Galope alargado (Pegasus)	Precisión (apm)	
	Galope (apm)	Medio (apm)	n	%	Medio (apm)	n	%
1	112	113	1	0.9	125	13	11.6
2	92	95	3	3.3	95	3	3.3
3	96	98	2	2.1	97	1	1.0
4	96	98	2	2.1	98	2	2.1
5	96	87	-9	-9.4	90	-6	-6.3
6	100	97	-3	-3.0	97	-3	-3.0
Medias	99	98	-1	-1.0	100	2	1.0

*apm; Apoyos por minuto.

Tabla 7. Diferencias absolutas y relativas en el nº de apoyos por minuto entre los tempos optimos determinados con metrónomo y los tempos medidos con el sistema Pegasus durante el galope medio y alargado.

Por último, los resultados del análisis multivariante muestran que la variación en el tempo fue similar ($p > 0.050$) entre los distintos aires y subaires y que la precisión del tempo depende del binomio ($p < 0,05$) (Tabla 8).

			Variación Absoluta		Variación Relativa	
Variable	Categoría	n	$\bar{x} \pm s$	p	$\bar{x} \pm s$	p
Aire	Paso	12	4.00 ± 4.99	0.170	0.04 ± 0.05	0.131
	Trote	12	4.33 ± 7.02		0.03 ± 0.04	
	Galope	12	0.50 ± 5.50		0.00 ± 0.05	
Subaire	Medio	18	1.78 ± 5.48	0.201	0.02 ± 0.05	0.273
	Alargado	18	4.11 ± 6.41		0.03 ± 0.05	
Combinado	Paso medio	6	3.67 ± 5.89	0.748	0.04 ± 0.05	0.870
	Paso alargado	6	4.33 ± 4.46		0.04 ± 0.04	
	Trote medio	6	2.33 ± 5.89		0.02 ± 0.04	
	Trote alargado	6	6.33 ± 8.02		0.04 ± 0.05	
	Galope medio	6	-0.67 ± 4.59		-0.01 ± 0.05	
	Galope alargado	6	1.67 ± 6.50		0.01 ± 0.06	
Binomio	1	6	2.50 ± 9.42 ^{ab}	0.048	0.02 ± 0.07 ^{ab}	0.028
	2	6	7.83 ± 4.54 ^b		0.06 ± 0.03 ^b	
	3	6	3.67 ± 1.86 ^{ab}		0.03 ± 0.01 ^b	
	4	6	3.50 ± 1.97 ^{ab}		0.03 ± 0.01 ^b	
	5	6	-3.17 ± 4.45 ^a		-0.03 ± 0.04 ^a	
	6	6	3.33 ± 6.35 ^{ab}		0.03 ± 0.06 ^b	
TOTAL		36	2.94 ± 5.99		0.02 ± 0.05	

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas usando la prueba de contraste de Duncan ($p < 0,005$)

Tabla 8. Análisis multivariante de la influencia del efecto del aire, subaire y binomio en la variación absoluta y relativa del tempo.

3^{er} premio

DISCUSIÓN

Caracterización objetiva del tempo del caballo a distintos aires y subaires mediante el uso de sensores inerciales.

El uso de sensores para el análisis de parámetros espaciotemporales del tranco del caballo como su tempo ha sido validado por varios estudios (17, 18). Sin embargo, este es el primer estudio donde esta caracterización se ha hecho en condiciones de simulación de competición y con jinetes/amazonas jóvenes. A pesar de que el uso del metrónomo siempre se ha utilizado en doma clásica, éste carece de validez científica para su uso en el mundo ecuestre, mientras que los sensores aportan fiabilidad y cuantificación objetiva del movimiento.

De acuerdo con lo descrito en estudios previos de cinemática en caballos de elite de doma clásica (21,22,23), nuestros resultados confirman que a medida que aumenta la velocidad entre los aires, se reduce la duración del tranco y aumenta la frecuencia de estos (24), siendo la inversa de la duración de los trancos. Sin embargo, los valores para la duración del tranco obtenidos en este estudio son superiores tanto al paso (21, 25), trote (22) y galope (23) a los descritos en estudios precedentes. Esta diferencia se puede deber a los caballos empleados en nuestro estudio y a su genética. En este contexto, se ha visto que existe una heredabilidad alta para ciertos parámetros de los trancos, como el tempo, al trote y galope (26). Asimismo, se han descrito diferencias en la frecuencia del tranco según la raza del caballo (27, 28). De esta forma, la heterogeneidad en las razas de nuestros caballos podría ser responsable de la variación de sus tempos. Los caballos de doma clásica de alto nivel se entrenan para conseguir variar su longitud del tranco entre los subaires sin modificar su duración del tranco ni su tempo (23). Por ello otro parámetro importante a considerar y que podría explicar las diferencias es el nivel de entrenamiento de los caballos (23) ya que los caballos de nuestro estudio no eran de élite como los utilizados en estudios previos (21, 22, 23, 25).

Evaluación de los tempos y su precisión según los aires y subaires

En cuanto a las variabilidades de precisión intra-aires, nuestros resultados muestran diferencias no significativas entre los subaires medio y alargado de cada aire, concordando con lo requerido por la FEI (29). La velocidad tiene una relación significativa con la longitud del tranco, indicando que los mejores caballos tienen la capacidad de cambiar de velocidad y por lo tanto de subaire sólo modificando la longitud de su tranco, sin cambiar su duración (22), ni su tempo (25). Nuestros resultados concuerdan con el estudio realizado por Clayton (21) en el cual a medida que la velocidad aumenta, la duración del tranco disminuye, y por lo tanto el tempo aumenta, sin presentar diferencias significativas entre el paso medio y alargado.

Ninguno de los binomios fue perfectamente preciso en ninguno de los aires de su reprise respecto a su propio tempo óptimo. No obstante, presentaron un menor desfase entre el tempo realizado en la simulación de competición y el tempo óptimo al galope, comparado con el paso y el trote. Esta diferencia se puede explicar debido al carácter asimétrico del galope. Gracias a la protracción simultánea de los posteriores y la capacidad de flexión y extensión de la columna vertebral, el

3^{er} premio

caballo es capaz de aumentar o acortar la amplitud del tranco existiendo un cambio de distancia entre el apoyo de la extremidad anterior líder y la diagonal posterior (22). Así, el galope presenta aceleraciones y deceleraciones longitudinales más suaves en el tranco comparado con el trote (30), permitiendo al jinete focalizarse más en su caballo que en su posición. Por lo que el galope es el aire con el movimiento más fácil de acompañar para el jinete comparado con el paso o el trote (31) y consecuentemente tendrá una mejor precisión.

Efecto del jinete sobre la variación del tempo en los diferentes aires y subaires

Según los resultados obtenidos en este estudio, existe una diferencia significativa en la precisión del tempo según el binomio. Esta diferencia puede deberse a varios parámetros, dependientes del jinete o del caballo. En primer lugar, la situación de simulación de competición en la cual se realizó el estudio puede generar un estrés tanto para el jinete que para el caballo (20, 32).

La falta de precisión observada también puede deberse al nivel atlético del jinete y del caballo. Se considera que un jinete sabe montar cuando es capaz de seguir los movimientos del caballo e influenciarlos (2). La posición de la cabeza y del cuello del caballo, pedida por el jinete, influye sobre la duración del tranco y por lo tanto del tempo (33).

En el mismo sentido, la posición del jinete tiene una influencia sobre el caballo y su movimiento. Asimismo, se ha visto que, los movimientos de un jinete de elite son más constantes y en mejor armonía con el caballo comparado con un jinete de nivel intermedio (34, 35, 36, 37). En este estudio, aunque los jinetes eran de alto nivel para su categoría de edad, eran niños. La experiencia de un niño de 12-15 años como en este estudio podría explicar una imperfección en sus movimientos. De la misma manera, el estado mental y la madurez también difiere entre los jinetes. Los jinetes con menos experiencia presentan más confusión al montar y pueden no entender las señales del caballo, provocando momentos de desacuerdo (38).

Sin embargo, hay una escasa disponibilidad de estudios tanto acerca de niñosjinetes en el deporte ecuestre que acerca del efecto de las competiciones sobre los jinetes y los caballos, por su complejidad en realizar. Por lo tanto, sería interesante confirmar y ampliar los datos encontrados en este estudio con diferentes categorías de nivel hasta el nivel elite para ver la evolución en la precisión del jinete durante una simulación de competición.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio fueron las siguientes:

1. Los sensores inerciales son un sistema eficaz y fiable para el análisis objetivo y cuantitativo del tempo del caballo a distintos aires (paso medio y alargado, trote medio y alargado y galope medio y alargado). Permiten monitorizar los entrenamientos con el fin de mejorar el rendimiento deportivo.
2. Las condiciones especiales reunidas durante una competición no afectan a la precisión del tempo del jinete y caballo en comparación con el entrenamiento.
3. Los binomios tienen tendencia a ser más precisos al galope comparado con el paso y el trote. Al contrario, parecen tener más dificultades en ajustar el tempo de su trote alargado comparado con los otros subaires, aunque estas diferencias no son significativas.

3^{er} premio

BIBLIOGRAFÍA

1. REAL FEDERACIÓN HÍPICA ESPAÑOLA. *Doma clásica* [Internet]. 2020 [Consultado 12 de marzo de 2020]. Disponible en: <http://www.rfhe.com/doma-clasica/>
2. EGENVALL A, BYSTRÖM A, WEISHAUPT M, ROEPSTORFF L. *Horse-rider interaction*. En: Back W, Clayton HM, editores. *Equine locomotion*. 2nd ed. London: Elsevier; 2013:341-68.
3. SWEET AL. *Temporal discrimination by the human eye*. *Am J Psychol*. 1953;66(2):185-98.
4. KEEGAN KG, WILSON DA, JANICEK J, KRAMER J. *Repeatability of subjective evaluation of lameness in horses*. *Equine Vet J*. 2010;42(2):92-7.
5. CLAYTON H, HOBBS S. *The role of biomechanical analysis of horse and rider in equitation science*. *Appl Anim Behav Sci*. 2017;190:123-32.
6. MUYBRIDGE E. *Animals in motion*. New York: Dover Publications; 1957.
7. HAMILL J, KNUTZEN K. *Biomechanical basis of human movement*, 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
8. EGAN S, BRAMA P, MCGRATH D. *Research trends in equine movement analysis, future opportunities and potential barriers in the digital age: A scoping review from 1978 to 2018*. *Equine Vet J*. 2019;51(6):813-24.
9. TORRES-PEREZ Y, GOMEZ-PACHON E, CUENCA-JIMENEZ F. *Horse's gait motion analysis system based on videometry*. *Ciencia Y Agricultura*. 2016;13:83-94.
10. SKUROWSKI P, PAWLYTA M. *On the noise complexity in an optical motion capture facility*. *Sensors (Basel)* [Internet]. 2019. [Consultado 6 marzo 2020];19(20):4435. Disponible en: <https://www.mdpi.com/14248220/19/20/4435>
11. KEEGAN KG, MACALLISTER CG, WILSON DA, et al. *Comparison of an inertial sensor system with a stationary force plate for evaluation of horses with bilateral forelimb lameness*. *Am J Vet Res*. 2012;73(3):368-74.
12. HOLT D, ST GEORGE LB, CLAYTON HM, HOBBS SJ. *A simple method for equine kinematic gait event detection*. *Equine Vet J*. 2017;49(5):688-91.
13. CLAYTON HM, SCHAMHARDT HC. *Measurement techniques for gait analysis*. En: Back W, Clayton HM, editores. *Equine locomotion*. 2nd ed. London: Elsevier; 2013:31-60.

3^{er} premio

14. RAVARY B, POURCELOT P, BORTOLUSSI C, KONIECZKA S, CREVIER-DENOIX N. *Strain and force transducers used in human and veterinary tendon and ligament biomechanical studies*. Clin Biomech (Bristol, Avon). 2004;19(5):433-47.
15. KEEGAN KG, PAI PF, WILSON DA, SMITH BK. *Signal decomposition method of evaluating head movement to measure induced forelimb lameness in horses trotting on a treadmill*. Equine Vet J. 2001;33(5):446-51.
16. GALLOUX P, RICHARD N, DRONKA T, et al. *Analysis of equine gait using threedimensional accelerometers fixed on the saddle*. Equine Vet J. 2010;26:44-7.
17. CRUZ AM, MANINCHEDDA UE, BURGER D, WANDA S, VIDONDO B. *Repeatability of gait pattern variables measured by use of extremity-mounted inertial measurement units in nonlame horses during trotting*. Am J Vet Res. 2017;78(9):1011-8.
18. CRUZ AM, VIDONDO B, RAMSEYER AA, MANINCHEDDA UE. *Effect of trotting speed on kinematic variables measured by use of extremity-mounted inertial measurement units in nonlame horses performing controlled treadmill exercise*. Am J Vet Res. 2018;79(2), 211-8.
19. BUCHNER HHF, SAVELBERG HHCM, SCHAMHARDT HC, MERKENS HW, BARVENEVELD A. *Kinematics of treadmill versus overground locomotion in horses*. Vet Quarterly. 1994;16(sup2):97-90.
20. CELIS DE LA ROSA A, LABRADA MARTAGON V. *Introducción a los modelos lineales generalizados*. En: Celis de la Rosa A, Labrada Martagon V, editores. Bioestadística. Mexico: Manual Moderno; 2014. p. 239-53.
21. CLAYTON H. *Comparison of the strides kinematics of the collected, medium, and extended walks in horses*. Am J Vet Res. 1995;56(7):849-52.
22. CLAYTON H. *Comparison of the stride kinematics of the collected, working, medium and extended trot in horses*. Equine Vet J. 1994;26(3):230-4.
23. CLAYTON H. *Comparison of the collected, working, medium and extended canters*. Equine Vet J Suppl. 1994;17:16-9.
24. BARREY E. *Biomechanics of locomotion in the athletic horse*. Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, editores. Equine Sports Medicine and Surgery. 2nd ed. London: Elsevier; 2004. p. 189-211.
25. DEUEL NR, PARK JJ. *The Gait Patterns of Olympic Dressage Horses*. Int J Sport Biomech. 1990;6:198-226.
26. BARREY E, BIAU S. *Locomotion of dressage horses*. En: Lindner A, editor. The Elite Dressage and Three-Days Event Horse. Conference on Equine Sport Medicine and Science. Saumur; 2002. p. 203.

3^{er} premio

27. GALISTEO AM, VIVO J, CANO MR, et al. *Differences between breeds (Dutch warmblood vs Andalusian Purebred) in forelimb kinematics*. J Equine Sci. 1997;8:43–47.
28. BARREY E, DESLIENS F, BLOUIN C, LANGLOIS B. *Mesures du modèle, des allures et du saut des étalons nationaux par la méthode Equimétrie*. En: 28ème Journée d'étude. Les Haras Nationaux: Paris; 2002:157-76.
29. FEI. *Dressage rules*. 25th edition. Switzerland: FEI. 2020
30. TERADA K. *Comparison of head movement and EMG activity of muscles between advanced and novice horseback riders at different gaits*. J Equine Sci. 2000;11:89-93.
31. WOLFRAMM IA, BOSGA J, MEULENBROEK RGJ. *Coordination dynamics in horse-rider dyads*. Hum Mov Sci. 2013;32:157-70.
32. PEETERS M, CLOSSON C, BECKERS JF, VANDENHEEDE M. *Le stress du cavalier et du cheval en compétition: Appréciation, cinétique et impact sur les performances [Stress of riders and horses in competition assessment, kinetics and effect on performance]*. En: 37ème Journée de la Recherche Equine. Paris; 2011.
33. WEISHAUPT MA, WIESTNER T, VON PEINEN K, WALDERN N, ROESPSTORFF L, VAN WEEREN R, MEYER H, JOHNSTON C. *Effect of Head and Neck Position on Vertical Ground Reaction Forces and Interlimb Coordination in the Dressage Horse Ridden at Walk and Trot on a Treadmill*. Equine Vet J Suppl. 2006;36:387-92.
34. PEHAM C, LICKA T, KAPAUN M, SCHEIDL M. *A new method to quantify harmony of the horse-rider system in dressage*. Sports Eng. 2001;4:95101.
35. LAGARDE J, PEHAM C, LICKA T, KELSO JAS. *Coordination dynamics of the horse-rider system*. J Mot Behav. 2005;37:418-24.
36. MUNZ A, ECKARDT F, WITTE K. *Horse-rider interaction in dressage riding*. Hum Mov Sci. 2014;33:227-37.
37. KANG OD, RYU YC, RYEW CC, OH WY, LEE CE, KANG MS. *Comparative analyses of rider position according to skill levels during walk and trot in Jeju horse*. Hum Mov Sci. 2010;29(6):956-63.
38. WOLFRAMM I, SHEARMAN J, MICKLEWRIGHT D. *A preliminary investigation into pre-competitive mood states of advanced and novice equestrian dressage riders*. J Appl Sport Psy. 2010;22(3):333-42.

ANEXO

Hoja de Recogida de Datos para cada binomio

[illegible]



PREMIOS
ICOVV

ILUSTRE COLEGIO
OFICIAL DE
VETERINARIOS
DE VALENCIA

CATEGORÍA JUAN MORCILLO OLALLA

Historia de la Veterinaria y Salud Pública y Seguridad alimentaria



PREMIOS
ICOVV

ILUSTRE COLEGIO
OFICIAL · DE
VETERINARIOS
DE · VALENCIA

CATEGORÍA FOTOGRAFÍA VETERINARIA

1^{er} premio

PRIMER PREMIO

La vida se abre paso.

Autor: Vicente Soriano Benet (1301).

1^{er} premio

La vida se abre paso



2º premio

SEGUNDO PREMIO

Escherichia coli, de la huerta a la placa.

Autor: Carlos Martínez Gil (1771).

2º premio

Escherichia coli, de la huerta a la placa



3^{er} premio

TERCER PREMIO

Pasando lista.

Autora: Patricia Carulla Pascual (2990)

3^{er} premio

Pasando lista





PREMIOS ICOVV



ILUSTRE COLEGIO
OFICIAL · DE
VETERINARIOS
DE · VALENCIA