



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola d'Enginyeria Agroalimentària
i de Biosistemes de Barcelona

Avaluació de benestar animal en porcí en l'administració de vacunes intradèrmiques sense agulla versus intramuscular amb agulla

ESCOLA SUPERIOR D'AGRICULTURA DE BARCELONA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

TREBALL FINAL DE GRAU

GRAU EN ENGINYERIA EN CIÈNCIES AGRONÒMIQUES

Autor: Sergio Boldo Corral

Tutors: Alexandra Contreras Jodar i Antoni Dalmau Bueno

Resum

La vacunació és una pràctica que provoca estrès i dolor als animals. En el present estudi s'ha investigat si la vacunació intradèrmica sense agulla millora el benestar dels garrins en comparació amb la tradicional injecció intramuscular amb agulla. Es van utilitzar 72 garrins, meitat mascles i meitat femelles, i es van assignar a 3 grups de tractament: 1) Vacunació intramuscular (IM) mitjançant una única injecció intramuscular a la regió del coll amb 2,0 ml d'UNISTRAIN® mitjançant una agulla d'acer inoxidable individual de 21 G x 16 mm ; 2) Vacunació intradèrmica (ID) mitjançant una única aplicació intradèrmica sense agulla amb 0,2 ml d'UNISTRAIN® a la regió del coll mitjançant el dispositiu alimentat per bateria; 3) Control (CON), essent el tractament sense vacuna. La vacunació es va produir quan els garrins tenien 28 dies d'edat. Dos setmanes abans del dia de la vacunació, els garrins es van socialitzar amb els humans i una setmana abans de la vacunació van començar a entrenar-se per creuar una passarel·la de 4 m de llargada per realitzar una prova d'aversió. La vacunació es va realitzar al final d'aquesta passarel·la. Es va registrar el temps que es va passar per creuar la passarel·la per cada garrí en diferents moments: abans de la vacunació, 10 min, 2 h, 24 h, 48 h i 72 h després de la vacunació, per mesurar les variacions d'aquests temps com a signes d'aversió al procés de vacunació. Les vocalitzacions també es van registrar al final d'aquesta passarel·la per analitzar la seva freqüència (Hz), la durada i nivell de pressió (dB). Com a indicador d'estrès fisiològic, es va mesurar el cortisol en saliva abans i 10 min després de la vacunació. A més, es van registrar paràmetres de comportament i la reacció en la pell el dia de la vacuna i en els dies posteriors. Deu minuts després de la vacunació, els garrins IM van tardar més temps ($P < 0,001$) en creuar la passarel·la que els porcs ID i CON. Les vocalitzacions van ser diferents entre els tres tractaments: els garrins CON van presentar la freqüència ($P < 0,001$) i nivell de pressió ($P < 0,001$) més baixes, i la IM la més alta, amb ID en una posició intermèdia significativa ($P < 0,001$). El dia de la vacunació els animals IM i ID estaven estirats al costat de l'administració de la vacuna el doble de temps que els CON ($P = 0,027$). El cortisol en saliva no va variar entre tractaments. Es va observar una major presència de pàpules en ID que en IM i una major presència de sang en IM que en ID. Es conclou que la vacunació intradèrmica sense agulla redueix els signes de dolor i aversió relacionats amb la vacunació i, per tant, millora el benestar dels garrins.

Paraules clau: garrins, vacunació, intramuscular, intradèrmica, benestar, comportament

Resumen

La vacunación es una práctica que conlleva estrés y dolor en los animales. En el presente estudio se ha investigado si la vacunación vía intradérmica sin aguja mejora el bienestar animal de los lechones en comparación a la inyección tradicional, vía intramuscular con aguja. Se utilizaron 72 lechones, mitad machos, y mitad hembras, y se asignaron a 3 grupos de tratamiento: 1) Vacunación intramuscular (IM) mediante la utilización de inyección intramuscular en la zona del cuello con 2,0 ml de UNISTRAIN® con aguja de acero inoxidable individual de 21 G x 16 mm; 2) Vacunación intradérmica (ID) mediante una única aplicación intradérmica sin aguja con 0,2 ml de UNISTRAIN® en la zona del cuello con el dispositivo alimentado por batería; 3) Control (CON), siendo el tratamiento sin vacuna. La vacunación se produjo cuando los lechones tenían 28 días de edad. Dos semanas antes del día de la vacunación, los lechones socializaron con los humanos y una semana antes de la vacunación comenzaron a entrenarse para cruzar una pasarela de 4 m de longitud para realizar una prueba de aversión. La vacunación se realizó en el final de esta pasarela. Se registró el tiempo que tardaron en cruzar la pasarela por cada lechón en diferentes momentos; antes de la vacunación, 10 min, 2 h, 24 h, 48 h i 72 h después de la vacunación, para medir las variaciones como signo de aversión en el proceso de vacunación. Las vocalizaciones también se registraron al final de la pasarela para analizar la frecuencia (Hz), la durada y el nivel de presión (dB). Como indicador de estrés fisiológico, se midió el cortisol en saliva antes i 10 min después de la vacunación. Además, se registraron parámetros de comportamiento y la reacción en la piel el día de la vacuna y los días posteriores. Diez minutos después de la vacunación, los lechones IM tardaron más tiempo ($P < 0,001$) en cruzar la pasarela que los cerdos ID y CON. Las vocalizaciones fueron diferentes entre los tres tratamientos: los lechones CON presentaron la frecuencia ($P < 0,001$) y nivel de presión ($P < 0,001$) mas bajas, y la IM la más alta, con ID en una posición intermedia significativa ($P < 0,001$). El día de la vacunación los animales IM e ID estaban estirados hacia el lado de la administración de la vacuna el doble de tiempo que los CON ($P = 0,027$). El cortisol en saliva no varió entre los tratamientos. Se observó una mayor presencia de pápulas en ID que en IM y una mayor presencia de sangre en IM que en ID. Se concluye que la vacunación intradérmica sin aguja reduce los signos del dolor y aversión relacionados con la vacunación, y, por lo tanto, mejora el bienestar de los lechones.

Palabras clave: lechones, vacunación, intramuscular, intradérmica, bienestar, comportamiento

Abstract

Vaccination is a stressful and painful event for animals. In this study, it has been investigated whether intra-dermal vaccination without needle improves the animal welfare of piglets compared to traditional intra-muscular needle injection. Seventy-two piglets, half males and half females, were used and assigned to 3 treatment groups: 1) Intramuscular vaccination (IM) in the neck area with 2.0 ml of UNISTRAIN® with 21 G x 16 mm single stainless-steel needle; 2) Intradermal vaccination (ID) using a single intradermal needle-free application with 0.2 ml of UNISTRAIN® in the neck area with a battery-powered device; 3) Control (CON), being the treatment without vaccination. Vaccination occurred when piglets were 28 days old. Two weeks before the day of vaccination, the piglets socialized with the humans and a week before the vaccination they began to train to cross a 4 m long walkway to perform an aversion test. The vaccination was carried out at the end of this catwalk. The time taken to cross the catwalk for each piglet at different times was recorded; before vaccination, 10 min, 2 h, 24 h, 48 h and 72 h after the vaccination, to measure the variations as a sign of aversion in the vaccination process. Vocalizations were also recorded at the end of the gateway to analyze frequency (Hz), duration, and pressure level (dB). As an indicator of physiological stress, cortisol was measured in saliva before and 10 min after vaccination. In addition, behavioral parameters and skin reaction were recorded on the day of the vaccine and the following days. Ten minutes after vaccination, IM piglets took longer ($P < 0.001$) to cross the catwalk than ID and CON pigs. Vocalizations were different between the three treatments: CON piglets had the lowest frequency ($P < 0.001$) and pressure level ($P < 0.001$) and the highest MI, with ID in a significant intermediate position ($P < 0.001$). On the day of vaccination, the IM and ID animals were stretched to the side of the vaccine administration twice as long as the CON ($P = 0.027$). Cortisol in spit did not vary between treatments. There was a greater presence of papules in ID than in IM and a greater presence of blood in IM than in ID. It is concluded that intra-dermal vaccination without needle reduces the incidence of signs of pain and aversion related to vaccination, and therefore improves the welfare of piglets.

Keywords: piglets, vaccination, intramuscular, intradermal, welfare, behaviour

Índex

AGRAÏMENTS	8
1. INTRODUCCIÓ	9
2. OBJECTIUS	16
3. METODOLOGIA	17
3.1. Animals i tractaments	17
3.2. Test d'aversió	20
3.3. Vocalitzacions.....	25
3.4. Cortisol en saliva.....	26
3.5. Activitat general dels animals	27
3.6. Reaccions a la vacuna.....	29
3.7. Anàlisi estadístic.....	30
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	31
4.1. Test d'aversió	31
4.2. Vocalitzacions.....	32
4.3. Cortisol en saliva.....	36
4.4. Activitat general dels animals	38
4.5. Reaccions a les vacunes	42
CONCLUSIONS	43
BIBLIOGRAFIA	44
Referències bibliogràfiques	¡Error! Marcador no definido.

Índex de figures

- Figura 1.** Corral emprat per a l'allotjament dels garrins durant l'estudi _____ 19
- Figura 2.** Porc en diferents posicions dins del circuit de 4 metres de longitud on es feia el test d'aversi6. A la foto de l'esquerra l'animal encara no ha pogut començar a caminar perquè se li barra el pas, a la del centre ha començat a caminar fa poc i en la de la dreta està a punt d'arribar al final del circuit. _____ 21
- Figura 3.** Finestra al final del circuit on es feia la vacunació i se'ls donava el premi amb biber6 i detall de les càmeres i gravadores per obtenció d'expressions facials i vocalitzacions. _____ 22
- Figura 4.** Ordre d'entrada dels animals al circuit, on el color gris es corral 1, el color taronja el corral 2, el color verd6s el corral 3, el color blau cel el corral 4 i el color blanc el corral 5, el color de les icones mostra el color del cr6tal dels animals i el color sota de les icones el color d'esprai amb el que estaven pintats els animals. _____ 22
- Figura 5.** Ordre en la que els animals van fer el circuit pel test d'aversi6 el dia de la vacuna. On 1 es el moment de la vacunació, R la repetició o test d'aversi6 als 10 minuts de la vacunació i R2 la repetició a les 2 hores de la vacuna. Els rectangles grisos, marrons, verds i blau cels corresponen als animals dels corrals 1, 2, 3 i 4, respectivament _____ 24
- Figura 6.** Obtenció de saliva per a determinació de cortisol _____ 26
- Figura 7.** Horari en la que es feien els focals en cada un dels corrals per animal el dia abans de la vacuna, el dia de la vacuna i després de la vacuna. _____ 28
- Figura 8.** Temps en segons que tarden els animals en rec6rrer els 4 metres del circuit del test d'aversi6 el dia 0 just abans de la vacuna, als 10 minuts i a les 2 hores pels tres tractaments de l'estudi, control, intradèrmic 1 i intramuscular. *, significa diferències significatives a $P > 0.01$ _____ 31
- Figura 9.** En barres i associat a l'eix de l'esquerre es mostra el número de vocalitzacions per animal en el cas d'altres freqüències de pic (> 1000 Hz), baixes freqüències de pic (< 1000 Hz) i el total (suma de les dues) segons el tractament. En punts i associat a l'eix de la dreta es mostren el

percentatge d'animals amb vocalitzacions detectades durant l'anàlisi dels registres. En tots els casos es mostren les diferències per tractaments (control, intradèrmic i intramuscular), on una lletra diferent dins de cada categoria de variable (altes, baixes, totals i %) indiquen diferències significatives a $P > 0,05$. _____ 32

Figura 10. Nivell de soroll mig detectat en el moment de la vacunació o contacte en el cas del grup control per als tres tractaments de l'estudi. Una lletra diferent entre tractaments indica diferències significatives a $P < 0,01$. _____ 34

Figura 11. Nivell màxim de pressió del so (dB) emès pels garrins de cada tractament (blau: grup control; taronja: intradèrmic; verd: intramuscular (IM) en el moment de la vacunació. ____ 35

Figura 12. Concentració de cortisol en saliva el dia abans (basal) a la mateixa hora que es va fer el dia de la vacuna i 10 minuts després de la vacuna (vacuna) pels tres tractaments de l'estudi. _____ 36

Figura 13. Concentració de cortisol en saliva en relació al corral i trial de l'estudi pels tres tractaments. Cada barra és el resultat de la mitja dels tres porcs per tractament que hi havia a cada corral. _____ 37

Figura 14. Percentatge del temps que els animals van dedicar a estar tombats del costat dret, dels costat esquerre o esternalment el dia abans de la vacuna (pre), el dia de la vacuna (vac) i el dia després de la vacuna (post) en els tres tractaments de l'estudi mitjançant l'anàlisi d'scans samplings. Una lletra diferent entre diferents tractaments indica diferències significatives a $P < 0,05$. _____ 39

Figura 15. Percentatge del temps que els animals van dedicar a estar tombats, explorant, tenint conductes socials o menjant el dia abans de la vacuna (pre), el dia de la vacuna (vac) i el dia després de la vacuna (post) en els tres tractaments de l'estudi mitjançant l'anàlisi d'scans samplings. Una lletra diferent entre diferents tractaments indica diferències significatives a $P < 0,05$. _____ 40

Figura 16. Temps mitjos dedicats dins de cada focal sampling a estar realitzant conductes socials positives, negatives o assegurats en els tres tractaments de l'estudi. Una lletra diferent entre diferents tractaments indica diferències significatives a $P < 0,05$. _____ 41

Índex de taules

Taula 1. Activitats que es van considerar durant els scan samplings _____ 27

Taula 2. Reaccions locals a la vacuna _____ 29

Agraïments

El present treball de final de grau hauria sigut impossible de realitzar sense la inestimable col·laboració d'algunes persones que he d'agrair la seva aportació així com a l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA) per brindar-me la possibilitat de realitzar l'experimentació del treball amb ells i en les seves instal·lacions.

Un immens agraïment mereix el treball de la Dra. Alexandra Contreras. La seva incansable dedicació, continu estímul i confiança són dignes d'admiració. He d'agrair també al Dr. Antoni Dalmau per la inestimable col·laboració i ajuda al llarg de tota l'experimentació.

També he d'agrair a Aida Xercavins i Aranzazu Varvaro pel seu suport i professionalitat al llarg de tota la investigació i ajuda al llarg de tota la part pràctica. Agrair a tot l'equip de l'IRTA Monells, per la seva professionalitat i afecte al llarg de tota l'estança a les instal·lacions.

Per últim, vull donar les gràcies a la meva família i amics per ajudar-me en tot moment i donar-me ànims al llarg de tot el treball.

1. Introducció

Després de la Segona Guerra Mundial es van produir forts canvis en la ramaderia. La població demandava aliments a baix preu i en conseqüència, es va produir una ràpida industrialització dels mètodes de producció que permetia augmentar l'oferta d'aliments i disminuir els costos de producció. No va ser fins a 1964 quan Ruth Harrison, activista pel benestar animal i escriptora del Regne Unit, va escriure un llibre titulat "Animal Machines" [1], on va revelar i criticar la ramaderia intensiva. En la seva crítica, va fer especial èmfasi en el patiment animal. La condemna pública va ser tan grossa que el 1965 el govern britànic es va sentir obligat a formar una comissió d'investigació sota la presidència del professor Rogers Brambell. L'informe que se'n va derivar és conegut com a "Informe Brambell"[2]. En aquest, es va concloure que efectivament el benestar dels animals de granja en intensiu eren motiu de preocupació, però que no hi havia evidència científica per a avaluar-ho. A més, van assenyalar que no només el benestar físic dels animals era important sinó que també ho eren les emocions dels animals. Així, es va afirmar que "El benestar és un terme ampli que abasta tant el benestar físic com el mental de l'animal". Per tant, qualsevol intent d'avaluar el benestar havia de tenir present l'evidència científica disponible que els animals són éssers sensibles i amb sentiments. No obstant això, malgrat aquestes al·lusions a les emocions dels animals en general i al seu patiment en particular, davant la dificultat de poder fer servir aquests estats emocionals per avaluar el benestar animal, la visió generalitzada i més pràctica era abordar el benestar animal en relació amb la resposta d'estrès, on aquest es podia definir com les dificultats d'un individu per superar les dificultats de l'entorn. La gran avantatge que hi va veure la comunitat científica d'aquell moment en aquest abordatge és que a diferència de les emocions, la resposta d'estrès i les seves conseqüències sí que es podien mesurar ([3]–[5]).

En paral·lel a aquesta forma més pràctica de treballar amb el benestar animal, s'avançava en un concepte molt més ampli del benestar animal, com el de l'etòleg nord-americà anomenat Donald Griffin, autor del llibre titulat "The question of animal awareness" [6]. En ell es va discutir que els animals tenen consciència i no eren autòmats tal com es presumia majoritàriament als anys 70. Aquest llibre va ser el detonant també d'un nou enfocament en el benestar animal i arran d'aquest, va començar a haver-hi estudis emergents sobre la sensibilitat i el benestar dels animals (ex:[7]–[10]).

Paral·lelament a aquest despertar científic en l'interès per la sensibilitat i el benestar dels animals, Peter Singer, filòsof australià, es va centrar en l'ètica de l'ús dels animals en publicar "Animal Liberation" [11] el 1975. Va popularitzar el terme "especisme" per descriure la pràctica de privilegiar els humans sobre altres animals i, per tant, advocava per la igualtat de consideració de tots els éssers sensibles. A més, segueix sent un defensor molt actiu del veganisme i detractor de l'experimentació animal. Per algunes persones és el pare filosòfic dels moviments animalistes, que proposen la no explotació animal sota cap circumstància enfront dels benestaristes, que en condicionen l'ús a unes condicions de vida i mort dignes.

Així, l'any 1979, el FAWC (Consell del Regne Unit pel benestar d'animals de granja) [12] va establir que el benestar dels animals de granja es fonamentaven en "5 llibertats" on els animals havien de ser:

1. Lliures de gana, set i desnutrició
2. Lliures de por i angoixa
3. Lliures de molèsties físiques i tèrmiques
4. Lliures de dolor, lesions i malalties
5. Lliures d'expressar el comportament natural

Aquestes 5 llibertats arrossegueu els problemes d'haver-se definit en un temps en què la ciència del benestar animal procurava principalment d'evitar el maltractament animal. Així, per exemple, defineix que les emocions que s'han de tenir en compte són la por, el dolor i l'angoixa. És evident que l'absència d'aquestes emocions indiquen més una absència de mal estar que la presència d'un benestar. Per aquesta raó, el mateix FAWC l'any 2009, dona per amortitzades les 5 llibertats i redefineix el benestar animal com a "life worth living" [13], és a dir, que l'animal visqui una vida que sigui digne de ser viscuda, on no només es considera l'absència d'emocions negatives, sinó la presència de positives.

En tot cas, si tornem a aquelles definicions inicials més centrades en la resposta d'estrès, com la de Broom (1986) [14], que afirma el següent: "el benestar d'un animal és l'estat en el qual es troba aquest animal en relació amb els seus intents d'afrontar l'ambient en què es troba", el benestar d'un animal estaria en una d'aquestes tres situacions: 1) en un ambient difícil i sense possibilitat d'adaptació, causant la mort; 2) en un ambient inadequat amb possibilitat d'adaptació però amb

un cost a pagar en resposta d'estrès o canvis en el comportament o 3) en un ambient adequat amb facilitat d'adaptació on no es requerirà cap cost biològic i, per tant, l'animal gaudirà d'un òptim benestar animal.

Sigui com sigui, en les últimes dècades s'ha produït un creixent interès social respecte al benestar animal, fent necessària la revisió, adopció i millores en les pràctiques ramaderes. A més, les reglamentacions adoptades a la Unió Europea han permès una substancial millora en la qualitat de vida dels animals de granja. Tot i així, cada cop més la societat advoca per uns estàndards més elevats en benestar animal i demanden certificats de benestar, generant una pressió positiva cap a la ramaderia per millorar les seves pràctiques envers els animals. Totes aquestes millores en la producció s'han donat gràcies a la recerca científica en comportament i benestar animal i en l'ús de noves tecnologies i maneigs.

En la producció pecuària existeixen moltes pràctiques potencialment doloroses que s'apliquen als animals, i que en molts casos es realitzen de forma rutinària, perquè es relacionen amb un benefici productiu. Aquestes pràctiques es poden realitzar de diverses maneres, arribant al mateix objectiu. Escollir de manera correcta la tècnica i l'aplicació és un factor molt important per reduir el patiment dels animals durant el procés, ja que aquestes faran que varïï la intensitat de dolor que pateixin els animals, i poden millorar la seva aplicació, velocitat i efectivitat. A partir de la investigació s'han arribat a noves possibilitats en diversos procediments en els quals existeixen alternatives indolores o si més no a procediments en els quals es disminueix i minimitzen el dolor causat.

Per tal de facilitar la comprensió i unificar criteris, és necessari precisar algunes definicions sobre termes utilitzats més endavant. Com a terme principal, és important definir que és el dolor i els seus tipus i característiques. Hi ha diverses definicions del dolor i canvien al llarg del temps. Una de les definicions més acceptades és la donada per la Societat Internacional per a l'estudi del dolor (IASP), que defineix el dolor com a una experiència sensorial i emocional desagradable, associada a un dany tissular real o potencial [15]. Una altra definició molt estesa i acceptada és donada per l'Organització Mundial de la Sanitat Animal (OIE) [16] que afirma que "el dolor designa una experiència sensorial i emocional desagradable, associada a danys, possibles o reals, en els teixits. Pot desencadenar reaccions de defensa, evasió o angoixa i modificar el comportament". Per tant també s'ha de dir que el dolor implica una percepció subjectiva, intransferible entre individus, la qual genera una resposta adaptativa que indica la presència de lesions i accions que atempten

contra la vida [17], [18]. Entre altres respostes, el dolor genera angoixa o estrès. El fet que el dolor sigui una percepció subjectiva genera una gran dificultat per a quantificar-lo i impossible de quantificar-ho objectivament. S'ha de tenir en compte que les respostes que dona cada individu a un dolor poden ser diferents, i que per tant podem trobar un llindar ampli de diferents tipus de respostes fisiològiques o de comportament [19]–[21], com fins i tot a l'absència de resposta.

Si ens fixem en la duració del dolor, es divideix en dos tipus: l'agut i el crònic. El dolor agut és aquell que és causat per un fet específic, com infeccions o lesions. S'entén com a dolor agut la sensació punxant i localitzada en una zona precisa, reversible i de curta durada i que pot empitjorar si no es tracta. Segons Molony i Kent (1997) [22] el dolor agut consisteix en una experiència sensorial aversiva que provoca accions motores de protecció, resultants en la evasió a futur, que poden modificar conductes. Per contra, el dolor crònic és un dolor tissular sever, que és el que determina la duració en el temps del dolor. Dit d'una altra forma, és un dolor amb una localització imprecisa i de duració prolongada per la qual no existeix una adaptació [23].

Per tenir la possibilitat d'avaluar l'existència de dolor s'han d'utilitzar una sèrie d'estratègies. Abans s'ha de remarcar la importància de les diferències en resposta i la percepció del dolor per part de cada animal. Per això de manera general existeixen diferents maneres de quantificar-lo, que involucren l'observació de respostes des de diversos punts d'anàlisi diferents.

- Neurovegetatiu: el dolor genera un increment en la freqüència cardíaca i respiratòria. Malgrat això, no han d'utilitzar-se de manera aïllada, pel fet que poden ser modificats per altres factors no relacionats amb el dolor.
- Neuronal: mesures a través de l'activitat dels nervis aferents i activitats dels nervis del sistema simpàtic. Molt fiable però molt difícil de quantificar.
- Hematològic: mesurables a través de canvis en l'hemograma així com en canvis en la concentració de glucosa i algunes proteïnes en la sang [24], [25]. Molt inespecífic.
- Hormonals: canvis manifestats principalment per l'activació de l'eix hipotàlem-hipòfisis-adrenal (HPA), el que culmina en un augment en la secreció de cortisol o de l'hormona adrenocorticotròpica (ACTH). Aquestes hormones poden ser mesurades en sang, saliva, excrements i en pèls o plomes [26], [26], [27].

- Immunològiques: detectables a través d'una disminució de la capacitat immune de l'animal per fer front a patògens[28]. No obstant això, és molt difícil quantificar aquests canvis, ja que són a mig-llarg termini
- Expressions facials: els etòlegs de Scotland's Rural College (SRUC) [29] han demostrat que hi ha evidències de diferents expressions facials en els animals que pateixen algun tipus de dolor i situacions d'estrès. La Grimace Scale és una escala de dolor definida per a algunes espècies. En ella, s'analitza l'expressió facial que mostra l'animal i es relaciona amb la tipologia de dolor que presenta en l'instant. Tanmateix, la repetibilitat entre observadors és considerada entre mitjana i baixa segons l'expertesa dels investigadors i s'ha testat sovint per procediments que es consideren ja severos, com una castració quirúrgica.
- Conductual: es considera les variacions en l'activitat locomotriu, immobilitat i vocalitzacions [30], [31], així com canvis posturals [26], [32], [33]. Per a la realització d'aquesta prova és necessari conèixer les conductes pròpies de l'espècie, així com aquelles característiques d'un tipus de dolor particular amb la finalitat de limitar la subjectivitat i augmentar la precisió del reconeixement i valoració del dolor en els animals

Tot i que totes les respostes anteriors són indicadores de dolor, és important destacar que qualsevol d'aquestes respostes poden manifestar-se en situacions en les quals es desestabilitzi l'estat de l'animal sense la necessitat de percebre dolor, el que dificulta la mesura científica d'aquest. La mesura combinada de vèries d'aquestes respostes ens dona un resultat més integral i per tant més ajustat del que realment li succeeix a l'animal.

Les pràctiques preventives per a la reducció o absència de malalties i per tant millora del benestar ha sigut mitjançant la utilització de vacunes. Segons l'OIE [34], "la vacunació busca prevenir i controlar l'aparició d'una malaltia i reduir la transmissió de l'agent patogen. La vacunació pot contribuir a la millora de la sanitat animal, el benestar animal, la sostenibilitat de l'agricultura i la reducció de l'ús d'agents antimicrobians en els animals." També s'ha de tenir clara la definició de vacuna. Una vacuna és un biològic que es prepara amb microorganismes morts o atenuats; amb una toxina inactivada produïda pel microorganisme o amb un virus viu atenuat, de manera que no es produeixi la malaltia en un futur. La vacuna és un producte que s'obté a partir d'un microorganisme, que en ser administrada en un organisme sa, fa que el seu cos produeixi defenses

contra aquest. Si en un futur l'animal entrés en contacte amb el microorganisme contra el qual ha estat vacunat, les defenses el protegiran i no contraurà dita malaltia. Tot animal ha de ser protegit contra les malalties mitjançant un programa de vacunació rutinari que es dissenya en funció de les malalties de la granja i la zona, mitjançant el criteri d'un veterinari titulat.

Existeixen diferents vies de subministració de vacunes. Així doncs, pot ser per via oral, intranasal, intravenosa o administrada cap a sota o a través de la pell o cap a un múscul (epicutani, intradèrmic, subcutani, transdèrmic i intramuscular, respectivament). Els dispositius d'agulla-xeringa han estat els mètodes predominants per al lliurament de vacunes i medicaments per als porcs, generalment mitjançant l'administració intramuscular. No obstant això, aquest procediment s'ha considerat potencialment dolorós [35] fet que pot provocar por aguda i crònica [36]. En humans, s'ha demostrat que sistemes alternatius com la injecció intradèrmica sense agulla causen menys dolor i estrès [37], [38]. Altres avantatges de la tecnologia sense agulla respecte a la xeringa d'agulla en la vacunació són la prevenció de les agulles trencades, l'eliminació de fragments d'agulla residuals en les canals porcines [39], la reducció de la transmissió de malalties infeccioses entre animals [40], una administració més ràpida i susceptible de reduir lesions al lloc de la injecció [41], l'ús d'un volum de vacuna inferior en comparació amb la injecció intramuscular [42], una major dispersió de l'antigen [43] i eliminació dels auto-injeccions accidentals de treballadors [44]. Els dispositius intradèrmics sense agulles utilitzen compressió mecànica per forçar el fluid a passar amb una alta pressió a través d'uns petits orificis de diàmetre de 76 µm a 360 µm (en comparació amb 810 µm per a una agulla de calibre 21) que penetren a la pell i al teixit subcutani garantint un procés homogeni on cada animal es vacuna a la profunditat del teixit seleccionat [45].

Actualment, el virus del síndrome respiratori i reproductor porcí (PRRS) és la malaltia que causa el major impacte econòmic en la producció moderna de porcs a nivell mundial [46]. La PRRS es pot transmetre horitzontalment [47], tant per contacte entre truges reproductores [48] com pel semen de mascles reproductors infectats [49]. A més, també per transmissió vertical. És a dir, per transmissió a través de la placenta (transparentaria) de virus procedent de femelles gestants cap als fetus. La transmissió transparentaria pot succeir en qualsevol moment de la gestació, tot i que les infeccions en l'últim terç de la gestació són les que provoquen símptomes més greus en les camades. Les infeccions simultànies amb altres patògens també són molt freqüents. Els porcs en engreix manifesten un quadre respiratori greu, acompanyat de febre, d'inafetència, letargia, i gran retard en el creixement. En les granges reproductores, les femelles infectades tenen una

simptomatologia que es manifesta en avortaments, mortalitat perinatal, fetus momificats i camades dèbils i petites. Aquests problemes reproductius poden persistir durant 4 a 8 mesos abans de tornar a la normalitat. També s'observen coloracions vermelles i blaus en orelles i vulva. A la manifestació de la malaltia s'afegeix una elevada prevalença a malalties secundàries sobretot en el moment d'engreix i creixement. Com a infecció secundària més comunament relacionada amb PRRS es pot trobar infeccions per *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella choleraesuis* entre moltes altres. En el cas dels sementals redueix la qualitat del semen i en lletons lactants incrementa la taxa de mortalitat i els problemes respiratoris. Aquests problemes estan relacionats a infeccions bacterianes, que entre altres efectes, també es relacionen a un guany baix de pes. Els garrins i porcs infectats poden ser asimptomàtics o presentar una simptomatologia semblant a altres malalties que afecten a l'espècie com poden ser la febre porcina clàssica o la pseudoràbia entre d'altres. No obstant això, també pot haver-hi casos d'animals amb PRRS sense simptomatologia visible (asimptomàtics).

Pel fet que els consumidors europeus exigeixen pràctiques els més amigables possibles pels animals, a més dels avantatges descrites anteriorment, s'han desenvolupat vies alternatives a la vacunació intramuscular clàssica, inclosa la PRRS. Concretament, s'ha confirmat l'ús de la vacunació intradèrmica contra la PRRS com a alternativa a la via intramuscular [50]. A més, la vacunació intradèrmica contra el PRRS ha mostrat una millor resposta en alguns paràmetres relacionats amb els indicadors de comportament i estrès en truges gestants [51]. No obstant això, no s'han publicat dades relatives als indicadors de comportament i estrès, així com l'avversió generada per les diferents vies d'administració en garrins.

2. Objectius

L'objectiu d'aquest estudi és comparar l'aplicació d'una vacunació contra PRRS en garrins per dues vies d'administració diferents: intramuscular i intradèrmica sense agulla, per investigar si hi ha diferències en els indicadors de dolor existents, com ara vocalitzacions, per avaluar la resposta d'aversion mitjançant una prova d'aversion, per identificar l'estrès fisiològic mitjançant l'anàlisi del cortisol salival i estudiar els canvis de comportament en les hores posteriors a la vacunació.

3. Metodologia

3.1. Animals i tractaments

Setanta-dos garrins (Landrace × Largewhite) × Pietrain, la meitat mascles i l'altra meitat femelles, dividits en dos lots de 36 animals cadascun, es van utilitzar en el present estudi. L'estudi de cada lot es va separar en un període de 35 dies. Ni els garrins ni les truges havien estat mai vacunats contra el PRRS a la granja d'origen. Els garrins es van distribuir en tres grups segons el tractament de vacunació: 1) Vacunació intramuscular (IM) mitjançant una única injecció intramuscular a la regió del coll amb 2,0 ml d'UNISTRAIN® mitjançant una agulla d'acer inoxidable individual de 21 G x 16 mm ; 2) Vacunació intradèrmica mitjançant una única aplicació intradèrmica sense agulla amb 0,2 ml d'UNISTRAIN® a la regió del coll mitjançant el dispositiu alimentat per bateria; 3) Control, essent el tractament sense vacunar i on només es van tocar garrins a la regió del coll seguint el mateix procediment de manipulació que els porcs dels grups anteriors. La vacunació es va produir quan els garrins tenien 28 dies. UNISTRAIN® PRRS és una vacuna viva PRRS modificada que consisteix en una soca PRRSV1 atenuada (VP-046 BIS 103,5-5,5 CCID50 per dosi) diluïda en PBS. Aquesta vacuna està autoritzada per a porquets i truges per al seu ús per via intramuscular o intradèrmica. Sigui per via intramuscular o intradèrmica, la vacuna es va preparar i utilitzar seguint les recomanacions del fabricant. Abans de la vacunació, es van seleccionar aquests 72 garrins d'un total de 20 camades. Els passos del procediment de selecció de garrins i la seva gestió van ser els següents.

Després del part, es van pesar tots els garrins de 10 truges per lot i se'n van crotalar aleatòriament amb tres possibles colors: verd (IM), taronja (intradèrmic) i blau (Control) per a la distribució del grup de tractament. A més, cada cròtal disposava d'una numeració única per permetre la identificació individual. El pes corporal del garrí en néixer des del primer i segon lot va ser d' $1,5 \pm 0,30$ kg i $1,5 \pm 0,26$ kg, respectivament. No més tard de les 24 hores després del naixement, el ramader va realitzar tots els procediments de gestió als animals que potencialment causaven dolor, com ara la injecció de ferro, l'esmolat de dents i el tall de cua. Així, l'estímul aversiu es va concentrar en el temps i l'estímul negatiu es va estalviar el màxim possible fins al dia de la vacunació. El tall de la cua es va realitzar perquè, segons el ramader de la granja d'origen, ha patit alguns episodis de mossegades de cua en el passat i el transport al centre de recerca de l'IRTA (IRTA Monells, Girona, Espanya) i el canvi d'ambient a 21 dies de vida podrien ser factors de risc importants per a l'aparició

d'aquest comportament redirigit. Per tant, es va decidir permetre el tall de cues però sempre deixant-hi dos terços d'ella. Durant la lactància, es va observar alguna mossegada de l'orella, però no de la cua. La injecció de ferro es va realitzar al pernil per deixar el coll lliure per a la vacunació PRRS. Als 11 dies d'edat, es van socialitzar els garrins per optimitzar una relació entre els humans i els animals i maximitzar la comoditat dels garrins envers els humans abans del dia de la vacunació. Aquesta socialització la realitzaven dos investigadors cada dia fins al transport en ambdós lots (és a dir, dies 11, 12, 14, 15, 18, 19 i 20 d'edat). La socialització va consistir en apropar-se suaument als animals per comprovar el seu comportament davant la presència humana i entrenar-los per a ser alimentats amb llet maternitzada fent ús de biberons. Després del dia 15, cinc de les deu camades seleccionades inicialment per lot van ser descartades per a l'estudi. El criteri de descart va ser la falta d'uniformitat, la reacció temerosa de la truja o dels garrins envers els humans malgrat la socialització, la manca d'almenys tres bons candidats de cada tractament en termes de bona salut i estat corporal o un grup massa desequilibrat amb relació al seu sexe (mascles i femelles).

Quan els garrins tenien 20 dies d'edat, es van seleccionar nou animals per camada ($n = 45$) segons els mateixos criteris prèviament esmentats i es van pesar individualment (control: $5,6 \pm 1,44$ kg; IM: $5,9 \pm 1,16$ kg; intradèrmic: $5,8 \pm 1,18$ kg). Cada grup estava compost per mascles i femelles per igual. Als 21 dies d'edat, els garrins van ser transportats durant 3h (200 km) des de la granja d'origen fins al centre de recerca de l'IRTA on es va dur a terme l'estudi. Els porquets es van assignar al camió en diferents compartiments segons la camada per evitar barrejar-se i barallar-se. Aquests grups d'origen també es van mantenir a la destinació i durant tot l'estudi per la mateixa raó. Quatre d'aquestes cinc camades de cada lot es van seleccionar com a grups principals de l'estudi, mentre que el cinquè va formar part d'un grup de reserva i els seus animals només van ser utilitzats en cas que s'hagués de substituir algun garrí seleccionat abans de la vacunació. A l'arribada, els garrins es van assignar a cinc corrals de $2,80 \text{ m} \times 2,40 \text{ m}$ ($6,72 \text{ m}^2$), amb slat en làmines de plàstic 100%, tres tipus diferents de material d'enriquiment (boles, plàstics i cordes), dos alimentadors independents amb espai per a almenys dos garrins cadascun i dos abeuradors (Figura 1). Els mateixos dos investigadors que van socialitzar els garrins a la granja d'origen van ser els responsables de la seva recepció i els van alimentar amb biberó de llet maternitzada per reduir l'estrès dels garrins i evitar comportaments anòmals, com ara mossegades de cua o orelles, que podrien causar dolor i lesions.



Figura 1. Corral emprat per a l'allotjament dels garrins durant l'estudi

La distribució dels animals dins del corral es va fer de forma tal que assegurés que hi havia 3 animals de cada tractament dins d'un mateix corral. És a dir, tres de color blau, tres de color verd i tres de color taronja. Cal dir que en el cinquè corral del trial 1 hi havia 12 animals més amb la mateixa distribució i en el cinquè corral del trial 2 hi havia 8 animals més amb la mateixa distribució. En el trial 2 es va decidir tenir menys animals en el corral 5 perquè aquests eren els de reserva per si passava alguna cosa amb els porcs dels 4 corrals titulars i es va veure durant el trial 1 que no eren necessaris tants animals.

3.2. Test d'aversió

El test d'aversió, consisteix en avaluar fins a quin punt un animal ha viscut una experiència prèvia com aversiva. Per dur-ho a terme, s'entrena a l'animal a fer un circuit concret i un cop entrenat s'ha d'aplicar l'estímul que es vol estudiar al final d'aquest circuit [52]. Si la següent vegada que l'animal torna a fer el circuit, els temps en fer-lo augmenten en relació amb ell mateix o a altres animals que no hagin rebut l'estímul a estudiar i que hagin passat el mateix dia que l'animal a estudi (grup control), vol dir que l'estímul ha causat aversió a l'animal. En cas contrari, vol dir que l'estímul no ha sigut considerat prou negatiu per l'animal que segueixi fent els temps que ja feia durant els entrenaments. Aquesta és la metodologia que es va fer servir en el present estudi, la qual es divideix en dues fases ben diferenciades.

En primer lloc hi ha la fase d'entrenament, que va començar el dia -6 abans de la vacuna (Figura 2). Aquesta consistia a acostumar els animals al circuit realitzant un total d'1 a 2 sessions diàries fins que s'aconseguia que els animals fessin el circuit en un temps estable i inferior als 10 segons. Com que el temps fins al dia de la vacuna era molt just i els animals necessiten algun tipus d'al·licient per voler arribar al final del circuit, que seria el punt on s'aplicaria la vacuna, es va decidir de proporcionar-los un premi en forma de biberó amb llet maternitzada al final del circuit. El circuit, per altra banda, consistia en una plataforma elevada del terra 1,20 metres, amb una llargada de 4 metres i una amplada de 30 cm de parets exteriors i de 20 cm de parets interiors (l'amplada disponible pel porc), fet amb el mateix terra tipus slat de plàstic verd que tenien els animals als corrals d'origen i parets opaques a ambdós costats per evitar que els animals es distraguessin o sortissin del circuit amb una alçada de 40 cm. Els animals eren traslladats en braços del corral d'origen fins a l'inici del circuit, on hi havia una comporta que permetia retenir l'animal fins que la persona encarregada de registrar els temps en fer el circuit estava preparada. Quan això succeïa, s'aixecava la comporta i el porc era lliure d'avançar fins al final del circuit (Fig. 2).

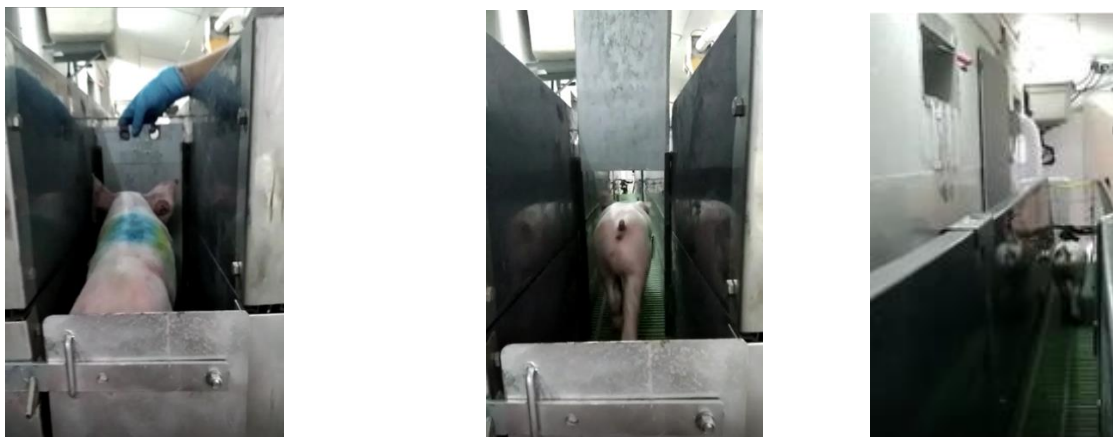


Figura 2. Porc en diferents posicions dins del circuit de 4 metres de longitud on es feia el test d'aversió. A la foto de l'esquerra l'animal encara no ha pogut començar a caminar perquè se li barra el pas, a la del centre ha començat a caminar fa poc i en la de la dreta està a punt d'arribar al final del circuit.

La persona encarregada de vacunar els animals era l'encarregada de donar-los el premi, en forma de biberó durant varis segons. El procediment consistia a esperar que el porc arribés a la marca del final del circuit just als 4 m des del punt d'inici i en aquell moment subjectar-los suaument, donar-li un copet a la zona del coll per simular el tractament que rebria el grup control el dia de la vacuna i acostumar-los al moviment i al contacte amb els tècnics per intentar aïllar com a efecte de novetat només l'administració de la vacuna com a tal. En acabat aquest contacte, la mateixa persona els donava el premi en forma de llet maternitzada en biberó durant un temps màxim de trenta segons. En els primers entrenaments el premi es donava de forma immediata després del cop, mentre que a mesura que ens acostàvem al dia de la vacunació s'anava allargant el temps d'espera fins als 10 s del dia de la vacuna per tenir prou imatges pel test d'expressions facials que s'explicarà més endavant. Per la mateixa finalitat i per evitar factors de novetat, durant els entrenaments els animals ja se'ls acostumava a tenir càmeres i gravadores uns 30 cm després del final del circuit (és a dir, a uns 30 cm del punt de vacunació); Figura. 3



Figura 3. Finestra al final del circuit on es feia la vacunació i se'ls donava el premi amb biberó i detall de les càmeres i gravadores per obtenció d'expressions facials i vocalitzacions.

Per poder seguir sempre el mateix ordre d'entrenament de cada animal dins dels corrals es van procedir a marcar amb esprais de tres colors diferents, vermell, blau i verd. Així, hi havia un animal de cada tractament marcat amb cada un d'aquests colors i l'ordre de passada per circuit dels animals durant els 14 entrenaments que es van fer abans del dia de la vacuna va ser en tots els casos el que es mostra en la Figura 4.

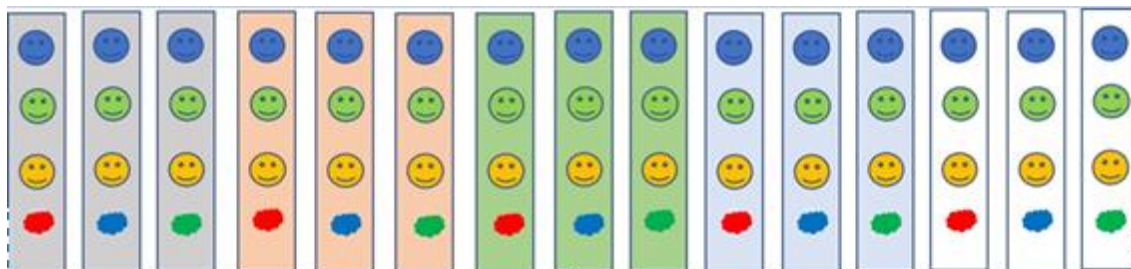


Figura 4. Ordre d'entrada dels animals al circuit, on el color gris es corral 1, el color taronja el corral 2, el color verdós el corral 3, el color blau cel el corral 4 i el color blanc el corral 5, el color de les icones mostra el color del cròtal dels animals i el color sota de les icones el color d'esprai amb el que estaven pintats els animals.

Els temps mitjos en recórrer els 4 m durant la primera sessió d'entrenament eren superiors als 20 s, tot i que hi havia animals que transcorreguts més de 2 min no havien aconseguit avançar fins al punt final del circuit. En les primeres sessions aquests animals no es van descartar, però

transcorregudes 4 sessions d'entrenament, aquells que mostraven por o no aconseguien acostumar-se al circuit (2 al primer trial i 1 al segon trial), es van retirar de l'estudi. Els temps mitjos en la sessió d'entrenament 12 (l'última) era de 5 s i es van rebutjar els animals que van superar els 10 s en les últimes sessions. Així, en global, i tenint en compte les dues causes per descartar animals, van ser quatre porcs del trial 1 i dos animals del trial 2, en total, els que van ser retirats de tot l'estudi per no haver aconseguit bons resultats en els entrenaments al circuit del test d'aversió. Per aquest motiu, sis animals dels 20 extres que s'havien reclutat inicialment es van fer servir finalment per l'estudi.

La segona fase del test d'aversió es va produir el dia de la vacuna i els dies posteriors. És a dir, un cop els animals estaven entrenats, el dia 0 es va aplicar l'estímul aversiu que es pretenia estudiar, en aquest cas la vacunació amb els diferents tractaments. Deu minuts després de la vacuna, els animals tornaven a passar pel circuit i la diferència de temps entre la primera sessió i la segona, determinaria el grau d'aversió que havien experimentat els animals a la vacunació, sempre tenint en compte que això ho havien de confrontar contra l'experiència positiva de rebre el premi de 30 segons d'un biberó amb llet. Dues hores després de la vacunació aquest procediment es va repetir per avaluar l'efecte memòria que pogués tenir en els animals la vacunació. L'ordre de treball amb els animals va ser el que s'indica en la Figura 5. Llavors el test es va tornar a repetir a les 24, 48 i 72 hores.

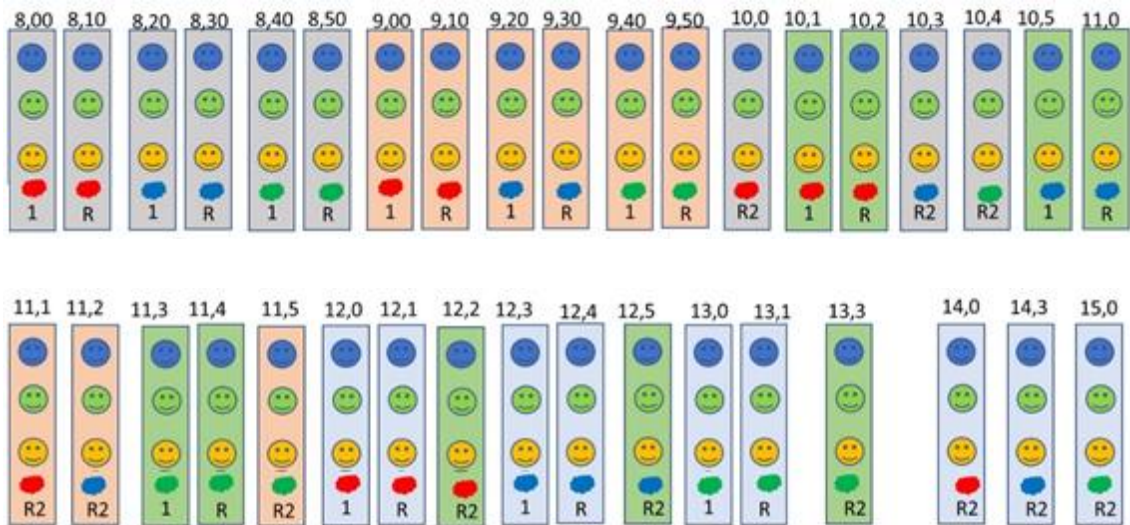


Figura 5. Ordre en la que els animals van fer el circuit pel test d'aversió el dia de la vacuna. On 1 es el moment de la vacunació, R la repetició o test d'aversió als 10 minuts de la vacunació i R2 la repetició a les 2 hores de la vacuna. Els rectangles grisos, marrons, verds i blau cels corresponen als animals dels corrals 1, 2, 3 i 4, respectivament

3.3. Vocalitzacions

Les vocalitzacions dels animals en el moment de la vacunació es gravaven amb dos dispositius. El primer, un sonòmetre, que registrava la intensitat màxima del so, mesurada en dB. El segon, mitjançant gravadora estàndard de veu, es feia servir per analitzar la freqüència en Hz del so. En ambdós casos, la gravadora i el sonòmetre es trobaven a uns 30 cm de la cara de l'animal en el moment en el qual se li aplicava la vacuna (Fig. 6) i pel seu anàlisi es delimitava mitjançant senyals sonors l'interval de temps en què s'havien d'analitzar aquelles vocalitzacions provocades pel procés experimental i fora de factors aliens a aquest. Les vocalitzacions es varen caracteritzar per la seva duració i per la freqüència (Hz) del so amb l'amplitud més elevada, també coneguda com a freqüència de pic. Per tal de determinar el valor d'aquesta freqüència es va processar el senyal capturat mitjançant la tècnica coneguda com la transformada de Fourier. Aquesta tècnica permet determinar de quines freqüències està formada el senyal i la seva amplitud. Per a cada vacunació es va determinar de forma manual el moment d'inici i finalització de la vocalització, cosa que va permetre calcular la duració. En el cas de detectar pauses durant la vocalització, normalment associades a la respiració de l'animal, es varen analitzar com a vocalitzacions diferents, tal com indiquen alguns dels treballs consultats [53]. De forma prèvia a qualsevol anàlisi, el senyal es va filtrar mitjançant un filtre que eliminava el soroll existent a freqüències inferiors a 100 Hz. A continuació, cada segment de senyal corresponent a una vocalització va ser tractat prèviament amb una finestra Hamming per minimitzar les possibles distorsions a l'inici i final del senyal, abans de l'anàlisi amb la transformada de Fourier. Al mateix temps, s'estaven prenent imatges dels animals que es faran servir per registrar expressions facials i els resultats del qual no formen part d'aquest informe.

3.4. Cortisol en saliva

Per determinar el grau de la resposta d'estrès dels animals al procés de la punxada es va fer servir la concentració de cortisol en saliva. Aquesta mostra es va prendre en tres moments durant l'estudi. La primera va ser el dia abans de la vacunació, just abans de la primera repetició (R) de la Figura 5 (mostra basal), és a dir 10 min després d'haver fet l'entrenament 11 i just abans de fer l'entrenament 12. La segona va ser el dia de la vacuna en el mateix moment que el dia anterior (mostra 10 min després de la vacuna) i finalment 2 h després de la vacuna, just abans del R2 de la Figura 5. En aquest informe només es presenten resultats de les mostres basals i de 10 min després de la vacuna.

La mostra de saliva es va prendre individualment amb l'ajut d'un tros d'esponja sense excedir en cap cas els 4 min de temps d'extracció i ho feien tres persones en paral·lel per evitar que s'excedissin aquests temps (Figura 6). Un cop presa la mostra, l'esponja es va centrifugar durant 10 min a 3500 rpm per extreure tota la saliva i posteriorment es congelava a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins a la seva determinació mitjançant la tècnica d'ELISA.



Figura 6. Obtenció de saliva per a determinació de cortisol

3.5. Activitat general dels animals

L'activitat general dels animals es va avaluar mitjançant les tècniques de scan i focal sampling [54] durant tres dies consecutius, el dia abans de la vacunació (com a mostra control), el dia de la vacunació i el dia posterior a la vacunació. En tots els casos s'havia de fer en un moment en què no hi hagués cap maneig sobre els animals, i per això es van limitar les observacions de les 16:00h a les 20:00h. L'scan sampling consisteix en classificar tots els animals d'un corral determinat dins d'un dels comportaments a estudiar en un moment concret que es coneix com a scan i que actua com una fotografia de la situació. La repetició de diferents scans a un interval de temps pre-fixat serveix per fer el seguiment de conductes amb llarga durada i poca freqüència de canvis. En aquest cas, es va fer un scan de tots els animals de tots els corrals avaluats un cop cada deu minuts entre les 16:00h i les 20:00h. Els comportaments avaluats durant els scans es mostren a la Taula 1.

Taula 1. Activitats que es van considerar durant els scan samplings.

Comportament	Definició
Tombat esternal	Animal tombat sobre la seva panxa
Tombat sobre dreta	Animal tombat lateralment sobre el costat dret
Tombat sobre l'esquerra	Animal tombat lateralment sobre el costat esquerra
Rascar-se	L'animal es rasca amb alguna part del corral.
Explorar	Animal ensumant o tocant amb el morro qualsevol zona del corral excepte menjar o aigua
Social	Quan l'individu que s'està avaluant busca contacte social amb un altre animal amb el morro
Menjant	Animal menjant
Animal caminant	Animal que es desplaça pel corral sense fer cap dels comportaments descrits anteriorment
Assegut	Animal assegut que no fa cap dels comportaments descrits anteriorment
Dempeus	Animal dempeus, quiet, que no fa cap dels comportaments descrits anteriorment
Altres	Qualsevol conducta no descrita anteriorment

En total, pels scan samplings es van obtenir un total de 5.400 registres. Per altra banda, en el cas del focal sampling, el que es fa és seguir a un animal durant un temps prefixat i descriure tots aquells comportaments d'interès. Aquesta tècnica serveix per detectar aquelles conductes que tenen una curta durada o alta freqüència de canvi que amb un scan es poden escapar, per atzar, més fàcilment. Per dur-ho terme, cada un dels animals de l'estudi es va seguir durant 4 min seguint el mateix ordre que es fa servir pel test d'aversió. Es a dir, les observacions es feien en blocs de 4 animals consecutius on entrava un animal de cada tractament (Figura 7).

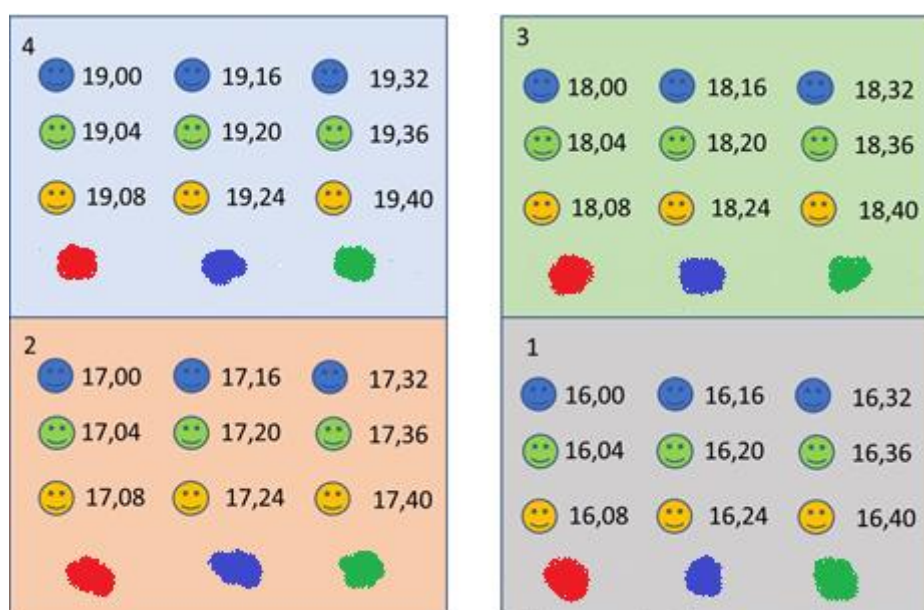


Figura 7. Horari en la que es feien els focals en cada un dels corrals per animal el dia abans de la vacuna, el dia de la vacuna i després de la vacuna.

A continuació, la informació recollida, que suposaven 24 hores de gravacions, es passaven al full de registre per ser analitzats estadísticament.

3.6. Reaccions a la vacuna

Abans de la vacunació, al cap de 10 minuts de la vacunació, a les 2h, 8h, 24h, 48h i 72 h de la vacunació es va avaluar en tots els animals les possibles reaccions a la vacuna en la zona d'aplicació d'aquesta al coll segons el qual s'indica a la Taula 2. Tota aquella reacció que necessitava confirmació per palpació es palpava (com la pàpula, la inflamació o el nòdul).

Taula 2. Reaccions locals a la vacuna

Reaccions locals

Pàpula	P	Absència presència i mida en cm
Inflació	I	Absència presència i mida en cm
Zona envermellida	V	Absència presència i mida en cm
Úlcera	U	Absència presència i mida en cm
Crosta	C	Absència presència i mida en cm
Nòdul	N	Absència presència i mida en cm
Sang	S	Absència presència

3.7. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es va fer amb el paquet Statistical Analysis System (SAS). Les variables que eren normals es van analitzar amb el proc mixed i les no normals amb models generals, proc glimmix o proc genmod. En el cas de les dades del test d'aversion, les dades van ser sotmeses a una distribució de Poisson on es va avaluar l'efecte tractament en els diferents moments on es feia el test i l'efecte moment (comparació entre ells) amb mesures repetides i l'animal com a factor aleatori. En el cas de les vocalitzacions, els Db màxims registrats en el moment de la vacuna es va analitzar mitjançant distribució normal estudiant un possible efecte tractament. A més, es va fer servir una distribució binomial indicant només si les vocalitzacions superen o no els 90 dB en un primer anàlisi i els 100 dB en un segon anàlisi per estudiar-ne un efecte tractament. En el cas del cortisol en saliva es va comparar les mitjanes entre els moments (basal i 10min) segons tractament. Per altra banda, també es va analitzar a nivell de corral. En el cas de les dades dels scans, cada activitat es va estudiar per separat amb una distribució binomial (és a dir, activitat present a l'scan, 1; activitat absent a l'scan, 0), per estudiar un possible efecte tractament. Les reaccions a les vacunes es van estudiar amb una distribució binomial (presència, absència) amb relació als diferents moments en què es va avaluar (vacuna, 10m, 2h, 8h, 24h, 48h i 72h) per estudiar un possible efecte tractament. Finalment, els anticossos es van analitzar amb el proc mixed. Les diferències estadísticament significatives es va fixar en tots els casos en $P < 0,05$.

4. Resultats i discussió

4.1. Test d'aversió

Tal com havia passat en els últims entrenaments, el temps que tardaven els animals a recórrer els 4 metres del circuit abans de la vacunació era inferior als 5 s. Quan es van avaluar la primera passada (basal, just abans de la vacuna), al cap de 10 min de la vacunació, a les 2 h, a les 24 h, a les 48 h i a les 72 h, només es va trobar un efecte significatiu en el temps registrat just als 10 minuts de la vacuna ($P < 0,001$), el moment en què l'experiència de la vacunació era més propera per l'animal (Figura 8) i on, com es pot veure a la figura, només els animals vacunats intramuscularment van mostrar un augment de temps significatiu respecte als temps registrats anteriorment. A les 2 h de la vacunació, tot i que l'aversió no es pot dir que desaparegués completament, ja no hi ha cap efecte significatiu ($P = 0,232$) i la manca d'un efecte significatiu es manté a les 24 h després de la vacuna ($P = 0,213$), a les 48 h després de la vacuna ($P = 0,403$) i a les 72 h després de la vacuna ($P = 0,210$). Lògicament, en el moment basal tampoc hi va haver cap efecte significatiu ($P = 0,914$).

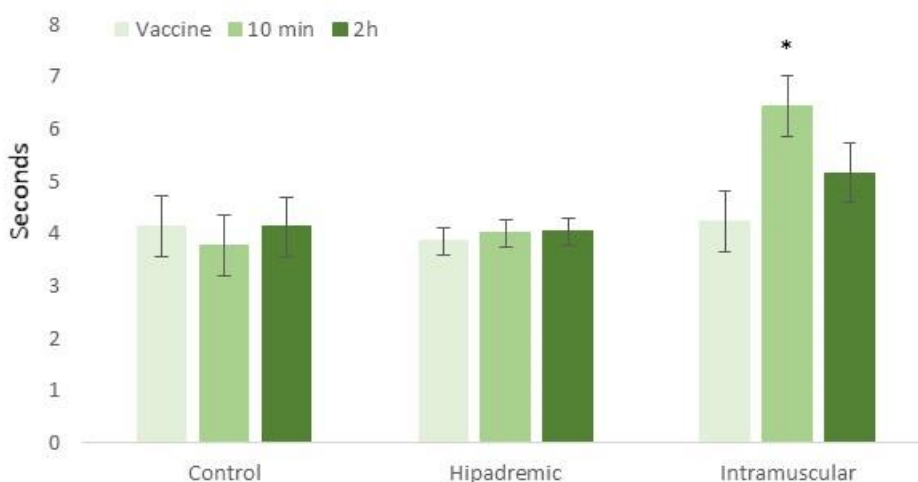


Figura 8. Temps en segons que tarden els animals en recórrer els 4 metres del circuit del test d'aversió el dia 0 just abans de la vacuna, als 10 minuts i a les 2 hores pels tres tractaments de l'estudi, control, intradèrmic i intramuscular. *, significa diferències significatives a $P > 0.01$

Els resultats ens indiquen per tant que la injecció intramuscular és més aversiva que la injecció intradèrmica.

4.2. Vocalitzacions

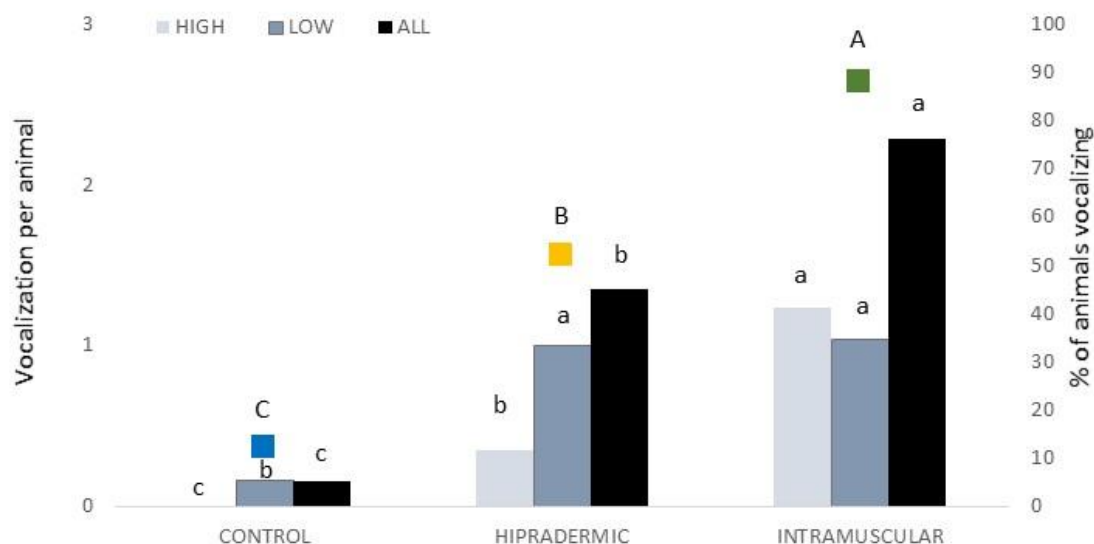


Figura 9. En barres i associat a l'eix de l'esquerre es mostra el número de vocalitzacions per animal en el cas d'altres freqüències de pic (> 1000 Hz), baixes freqüències de pic (< 1000 Hz) i el total (suma de les dues) segons el tractament. En punts i associat a l'eix de la dreta es mostren el percentatge d'animals amb vocalitzacions detectades durant l'anàlisi dels registres. En tots els casos es mostren les diferències per tractaments (control, intradèrmic i intramuscular), on una lletra diferent dins de cada categoria de variable (altres, baixes, totals i %) indiquen diferències significatives a $P > 0,05$.

Així, mateix, els intradèrmics tenien menys tendència a vocalitzar (52%, $P < 0,05$) que els IM (88%). Pel que fa al número de vocalitzacions, els animals control (amb 0,16 vocalitzacions per animal) també van tenir menys vocalitzacions ($P < 0,05$) a tots els altres tractaments, i l'intradèrmic (amb 1,35 vocalitzacions per animal) va tenir menys vocalitzacions ($P < 0,05$) que els animals punxats IM (2,28).

No obstant, segons la bibliografia, les vocalitzacions es poden dividir en alta freqüència de pic (> 1000 Hz) i de baixa freqüència de pic (< 1000 Hz), considerant-se les d'alta freqüència com més indicadores de dolor o por, que les de baixa [53]. En aquest cas, de les 129 vocalitzacions registrades, 57 es classificarien d'alta freqüència i 72 com de baixa freqüència. Les d'alta freqüència no es van donar en cap cas en el tractament control, i va haver-hi un efecte significatiu ($P = 0,018$) entre el tractament intradèrmic (amb 0,35 vocalitzacions d'alta intensitat per animal) i el tractament IM (amb 1,24 vocalitzacions d'alta intensitat per animal) tal com es mostra en Figura. 14. En el cas de les vocalitzacions de menys de 1000 Hz, hi va haver diferències significatives entre el tractament control (amb 0,16 vocalitzacions per animal) amb els intradèrmics (amb 1,00 vocalitzacions per animal) i els IM (amb 1,04 vocalitzacions per animal).

Pel que fa els valors de freqüència dels pics mitjos al que s'arribava en cada tractament, no hi ha cap efecte significatiu quan es tenien en compte totes en global ($P = 0,289$), però quan es tenien en compte només les superiors a 1000 Hz, hi havia un efecte tractament ($P = 0,0004$), les del tractament intradèrmic (4650 ± 783 Hz, $n = 9$) essent més altes que les IM (2659 ± 205 Hz, $n = 32$), principalment degut al fet que les deu freqüències més altes registrades, cinc corresponien a animals del tractament intradèrmic, essent un total de 3 animals diferents. Per altra banda, en el cas de les freqüències per sota de 1000 Hz no va haver-hi cap diferència entre tractaments ($P = 0,859$), estan en 420 ± 22 Hz ($n = 4$), 422 ± 53 Hz ($n = 22$) i 429 ± 14 Hz ($n = 25$) el control, intradèrmic i IM, respectivament.

Respecte a la duració de les vocalitzacions, no hi ha cap efecte significatiu quan es tenien en compte totes en global ($P = 0,935$), només les de més de 1000 Hz ($P = 0,746$), o les baixes ($P = 0,905$). De mitjana les vocalitzacions tenien una durada de 425 ± 0 ms (amb un rang de 104 ms a 1416 ms).

Sobre els nivells de pressió sonora dels crits, mesurades en dB amb el sonòmetre a 30 cm de la boca de l'animal en el moment de la vacuna o del contacte en el cas del grup control, hi ha un efecte tractament en els db totals ($P < 0,001$), el control essent significativament més baix que els altres (70 ± 2 dB) i l'intramuscular sent també significativament més alt (89 ± 2 dB) que l'intradèrmic (Fig. 10).

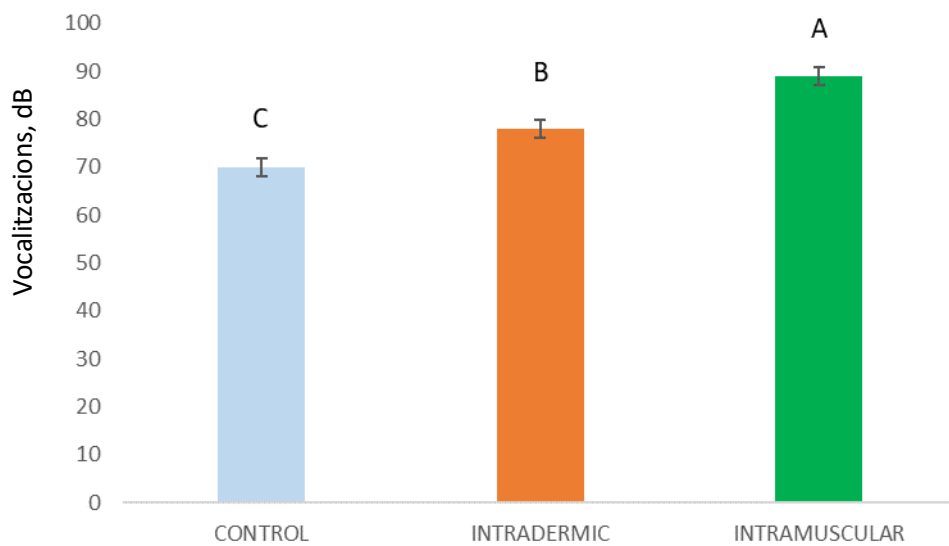


Figura 10. Nivell de soroll mig detectat en el moment de la vacunació o contacte en el cas del grup control per als tres tractaments de l'estudi. Una lletra diferent entre tractaments indica diferències significatives a $P < 0,01$.

Si es considera com a referència de sorolls molestos els superiors a 85 dB i que els animals que vocalitzen de forma més clara, els del tractament verd, tenen una mitjana de 90 dB, es pot concloure d'acord amb aquesta mesura i independentment de les analitzades anteriorment, que les vocalitzacions són clarament més freqüents en aquest tractament que en la resta. Tanmateix, si s'agafa com a referència aquest valor de 90 dB i l'estadística s'orienta en quin percentatge d'animals superen aquests dB per cada tractament, l'efecte tractament que es troba ($P = 0,011$) és que els control i els intradèrmics estan per sota dels vacunats intramusculars. Això no obstant, si es consideren les vocalitzacions només per sobre dels 100 dB, només els intramusculars són diferents dels altres dos tractaments (Figura 11).

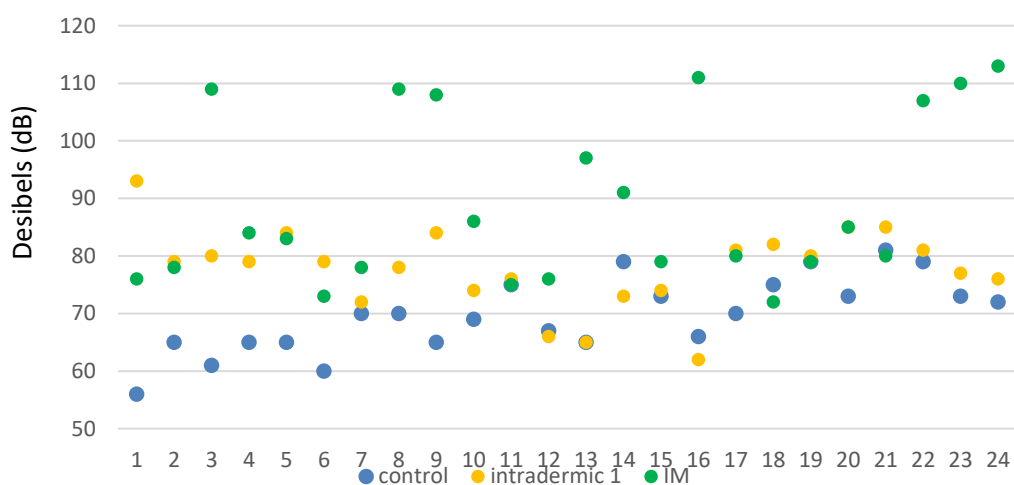


Figura 11. Nivell màxim de pressió del so (dB) emès pels garrins de cada tractament (blau: grup control; taronja: intradèrmic; verd: intramuscular (IM) en el moment de la vacunació.

En tot cas, és evident que els animals criden una mica més en el tractament IM que en el tractament intradèrmic i, aquests, a la vegada, més que en el grup control.

4.3. Cortisol en saliva

El cortisol indica si el factor d'estrès que suposa la punxada ha estat prou important per a produir una resposta prou continuada de secreció d'adrenalina que necessiti una aportació extra d'energia a través del cortisol a l'animal. Ni la mostra basal ($P = 0,987$), ni la mostra del dia de la vacuna 10 min després d'aquesta ($P = 0,998$), no dona resultats significatius pel tractament (Fig. 12).

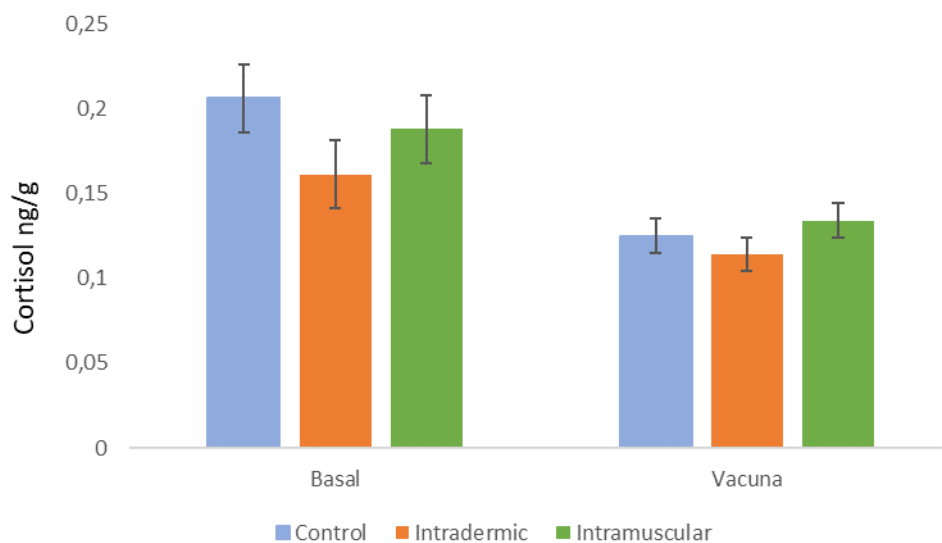


Figura 12. Concentració de cortisol en saliva el dia abans (basal) a la mateixa hora que es va fer el dia de la vacuna i 10 minuts després de la vacuna (vacuna) pels tres tractaments de l'estudi.

Curiosament, els resultats surten més alts en la mostra basal que 10 minuts després de la vacuna. Això pot ser degut al fet que el dia abans de la vacunació el procés d'extracció de la saliva fos més lent i alguns animals ja comencessin a mostrar l'efecte del maneig en la mostra de saliva que s'estava prenent. Un factor que podria confirmar aquesta hipòtesi és el fet que l'error estàndard en els animals en el mostreig basal és de l'ordre del doble que el dia de la vacuna, el que indica una major variació individual. El dia de la vacuna, per contra, l'investigador principal estava controlant que els animals no estiguessin manipulats durant més de 4 min per extraure la mostra de saliva per evitar aquest efecte potencial.

Per altra banda, quan els valors es tenen en compte en global, hi ha un petit efecte del cicle circadiari a escala numèrica (els primers corrals del trial 1 i 2 estan a 0,14 i 0,16 ng/g de cortisol en saliva, mentre que la resta estan entre 0,11 i 0,12). No obstant això, aquest efecte no és estadísticament significatiu ($P = 0,980$), i com es pot veure en la Figura 13, no sembla tenir cap efecte efectiu en els resultats trobats.

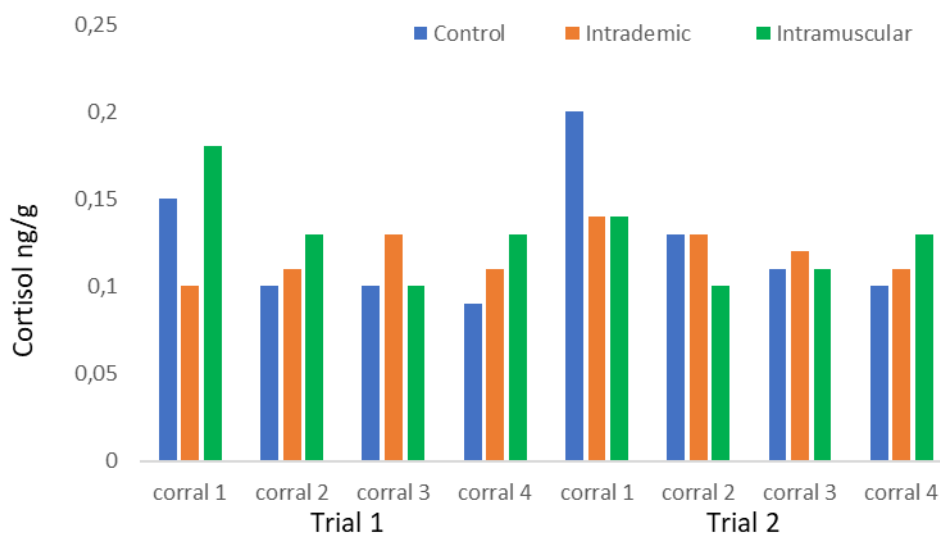


Figura 13. Concentració de cortisol en saliva en relació al corral i trial de l'estudi pels tres tractaments. Cada barra és el resultat de la mitja dels tres porcs per tractament que hi havia a cada corral.

En definitiva, encara que pogués haver un efecte circadiari en el cortisol analitzat, no té un impacte important en els resultats obtinguts. Per altra banda, en base als resultats trobats en altres seccions, s'esperaria que els grups control fossin el tractament amb els valors mínims a tots els corrals i això es dona només en tres corrals de vuit. Per altra banda, el tractament intramuscular hauria de ser el que tingués els pics més alts en tots els corrals, i això es dona en només 4 corrals del 8 analitzats. Dit d'una altra forma, tot i que les injeccions han demostrat tenir un efecte de dolor agut amb relació a les vocalitzacions i generen un record negatiu en els animals transcorreguts 10 min de l'experiència que ja no és significatiu a les 2 h, no genera una resposta d'estrès suficient com perquè es vegin afectades les concentracions de cortisol, és a dir, la mobilització d'energia a l'individu, que en aquests animals concrets es veia més afectada per altres factors diferents a l'estudiat.

4.4. Activitat general dels animals

L'activitat dels animals es va avaluar durant tres dies consecutius durant 4 h a la tarda cada dia (de les 16:00h a les 20:00h). Es van fer servir dues metodologies, l'scan sampling, que serveix per analitzar conductes generals dels animals i el focal sampling, que pot servir per conductes molt menys freqüents, com orinar o rascar-se. Quant als resultats de l'scan sampling, el que es troba és que el dia previ a la vacunació el nombre d'animals tombats en global, independentment de la posició, no és diferent entre tractaments (mostrant el mateix nivell d'activitat) i el costat en què es jeien els animals quan estaven en posició lateral tampoc, per això la troballa no té massa rellevància per l'objectiu de l'estudi.

El mateix dia de la vacunació, per altra banda, es veu un efecte molt clar d'un augment dels animals tombats sobre el costat dret ($P < 0,05$) en tots els animals vacunats en comparació al grup control (Fig. 14). Finalment, el dia posterior a la vacunació, hi ha un efecte significatiu en el nombre total d'animals tombats ($P < 0,01$), on els intradèrmics són significativament més alts (Fig. 15), i en els animals tombats sobre el costat esquerre ($P < 0,05$), on els intradèrmics estan per sobre dels control però sense diferències estadísticament significatives sobre els IM ($P > 0,05$).

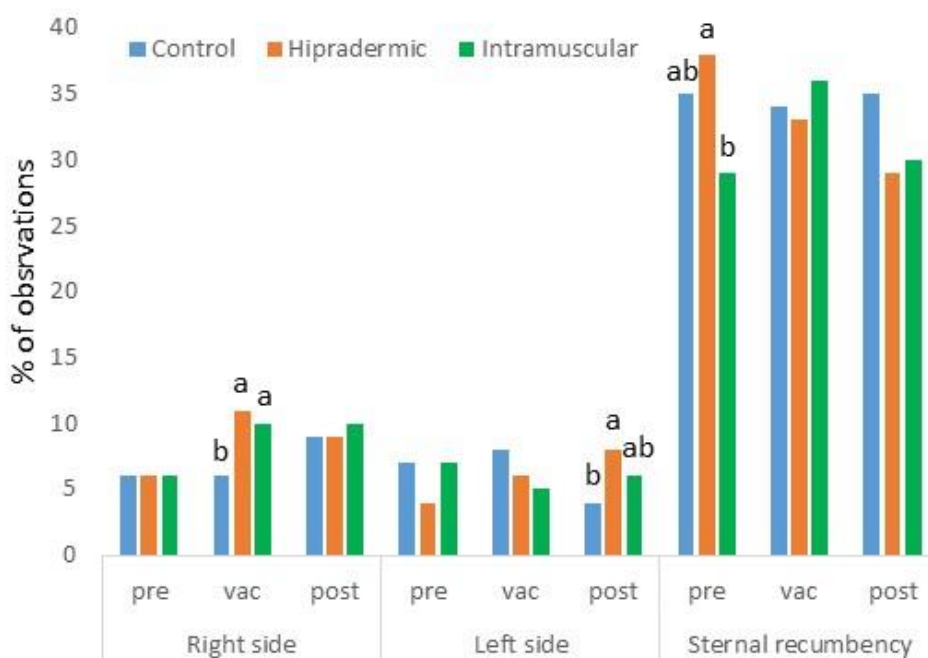


Figura 14. Percentatge del temps que els animals van dedicar a estar tombats del costat dret, dels costat esquerre o esternalment el dia abans de la vacuna (pre), el dia de la vacuna (vac) i el dia després de la vacuna (post) en els tres tractaments de l'estudi mitjançant l'anàlisi d'escans samplings. Una lletra diferent entre diferents tractaments indica diferències significatives a $P < 0,05$.

És a dir, del total d'activitat observada, essent les més importants i freqüents, explorar, menjar, o conducta social, només es veuen diferències en les conductes de tornar-se (Fig. 20). Altres activitats registrades, com ara caminar, rascar-se, estar assegut, estar dempeus sense moure's suposaven menys del 3% del total del temps dedicat a qualsevol activitat i tampoc presentaven cap efecte significatiu.

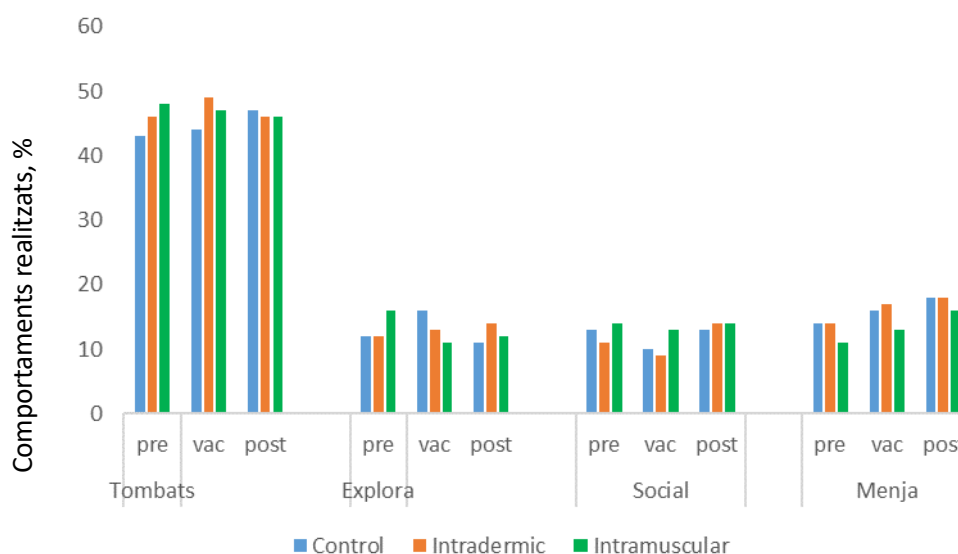


Figura 15. Percentatge del temps que els animals van dedicar a estar tombats, explorant, tenint conductes socials o menjant el dia abans de la vacuna (pre), el dia de la vacuna (vac) i el dia després de la vacuna (post) en els tres tractaments de l'estudi mitjançant l'anàlisi d'scans samplings. Una lletra diferent entre diferents tractaments indica diferències significatives a $P < 0,05$.

Pel que fa els resultats dels focals, que serveixen per mesures molt menys freqüents no es troben diferències significatives en cap dels paràmetres analitzats excepte el d'estar asseguts, on el dia de la vacuna els animals del tractament IM estan menys temps en aquesta posició que en qualsevol dels altres tractaments (Fig. 16), però aquest és un resultat amb poca incidència biològica. Així mateix, els focals van permetre distingir entre conductes socials positives (l'animal que rep l'acció no reacciona negativament) de conductes socials negatives (l'animal que rep l'acció reacciona fugint o encarrant-se), sense que hi hagués tampoc diferències significatives als temps dedicats a cada activitat entre tractaments (Fig. 16).

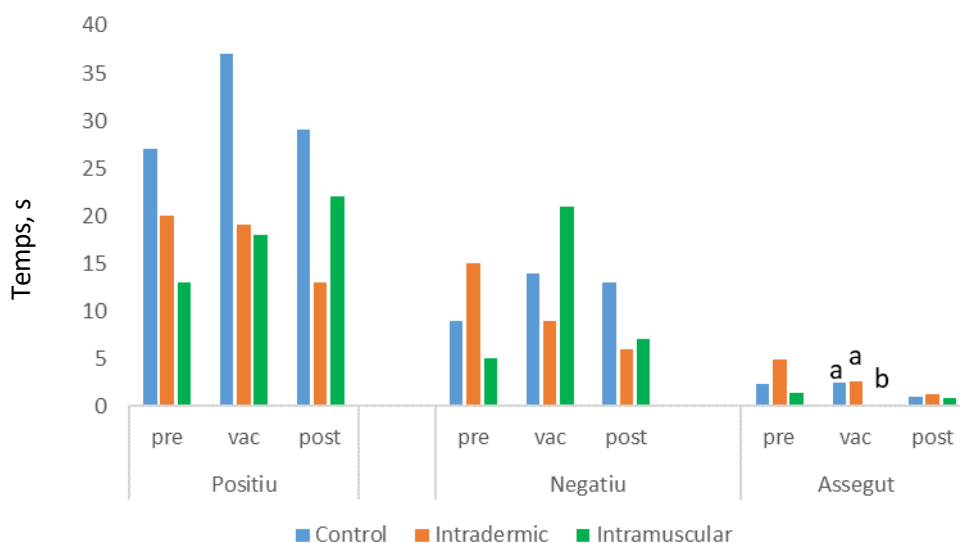


Figura 16. Temps mitjos dedicats dins de cada focal sampling a estar realitzant conductes socials positives, negatives o asseguts en els tres tractaments de l'estudi. Una lletra diferent entre diferents tractaments indica diferències significatives a $P < 0,05$.

En definitiva, el dia de la vacuna els animals vacunats amb qualsevol dels dos tractaments de vacuna busquen tombar-se més sobre el costat de la vacuna que els animals control, ja sigui per buscar el fred del terra per alleugerir una possible inflamació o per protegir la zona del contacte amb altres animals, el que indicaria que la zona està dolorida en un grau similar. El dia després de la vacuna es veu com l'efecte sobre el costat dret ha desaparegut, desplaçant-se l'efecte costat cap a l'esquerre, on els animals vacunats amb sistema intradèrmics semblen optar per deixar la zona vacunada en contacte amb l'aire i evitar el contacte amb el terra. Amb tot, els animals vacunats IM el dia la vacuna estan menys estona asseguts que qualsevol dels altres tractaments.

4.5. Reaccions a les vacunes

L'anàlisi estadístic d'aquest apartat es va fer sense el grup control, ja que no podia presentar cap reacció a la vacuna pel fet de no haver estat vacunats. Així mateix, abans de la vacuna es van revisar tots els animals i estaven en tots els casos lliures de qualsevol de les reaccions estudiades en el procediment experimental. Abans de la vacunació no hi ha reaccions a la vacuna en cap animal.

Dit això, després de la vacuna hi ha diferències significatives en la presència de pàpules ($P < 0,0001$) i la presència de sang ($P = 0,010$). En el cas de les pàpules s'observen en un 4% dels animals (1 individu) vacunats IM, en un 75% dels animals vacunats amb l'intradèrmic. Només les diferències entre l'intradèrmic i l'IM són significatives. Quant a l'aparició de sang, només s'observa en un 17% dels animals vacunats IM, essent significativament diferent dels altres tractaments ($P = 0,010$).

Deu minuts després de la vacuna hi ha un efecte tractament en l'aparició de pàpules ($P < 0,0001$), presència de sang ($P < 0,0001$) i reaccions inflamatòries ($P = 0,0002$). En el cas de les pàpules només un 4% dels animals intramusculars tenien la reacció i un 50% dels intradèrmics. Per altra banda, la resposta inflamatòria es troba en un 0% dels intramusculars i en un 13% els intradèrmics.

Dues hores després de la vacuna hi ha un efecte tractament en l'aparició d'inflamació ($P < 0,0001$) i les zones envermellides ($P = 0,015$). En el cas de la resposta inflamatòria es troba un 13% dels animals intramusculars afectats i un 38% dels intradèrmics. Quant a les zones envermellides, n'hi ha un 0% dels animals intramusculars afectats i un 13% dels intradèrmics.

Vuit hores després de la vacuna, s'observa un efecte en el paràmetre crosta ($P = 0,048$). S'observa un 33% dels intradèrmics i un 58% dels intramusculars ($P = 0,086$). Es troba també un efecte de la mida de zones envermellides per tractament, essent de 0,32 cm en intramuscular i 0,41 cm en intradèrmic.

Finalment, a les 24 h de la vacunació, es troba també un efecte de zona envermellida ($P = 0,005$), amb valors del 4% en la IM i del 25% en els intradèrmics. Aquest últim factor tindria una molt bona correlació amb el comportament trobat a les 24 h de la vacuna, on els animals vacunats amb l'intradèrmic, es tomben més estona del costat esquerre. A les 48 i 72 h no hi ha diferències significatives entre tractaments en cap dels paràmetres analitzats.

Conclusions

A la producció porcina, els garrins han de vacunar-se al llarg del seu creixement, el que pot afectar negativament el seu benestar. Els tests d'aversió, els paràmetres de comportament i les vocalitzacions en el moment de la vacunació van mostrar que la vacunació per via intradèrmica sense agulla redueix les reaccions d'aversió i dolor del garrí durant el procediment de la vacunació en comparació al mètode de vacunació intramuscular. És a dir, els animals vacunats per via intramuscular guardaven un pitjor record del procés de vacunació i cridaven més durant aquesta que els animals vacunats per via intradèrmica.

Les reaccions a les vacunes a la pell també van ser diferents entre tractaments, en l'intradèrmic predominant les zones envermellides amb presència de pàpules i en l'intramuscular amb més presència de punts de sang. Per altra banda, no hi va haver cap diferència significativa en les concentracions de cortisol entre tractaments, el que demostra que la resposta negativa de la punxada no era prou duradora en el temps per suposar un gran increment energètic que es detectés després en les concentracions de cortisol.

Per tant, la vacunació intradèrmica és una estratègia molt prometedora per a la millora del benestar animal durant el procediment de vacunació.

Bibliografia

- [1] Harrison R. *Animal machines*, Regne Unit, Marian Stamp-Dawkins, University of Oxford, Regne Unit. 224 pàg.
- [2] Brambell FWR- 1985. *Welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems*. Cambridge University Library. <http://www.bopcris.ac.uk/bopall/ref2404.html>
- [3] Bareham JR. 1972. Effects of cages and semi-intensive deep litter pens on the behaviour, adrenal response and production in two strains of laying hens. *Br. Vet. J.*, vol. 128, no. 3, pp. 153–163. doi: 10.1016/S0007-1935(17)37088-4.
- [4] Bryant MJ, Ewbank R. 1972. Some effects of stocking rate and group size upon agonistic behaviour in groups of growing pigs. *Br. Vet. J.*, vol. 128, no. 2, pp. 64–70. doi: 10.1016/S0007-1935(17)37133-6.
- [5] Wood-Gush D, Duncan I, Fraser D. 1975. Social Stress and Welfare Problems in Agricultural Animals,” *Farm Anim. Welf. Collect.* Accés: Març 23, 2021. [Online]. Disponible a: <https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/farawel/8>.
- [6] Griffin DR. 1983. The question of animal awareness. *Br J Philos Sci.*, 34 (4):399-403.
- [7] Dawkins R, Brockmann HJ. 1980. Do digger wasps commit the concorde fallacy? *Anim. Behav.*, vol. 28, no. 3, pp. 892–896. doi: 10.1016/S0003-3472(80)80149-7.
- [8] Duncan IJH. 1981. Animal Rights – Animal Welfare: A Scientist’s Assessment. *Poult. Sci.*, vol. 60, no. 3, pp. 489–499. doi: 10.3382/ps.0600489.
- [9] Duncan IJH. 2015. The Science of Animal Well-being. Accés: May 30, 2021. [Online]. Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/266521630>.
- [10] Appleby J, Raleigh V, Frosini F, Bevan G, HaiYan G, Lyscom T. 2011. Variations in health care: the good, the bad and the inexplicable. *Var. Heal. care good, bad inexplicable*.
- [11] Singer P. 1975. *Animal Liberation: a new ethics for our treatment of animals*. Nova York, NY: New York review.
- [12] Manteca X. ¿Qué es el bienestar animal? Accés: Maig 29, 2021. [Online]. Disponible: www.fawec.org.
- [13] Future. 2009. *Farm Animal Welfare in Great Britain. 2009*. Accés: Juny 18, 2021. [Online]. Disponible: <http://www.fawc.org.uk>.
- [14] Broom DM. 1986. Indicators of poor welfare. Accés: Maig 29, 2021. [Online]. Disponible: <https://endcap.eu/wp-content/uploads/2015/06/Broom-1986-Indicators-of-poor-animal-welfare.pdf>.
- [15] Treede RD. 2018. The International Association for the Study of Pain definition of pain: As

- valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. *Pain Reports*, vol. 3, no. 2. doi: 10.1097/PR9.0000000000000643.
- [16] OIE. Utilización de animales en la investigación y educación. Accés Maig 30, 2021). [Online]: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2011/es_chapitre_1.7.8.htm
- [17] Slade G, Diatchenko L, Bhalang K, Sigurdsson A, Fillingim R, Belfer I, Max M, Goldman D, Maixner W. 2007. Influence of psychological factors on risk of temporomandibular disorders. *J. Dent. Res.*, vol. 86, no. 11, pp. 1120–1125. doi: 10.1177/154405910708601119.
- [18] Diatchenko L, Nackley AG, Tchivileva IE, Shabalina SA, Maixner W. 2007. Genetic architecture of human pain perception. *Trends in Genetics*, vol. 23, no. 12. Elsevier Current Trends, pp. 605–613. doi: 10.1016/j.tig.2007.09.004.
- [19] Boselli E, Logier R, Bouvet L, Allaouchiche B. 2015. Prediction of hemodynamic reactivity using dynamic variations of Analgesia/Nociception Index (Δ ANI). *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 30, 977-984. *Artic. J. Clin. Monit. Comput.*, vol. 30, no. 6, pp. 977–984. doi: 10.1007/s10877-015-9802-8.
- [20] van Loon JPAM, de Grauw J, van Loon J. 2015. Article in *The Veterinary Journal*. *Elsevier*. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.07.030.
- [21] Mansour C, Merlin T, Bonnet-Garin J.M. Chaaya R, Mocci R, Ruiz CC, Allaouchiche B, Boselli E, Junot S. 2017. Evaluation of the Parasympathetic Tone Activity (PTA) index to assess the analgesia/nociception balance in anaesthetised dogs. *Res. Vet. Sci.*, vol. 115, pp. 271–277. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.05.009.
- [22] Molony V, Kent JE. 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements," *J. Anim. Sci.*, vol. 75, no. 1, pp. 266–272. doi: 10.2527/1997.751266x.
- [23] Sneddon LU, Elwood RW, Adamo SA, Leach MC. 2014. Defining and assessing animal pain. *Anim. Behav.* vol. 97. Academic Press, pp. 201–212. doi: 10.1016/j.anbehav.2014.09.007.
- [24] Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp, M. 2003. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *Journal of Neuroscience Research*, 73(6), 778–786. *J. Neurosci. Res.*, vol. 73, no. 6, pp. 778–786. doi: 10.1002/jnr.10691.
- [25] Prunier A, Mounier AM, Hay M. 2005. Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs. *J. Anim. Sci.*, vol. 83, no. 1, pp. 216–222. doi: 10.2527/2005.831216x.
- [26] Mellor DJ, Murray L. 1989. Effects of tail docking and castration on behaviour and plasma cortisol concentrations in young lambs. *Res. Vet. Sci.*, vol. 46, no. 3, pp. 387–391. doi: 10.1016/s0034-5288(18)31185-8.
- [27] Shutt DA, Fell LR, Connell R, Bell AK. 1988. Stress responses in lambs docked and castrated

- surgically or by the application of rubber rings. *Aust. Vet. J.*, vol. 65, no. 1, pp. 5–7. doi: 10.1111/j.1751-0813.1988.tb14920.x.
- [28] Salama AAK, Contreras-Jodar A, Love S, Mehaba N, Such X, Caja G. 2020. Milk yield, milk composition, and milk metabolomics of dairy goats intramammary-challenged with lipopolysaccharide under heat stress conditions. *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-61900-8.
- [29] “Animal behaviour & welfare | SRUC.” <https://ww1.sruc.ac.uk/research/research-activities/animal-behaviour-welfare/> (Accès Maig 29, 2021).
- [30] Taylor AA, Weary DM. 2000. Vocal responses of piglets to castration: Identifying procedural sources of pain. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, vol. 70, no. 1, pp. 17–26. doi: 10.1016/S0168-1591(00)00143-X.
- [31] Taylor AA, Weary DM, Lessard M, Braithwaite L. 2001. Behavioural responses of piglets to castration: The effect of piglet age. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, vol. 73, no. 1, pp. 35–43. doi: 10.1016/S0168-1591(01)00123-X.
- [32] Molony V, Kent JE, Robertson IS. 1993. Behavioural responses of lambs of three ages in the first three hours after three methods of castration and tail docking. *Res. Vet. Sci.*, vol. 55, no. 2, pp. 236–245. doi: 10.1016/0034-5288(93)90087-V.
- [33] Wood-Gush DGM, Vestergaard K. 1991. The seeking of novelty and its relation to play. *Anim. Behav.*, vol. 42, no. 4, pp. 599–606. doi: 10.1016/S0003-3472(05)80243-X.
- [34] OIE. Vacunación. Accès Maig 29, 2021. [Online]: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_vaccination.pdf (Accès
- [35] Turner KME *et al.*, “The impact of needle and syringe provision and opiate substitution therapy on the incidence of hepatitis C virus in injecting drug users: Pooling of UK evidence,” Turner K, Hutchinson S, Vickerman P, Hope V, Craine N, Palmateer N, May M, Taylor A, Angelis DD, Cameron S, Parry J, Lyons M, Goldberg D, Allen E, Hickman M. 2011. The impact of needle and syringe provision and opiate substitution therapy on the incidence of hepatitis C virus in injecting drug users: pooling of UK evidence. *Addiction*, vol. 106, no. 11, pp. 1978–1988. doi: 10.1111/j.1360-0443.2011.03515.x.
- [36] Hemsworth PH, Coleman GJ. Human-livestock interactions: The stockperson and the productivity and welfare of intensively farmed animals. 2nd ed. Wallingford UK: CABI, 2011. 194 p.
- [37] Sarno MJ, Blase E, Galindo N, Ramirez R, Schirmer CL, Trujillo-Juarez DF. 2000. Clinical immunogenicity of measles, mumps and rubella vaccine delivered by the Injex jet injector: comparison with standard syringe injection. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 19(9):839-842. doi: 10.1097/00006454-200009000-00006.
- [38] Stout RR, Gutierrez MJ, Roffman M, Marcos J, Sanchez R, Macias M, Quiroz R, Taylor D,

- Mckenzie B, Restrepo E. 2004. Subcutaneous injections with a single-use, pre-filled, disposable needle-free injection device or needle and syringe: Comparative evaluation of efficacy and acceptability. *Drug Deliv. Tech*, vol. 4, pp. 2–6, 2004, doi: 10.1186/s40813-017-0056-3.
- [39] Saia M, D. Abiteboul, M. C. Martí, J. B. Boston, and H. Associates, “Respiratory syncytial virus View project Systmatic review of ICM View project,” 2010. Accés: Maig 29, 2021. [Online]. Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/285310698>.
- [40] Baker SR, Mondaca E, Polson D, Dee SA. 2012. Number 3 J Swine Health Prod. Accés: Maig 29, 2021. [Online]. Disponible: <http://www.aasv.org/shap.html>.
- [41] Imeah B, Penz E, Rana M, Trask C. 2020. Economic analysis of new workplace technology including productivity and injury: The case of needle-less injection in swine. *PLoS One*, vol. 15, no. 6, p. e0233599. doi: 10.1371/journal.pone.0233599.
- [42] Jones GF, Rapp-Gabrielson V, Wilke R, Thacker EL, Thacker BJ, Gergen L, Sweeney D, Wasmoen T. 2005. Intradermal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Swine Health Prod.*, 13(1):19-27.
- [43] Mitragotri S. 2006. Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors. *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 543–548. doi: 10.1038/nrd2076.
- [44] Hafer AL, Langley RL, Morrow MW, Tulis JJ. 1996. Occupational hazards reported by swine veterinarians in the United States. *J. Swine Heal. Prod.*, vol. 4, no. 3, pp. 128–141.
- [45] Chase CCL, Daniels CS, Garcia R, Milward F, Nation T. 2008. Needle-free injection technology in swine: Progress toward vaccine efficacy and pork quality. *J. Swine Heal. Prod*, 16:254-261.
- [46] Nathues H, Alarcón P, Rushton J, Jolie R, Fiebig K, Jiménez M, Geurts V, Nathues C. 2017. Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level - An economic disease model. *Prev. Vet. Med.*, vol. 142, pp. 16–29. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.04.006.
- [47] Karniychuk UU, Nauwynck HJ. 2013. Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Res.*, vol. 44, no. 1, p. 95.
- [48] Bierk MD, Dee S, Rossow K, Otake S, Collins J, Molitor T. 2001. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can. J. Vet. Res.*, vol. 65, no. 4, pp. 261–266.
- [49] Yaeger M, Prieve T, Collins J, Christopher-Hennings J, Nelson E, Benfeld D. 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *J. Swine Heal. Prod.*, vol. 1, no. 5, pp. 7–9.
- [50] Madapong A, Saeng-chuto K, Chaikhumwang P, Tantituvanont A, Saardrak K, Sanz RP, Alvarez JM, Nilubol D. 2020. Immune response and protective efficacy of intramuscular and

intradermal vaccination with porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 (PRRSV-1) modified live vaccine against highly pathogenic PRRSV-2 (HP-PRRSV-2) challenge, either alone or in combination with of PRRSV-1. *Vet. Microbiol.*, vol. 244, p. 108655. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108655.

- [51] Temple D, Escribano D, Jiménez M, Mainau E, Cerón JJ, Manteca X. 2017. Effect of the needle-free 'intra dermal application of liquids' vaccination on the welfare of pregnant sows. *Porc. Heal. Manag.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7. doi: 10.1186/s40813-017-0056-3.
- [52] Dalmau A, Rodríguez P, Llonch P, Velarde A. 2010. Stunning pigs with different gas mixtures: Aversion in pigs. *Anim. Welf.*, vol. 19, pp. 325–333.
- [53] Puppe B, Schön PC, Tuchscherer A, Manteuffel G. 2005. Castration-induced vocalisation in domestic piglets, *Sus scrofa*: Complex and specific alterations of the vocal quality. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, vol. 95, no. 1–2, pp. 67–78. doi: 10.1016/j.applanim.2005.05.001.
- [54] Martínez-Macipe M, Mainau E, Manteca X, Dalmau A. 2020. Environmental and management factors affecting the time budgets of free-ranging iberian pigs reared in Spain. *Animals*, vol. 10, no. 5, p. 798. doi: 10.3390/ani10050798.