

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

**Trazabilidad de ganado ovino mediante el uso de marcadores
biométricos y electrónicos**

**Sheep traceability by means of biometric and electronic
markers**

TESIS DOCTORAL

María Alejandra Rojas Olivares

Bellaterra (Barcelona)

2011

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

**Trazabilidad de ganado ovino mediante el uso de marcadores
biométricos y electrónicos**

**Sheep traceability by means of biometric and electronic
markers**

Tesis elaborada por María Alejandra Rojas Olivares,
dirigida por el Dr. Gerardo Caja López y el Dr. Sergi
Carné i Fructuoso del Departament de Ciència Animal i
dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,
para obtener el título de Doctor.

Bellaterra, 3 de enero de 2011.

Vº Bº

Dr. Gerardo Caja López

Dr. Sergi Carné i Fructuoso

Humildad

*Hay humildad en mi corazón, en mi entrega,
cuando te miro a los ojos y te veo igual a mí...
no hay diferencias, no hay egos, no hay rabia...
eres lo que soy en ese instante de amor y de entrega...
te siento y somos hermanos de la luz.
Y te miro a los ojos y siento que somos uno aun con mis
diferencias físicas...y nuevamente te digo...hermano en la luz.*

Maestra Ina Elena

AGRADECIMIENTOS

Y llegó este momento tan esperado desde que salí de mi Chile querido hace ya más de 4 años. Es difícil expresar mis agradecimientos a todos los que de una u otra manera me han apoyado y ayudado en este camino.

En primer lugar quisiera agradecer a mi director de tesis, el Dr. Gerardo Caja por confiar en mí, por querer guiar mis pasos en esta etapa de mi vida profesional, por sus consejos y apoyo en todos los ámbitos y por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación...y parece que es cierto eso de “sin estrés no hay progress”...

Quiero agradecer de manera más que especial a mi co-director de tesis, el Dr. Sergi Carné, por su inestimable ayuda, por las miles de cosas que he aprendido y por el apoyo recibido desde el primer momento que salía hacia la granja a “hacer ojos”. Gracias por tus consejos, por ser mi paño de lágrimas y sobretodo por tu enorme y desinteresada amistad!!! Que sàpigues que ets el millor del món mundial!!!!

A la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo por el apoyo económico proporcionado a través de la beca otorgada que ha permitido mi estancia y la realización de gran parte de esta tesis, y que sin duda sin su ayuda hubiera sido imposible llegar hasta acá.

También agradezco a todos los integrantes del Servei de Granges i Camps Experimentals de la UAB que ayudaron en algún momento a “la niña de los ojos”: Ramón Costa, Alfredo Vega, Cristóbal Flores, Ramón Sáez, Adela Ramírez, Valeriano Martínez, Manolo Martínez, Manel Pagès, Josep Vidal, Sergi Graboleda, Roger Ferrer, José Luis de la Torre y Sonia Andrés. A tots Moltes Gracies!!

También quiero agradecer a todos mis compañeros de PCera por su amistad y las tantas horas compartidas de trabajo y demases en ese despacho: Ahmed Salama, Vanesa Castillo, Adel Ait Saidi, Antonio Santibáñez, Andrés Schlageter, Manel Ben Khadim, Soufiane Hamzaoui, Mentxu Manuelian, Andreia Costa y Jean-Hubert Mocket. A los profesores Elena Albanell y Xavier Such, a los técnicos de laboratorio Carmen Martínez, Blas Sánchez y a todas las secretarias del Departament de Ciència Animal i dels Aliments.

También debo agradecer a mi gran grupo de amigas y amigos made in Chile que siempre han estado al pendiente de mi nueva situación y han sabido estar presentes aun cuando están a miles de kilómetros: Mitzi, Gigo, Rubio, Cornelio, Vianka, Patty, Janita, Katty, Pato, Angélica, etc, etc.

A mis nuevos amigos con los que he compartido más de alguna aventura en nuestro grupo de “Senderismo&Nocturismo”: Fer, Rosa, Pablo, Mica, Manu, Claudio, Sergio, y sobretodo a quienes han sido mi familia aquí: Erika, Faby, Vivi y Mati, que sin ustedes esto hubiera sido muchooo más duro. Gracias por su amistad y amor, los quiero muchooooo!!!

A toda mi familia GEA aquí en Barcelona, por todo su apoyo, ayuda y Amor entregado en estos años. Mil gracias!! “La Energía es Vida!!!

A esos chilenos que siendo vecinos nunca nos habíamos visto. Gracias Gloria, Paco, Ainhoa, Luka y Gus por recibirme en su casa los primeros días de mi vida aquí por Barna.

Y por último, el agradecimiento más especial, a mi familia: a mis “papis” Graciela y Julio por su apoyo incondicional y por soportar que su “niña” este tan lejos del nido, a mi hermano Dany, a mi sobrino Andrés y a la última recién llegada Javiera y por último a mi “Mami” que se que desde donde está me cuida y ayuda. Los quiero muchooooo!!!

Sólo me queda decir que me siento muy afortunada de poder vivir esta etapa profesional y personal tan importante. Gracias Padre por todo lo que me das!!!

GRACIAS TOTALES!!!

Barcelona, Enero de 2011

Alejandra Rojas Olivares

La línea de investigación de esta tesis ha dado origen a las siguientes publicaciones en revistas científicas y actas de Simposios nacionales e internacionales:

The work of this thesis has been published in the following national and international journals and symposium proceedings:

Publicaciones en revistas científicas internacionales

Rojas-Olivares, M. A., G. Caja, S. Carné, A. A. K. Salama, N. Adell, and P. Puig. 2011. Retinal image recognition for verifying the identity of fattening and replacement lambs. *J. Anim. Sci.* (submitted R2: 18-12-2010).

Rojas-Olivares, M. A., G. Caja, S. Carné, A. A. K. Salama, N. Adell, and P. Puig. 2011. Determining the optimal age for recording the retinal vascular pattern image of lambs. *J. Anim. Sci.* (submitted 01-11-2010).

Adell N., P. Puig, M. A. Rojas-Olivares, G. Caja, S. Carné, and A. A. K. Salama. 2011. A bivariate model for retinal image identification. *Biometrics* (submitted 27-11-2010).

Publicaciones en revistas nacionales

Rojas-Olivares, M. A., G. Caja, S. Carné, y A. A. K. Salama. 2010. Utilización de imágenes de la retina como sistema de auditoría de la identificación de ovino en granja y matadero. *Tierras de Castilla y León* 168:40-42.

Simposios internacionales

Caja, G., S. Carné, M. A. Rojas-Olivares, and J. J. Ghirardi. 2009. Current tools and technologies for the identification and traceability of small ruminants. International Conference of OIE on Identification and Traceability of Animals: Section 3: Overview of available tools and technology. From farm to fork. La Rural, Buenos Aires, Argentina, 23-25 de marzo de 2009.

- Rojas-Olivares, M. A., G. Caja, S. Carné, and A. A. K. Salama. 2009. Using retinal image recognition for auditing identity of live and harvested lambs. *J. Anim. Sci.* 87(E-Suppl. 2):380 (Abstr.).
- Rojas-Olivares, M. A., G. Caja, S. Carné, and A. A. K. Salama. 2009. Retinal image recognition for identifying and tracing live and harvested lambs. 60th EAAP Annual Meeting, Barcelona, Spain. Book of Abstracts 15:492 (Abstr.).
- Puig, P., N. Adell, A. Rojas-Olivares, G. Caja, S. Carné, and A. A. K. Salama. 2009. Statistical models for retinal image matching. In Proc. 24th Int. Workshop on Statistical Modelling. Ithaca, NY. p.295–299.
- Rojas-Olivares, M. A., G. Caja, S. Carné, A. A. K. Salama, N. Adell, and P. Puig. 2010. Determining the optimal age for recording the retinal vascular pattern image of lambs. *J. Anim. Sci.* 88(E-Suppl. 2):829 (Abstr.).
- Caja, G., S. Carné, M. A. Rojas-Olivares, A. A. K. Salama, A. Ait-Saidi, J. H. Mocket, A. Costa, and A. Aguiló. 2010. Innovative technologies for sustainable management of small ruminants. 61th EAAP Annual Meeting, Heraklion, Greece. Book of Abstracts 16:34 (Abstr.).

Simposios nacionales

- Rojas-Olivares, M. A., G. Caja, S. Carné, y A. A. K. Salama. 2009. Utilización de imágenes de la retina como sistema de auditoría de la identificación de ovino en granja y matadero. En XIII Jornadas sobre Producción Animal AIDA. M. Joy, J. H. Calvo, C. Calvete, M. A. Latorre, I. Casasús, A. Bernués, B. Panea, A. Sanz, J. Balcells (Eds.). AIDA, Zaragoza. p. 460-462

Abreviaturas

| | |
|-----------------------|--|
| BW | Body weight |
| Exp. | Experiment |
| FDX | Full duplex |
| HDX | Half duplex |
| ICAR | International Committee for Animal Recording |
| ID | Identification |
| ISO | International Organization for Standardization |
| Mcal | Megacalorie |
| mo | Month |
| n | Sample size |
| NE_F | Net energy for fattening |
| No | Number |
| P | Probability |
| R² | Coefficient of determination |
| RFID | Radio frequency identification |
| ROC | Receiver operating characteristic |
| SAS | Statistical Analysis Software |
| s.c. | Subcutaneous |
| SE | Standard error |
| wk | Week |
| yr | Year |

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar la trazabilidad de corderos utilizando dispositivos visuales (crotales oficiales y no oficiales) y electrónicos (mini-bolos e inyectables subcutáneos en la axila) de identificación (ID), así como su verificación por medio de imágenes retinales. Para ello se realizaron 4 experiencias (994 corderos), en distintas condiciones de granja y de matadero.

En la Exp. 1, se puso a punto la ID mediante imagen de retina en corderos utilizando un equipo Optireader (Optibrand, Fort Collins, CO, USA). Se tomaron imágenes a 3 (n = 152), 6 (n = 58) y 12 (n = 58) meses de edad. Las imágenes se compararon intra e inter edad, calculando un índice de coincidencia o “matching score” (MS, 0 a 100). Las imágenes a 3 meses se utilizaron como referencia para valorar la habilidad del operador y decidir el valor umbral de MS para aceptar una imagen desconocida. Los resultados obtenidos indicaron que la formación del operador fue adecuada tras 6 sesiones (264 imágenes) y que la mejor sensibilidad (0,989) y especificidad (0,995) se obtuvo para $MS \geq 70$. Los valores medios de MS intra e inter edad fueron $96,3 \pm 0,3$ y $92,6 \pm 0,5$ respectivamente. Todas las imágenes a 6 y 12 meses de edad mostraron $MS \geq 70$ respecto a las de 3 meses, resultando en un 100% de verificación de la ID de los corderos.

La Exp. 2 tuvo como objetivo optimizar la edad de obtención de la imagen retinal de referencia. Para ello se utilizaron 143 corderos desde 1 d hasta 1 año de edad, y se estudiaron 4 categorías comerciales de cordero: lechal (n = 136), ligero (n = 134), pesado o de reposición (n = 59), y primales o de 1 año (n = 25). Los MS y porcentajes de imágenes con $MS \geq 70$ aumentaron con la edad desde 1 d ($81,0 \pm 1,0$ y 75,8%) a 82 d ($95,9 \pm 0,4$ y 100%), respectivamente ($P < 0,05$). Como consecuencia, en los lechales, imágenes de 8 d dieron resultados mejores que a 1 d (94,8 vs. 87,4%; $P < 0,05$). En los ligeros, las imágenes a 30 d fueron mejores que las de 8 d (99,6 vs. 93,6%; $P < 0,05$). En el resto de los corderos, las imágenes a 82 d confirmaron la ID del 100%.

La Exp. 3, constituida a su vez por 2 experiencias, evaluó la trazabilidad de corderos ligeros con distintos dispositivos de ID y condiciones de trabajo. La Exp. 3.1 se realizó en una granja experimental y matadero de tamaño medio. Los corderos (n = 241) se identificaron con crotales oficiales (V1, temporales; V2, permanentes), mini-bolos electrónicos (MB) y transpondedores inyectables (IT). A los 80 d de edad, se tomó la imagen retinal de ambos ojos en 98 de corderos para compararla con la obtenida al sacrificio con la cabeza mantenida en posición natural (n = 67) o invertida (n = 31). La trazabilidad en granja fue semejante entre dispositivos (98,6 a 100%; $P > 0,05$), aunque disminuyó a 78,8% en matadero con los IT. Se detectó un cambio de orden de las canales en el pesaje, reduciendo la trazabilidad en la línea a 68,3%. El valor de MS de las retinas disminuyó al sacrificio, pero el porcentaje de imágenes con $MS \geq 70$ mejoró al invertir las cabezas (56,4 vs. 75,0%; $P < 0,05$). La Exp. 3.2 se realizó en un cebadero cooperativo y un matadero de grandes dimensiones. Los corderos (n = 308) se identificaron con crotales ‘Tip-tag’ (V3) e IT, y se tomaron imágenes retinales de ambos ojos (n = 153) para verificar su ID. La trazabilidad en granja fue menor con V3 que con IT (87,5% vs. 95,1%; $P < 0,05$), y los IT sólo trazaron el 64,1% de las canales. El orden de las canales se mantuvo a pesar de la velocidad de la línea. La imagen retinal permitió verificar la ID del 70% de los ojos en matadero. En conclusión, V1, V2 y MB resultaron adecuados para la trazabilidad individual de corderos vivos, pero no para sus canales. Es posible implementar un sistema automático de trazabilidad individual en granja y matadero si se utilizan dispositivos electrónicos y se asegura el orden de las canales. Asimismo, la imagen retinal puede permitir la verificación de la ID de corderos en muestras aleatorias y para trazar canales de consumo étnico (halal y kosher).

SUMMARY

The aim of this thesis was to evaluate lamb traceability by means of visual (official and non-official ear tags) and electronic (mini-boluses and injects in the armpit) identification (ID) devices. Retinal images (RI) were used for traceability verification. For this purpose, 4 experiments (994 lambs) under different farm and slaughterhouse conditions were carried out.

In Exp.1, an Optireader device (Optiband, Fort Collins, CO, USA) was used to set up an ID method based on retinal images in lambs. Images were taken at 3 (n = 152), 6 (n = 58), and 12 (n = 58) mo of age. Intra- and inter-age comparisons were done to obtain the matching score (MS, 0 to 100) of pairs of RI from the same eye. The 3-mo retinal images were used as reference images to assess operator training and to determine the matching threshold. Results obtained showed that suitable operator training was achieved after 6 sessions (264 images), and the best sensitivity (0.989) and specificity (0.995) was obtained when $MS \geq 70$. The average values of intra- and inter-age MS were 96.3 ± 0.3 and 92.6 ± 0.5 , respectively. In contrast to 3-mo results, all MS at 6 and 12 mo were ≥ 70 , resulting in 100% verification of lamb ID.

In Exp. 2, the optimal age at which retinal images with an Optireader device could be used as reference was assessed. A total of 143 lambs from 1 d until 1 yr of age were used, and 4 Spanish commercial categories were studied: milk-fed lambs (n = 136), fattened light lambs (n = 134), recruited replacement lambs (n = 59), and yearling replacement lambs (n = 25). The MS values and percentage of images with $MS \geq 70$ increased with lamb age from d 1 (81.0 ± 1.0 and 75.8%) to 82 (95.9 ± 0.4 and 100%), respectively ($P < 0.05$). Consequently, the retinal images taken at 8 d showed better results than those taken at 1 d of age (94.8 vs. 87.4% ; $P < 0.05$) in milk-fed lambs. In fattened light lambs, 30-d retinal images were better than those at 8 d of age (99.6 vs. 93.6% ; $P < 0.05$). In the rest of lambs, retinal images taken at 82 d allowed 100% confirmation of lamb identity.

The Exp. 3 consisted of 2 trials to evaluate the traceability of fattened light lambs with different ID devices and operation conditions. The Exp. 3.1 was carried out in an experimental farm and a medium-size slaughterhouse. All lambs (n = 241) were identified with official ear tags (V1, temporary; V2, permanent), electronic mini-boluses (MB), and injectable transponders (IT). At 80 d of age, retinal images of both lamb eyes were taken. Images from 98 lambs were also taken in the slaughterhouse for comparison, taking into account the head position (natural, n = 67; and reversed, n = 31) after cutting off. On-farm traceability was similar between the different devices (98.6 to 100; $P > 0.05$), but only reached 78.8% at slaughter with IT. Change of carcass order was detected at weighing, and slaughtering line traceability was reduced to 68.3%. The MS value of the retinal images decreased in slaughtered lambs, but the percentage of images with $MS \geq 70$ increased with heads reversed (56.4 vs. 75.0%; $P < 0.05$). The Exp. 3.2 was carried out in a feedlot cooperative and at a high throughput slaughterhouse. Lambs (n = 308) were identified with 'Tip-tag' ear tags (V3) and IT. Retinal images of both eyes (n = 153) were also taken to verify lamb ID. On-farm traceability was lower with V3 than IT (87.5% vs. 95.1%; $P < 0.05$), but only 64.1% carcasses were traced with IT. Despite the high throughput, carcass order was maintained (100%). Retinal images verified the ID of 70.0% of eyes. In conclusion, V1, V2 and MB were suitable for individual live lamb traceability but not for their carcasses. However, an automated individual traceability system could be effectively implemented in farm and slaughterhouse if electronic devices were used and the carcass order maintained in the slaughterhouse. Retinal image may also be suitable to verify the lamb ID in random samples and to trace carcasses for the ethnic meat (e.g., halal and kosher).

INDICE

| | |
|---|-----------|
| CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPITULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 Concepto de trazabilidad y su aplicación a los productos animales.... | 3 |
| 2.1.1 Terminología: Trazabilidad o rastreabilidad?..... | 3 |
| 2.1.2 “Tracking” y “Tracing”..... | 4 |
| 2.1.3 Relación entre trazabilidad y otros términos..... | 5 |
| 2.1.4 Herramientas modernas para la trazabilidad..... | 6 |
| 2.1.5 Trazabilidad alimentaria..... | 7 |
| 2.1.5.1 Definición de trazabilidad alimentaria..... | 7 |
| 2.1.5.2 Necesidad del mercado y seguimiento de productos animales..... | 8 |
| 2.1.6 Perspectivas del mercado y la trazabilidad de productos animales..... | 9 |
| 2.2 Marco legal de la trazabilidad de los productos animales..... | 9 |
| 2.2.1 Antecedentes generales..... | 9 |
| 2.2.2 Legislación de trazabilidad en la Unión Europea (UE)..... | 10 |
| 2.2.2.1 Legislación de trazabilidad para ganado bovino y su carne..... | 11 |
| 2.2.2.2 Legislación de trazabilidad para ganado ovino, caprino y su carne | 13 |
| 2.2.3 Normativas de trazabilidad en el mercado global..... | 15 |
| 2.3 Métodos para la trazabilidad animal y sus productos..... | 18 |
| 2.3.1 Concepto y necesidades de los esquemas de trazabilidad..... | 18 |
| 2.3.2 Elementos de un sistema de trazabilidad animal..... | 19 |
| 2.3.2.1 Sistemas y dispositivos de identificación animal..... | 19 |
| 2.3.2.1.1 Sistemas basados en caracteres naturales..... | 20 |
| 2.3.2.1.2 Sistemas basados en caracteres artificiales..... | 21 |
| 2.3.2.2 Bases de datos..... | 27 |
| 2.4 Sistemas biométricos para la identificación y trazabilidad animal..... | 28 |
| 2.4.1 Sistemas biométricos en animales..... | 29 |
| 2.4.1.1 Imagen del iris..... | 29 |
| 2.4.1.2 Huella genética por polimorfismos del ADN..... | 30 |
| 2.4.1.3 Imagen Retinal..... | 32 |
| 2.4.1.3.1 Bases anatómicas..... | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.1.3.2 Características del patrón vascular retinal en diferentes especies..... | 34 |
| 2.4.1.3.3 Patrón vascular retinal como identificador biométrico..... | 37 |
| CAPITULO 3: OBJETIVOS..... | 41 |
| CAPITULO 4: RECONOCIMIENTO DE LA IMAGEN RETINAL PARA LA VERIFICACIÓN DE IDENTIDAD DE CORDEROS DE ENGORDE Y REPOSICIÓN (<i>Retinal image recognition for verifying the identity of fattening and replacement lambs</i>)..... | 43 |
| 4.1 Resumen..... | 43 |
| 4.2 Resumen (<i>Abstract</i>)..... | 44 |
| 4.3 Introducción (<i>Introduction</i>)..... | 44 |
| 4.4 Material y métodos (<i>Materials and methods</i>)..... | 45 |
| 4.4.1 Animales, cría y manejo (<i>Animals, rearing and management</i>)..... | 45 |
| 4.4.2 Identificación animal (<i>Animal identification</i>)..... | 46 |
| 4.4.3 Imágenes retinales (<i>Retinal images</i>)..... | 46 |
| 4.4.4 Análisis estadísticos (<i>Statistical analyses</i>)..... | 49 |
| 4.5 Resultados y discusión (<i>Results and discussion</i>)..... | 50 |
| 4.5.1 Determinación del umbral del índice de coincidencia (<i>Determining the matching score threshold</i>)..... | 50 |
| 4.5.2 Tratamiento de los datos del índice de coincidencia (<i>Matching score data treatment</i>)..... | 52 |
| 4.5.3 Período de entrenamiento (<i>Training period</i>)..... | 53 |
| 4.5.4 Comparaciones intra-edad (<i>Intra-age comparisons</i>)..... | 55 |
| 4.5.5 Trazabilidad de corderos (<i>Lamb traceability</i>)..... | 58 |
| 4.6 Conclusiones (<i>Conclusions</i>)..... | 60 |
| 4.7 Apéndice (<i>Appendix</i>)..... | 61 |
| CAPITULO 5: DETERMINACIÓN DE LA EDAD ÓPTIMA PARA CAPTURAR LA IMAGEN DEL PATRÓN VASCULAR RETINAL DE CORDEROS (<i>Determining the optimal age for recording the retinal vascular pattern image of lambs</i>)..... | 63 |

| | |
|--|----|
| 5.1 Resumen | 63 |
| 5.2 Resumen (<i>Abstract</i>) | 64 |
| 5.3 Introducción (<i>Introduction</i>) | 64 |
| 5.4 Material y métodos (<i>Materials and methods</i>) | 65 |
| 5.4.1 Animales y manejo (<i>Animals and management</i>)..... | 65 |
| 5.4.2 Identificación individual de los corderos (<i>Lamb individual identification</i>)..... | 66 |
| 5.4.3 Imágenes retinales (<i>Retinal imaging</i>)..... | 66 |
| 5.4.4 Análisis estadísticos (<i>Statistical analyses</i>)..... | 68 |
| 5.5 Resultados y discusión (<i>Results and discussion</i>) | 69 |
| 5.5.1 Repetibilidad de las imágenes retinales y resultados de captura (<i>Retinal images repeatability and capturing performances</i>)..... | 69 |
| 5.5.2 Precisión de la verificación de identidad de corderos para trazabilidad (<i>Accuracy of lamb identity verification for traceability</i>).. | 72 |
| 5.6 Conclusiones (<i>Conclusions</i>) | 77 |
| | |
| CAPITULO 6: CONVENIENCIA DEL USO DE DISPOSITIVOS VISUALES Y ELECTRÓNICOS E IMÁGENES RETINALES COMO SISTEMAS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS DE IDENTIFICACIÓN, PARA TRAZAR Y AUDITAR CORDEROS VIVOS Y SUS CANALES (<i>Suitability of visual and electronic devices and of retinal images, as primary and secondary identification systems, for tracing and auditing live lambs and their carcasses</i>) | 79 |
| 6.1 Resumen | 79 |
| 6.2 Resumen (<i>Abstract</i>) | 80 |
| 6.3 Introducción (<i>Introduction</i>) | 80 |
| 6.4 Material y métodos (<i>Materials and methods</i>) | 81 |
| 6.4.1 Experiencia 1: Trazabilidad en condiciones de pequeña escala (<i>Exp. 1: Traceability under small operation conditions</i>)..... | 81 |
| 6.4.1.1 Animales y manejo (<i>Animals and management</i>)..... | 81 |
| 6.4.1.2 Identificación de los corderos (<i>Lamb identification</i>)..... | 82 |
| 6.4.2 Experiencia 2: Trazabilidad en condiciones de gran escala (<i>Exp. 2: Traceability under large operation conditions</i>)..... | 85 |

| | |
|---|----------------|
| 6.4.2.1 Animales y manejo (<i>Animals and management</i>)..... | 85 |
| 6.4.2.2 Identificación de los corderos (<i>Lamb identification</i>)..... | 86 |
| 6.4.3 Análisis estadísticos (<i>Statistical analyses</i>)..... | 87 |
| 6.5 Resultados y discusión (Results and discussion) | 88 |
| 6.5.1 Experiencia 1: Trazabilidad en condiciones de pequeña escala (<i>Exp. 1: Traceability under small operation conditions</i>)..... | 88 |
| 6.5.1.1 Resultados en granja de los dispositivos de identificación (<i>On-farm performances of identification devices</i>)..... | 88 |
| 6.5.1.2 Resultados en matadero de los dispositivos de identificación (<i>Slaughterhouse performances of identification devices</i>)..... | 90 |
| 6.5.1.3 Auditoría mediante la imagen retinal (<i>Retinal imaging auditing</i>)..... | 91 |
| 6.5.2 Experiencia 2: Trazabilidad en condiciones de gran escala (<i>Exp. 2: Traceability under large operation conditions</i>)..... | 93 |
| 6.5.2.1 Resultados en granja de los dispositivos de identificación (<i>On-farm performances of identification devices</i>)..... | 93 |
| 6.5.2.2 Resultados en matadero de los dispositivos de identificación (<i>Slaughterhouse performances of identification devices</i>)..... | 95 |
| 6.4.2.3 Auditoría mediante la imagen retinal (<i>Retinal imaging auditing</i>).. | 95 |
| 6.6 Conclusiones (Conclusions) | 96 |
| CAPITULO 7: CONCLUSIONES | 99 |
| CAPITULO 8: BIBLIOGRAFIA | 103 |

CAPITULO 1

Introducción

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La preocupación cada vez mayor entre los consumidores por los problemas de seguridad relacionados con la calidad e inocuidad de los alimentos está exigiendo más información sobre toda la cadena alimentaria (McGrann y Wiseman, 2001; McKean, 2001; Arana et al., 2002; Caja et al., 2002, 2004). Esto es especialmente importante después de las crisis sufridas en los sectores primarios de producción, como es el de la carne, marcado principalmente por los episodios de encefalopatía espongiforme bovina (EEB), scrapie, fiebre aftosa, así como por la detección de sustancias no permitidas o peligrosas en el ganado y en alimentos de origen animal (Arana et al., 2002; Caja et al., 2002, 2004).

Hoy en día, con la finalidad de mantener la confianza de los consumidores, los productores y comercializadores de alimentos buscan poder informar sobre el origen de los productos y garantizar la idoneidad del proceso productivo seguido. Esto significa tener la capacidad de seguir detalladamente la historia y localización de todo aquello relacionado con el producto, vale decir su: origen, producción y procesado, distribución y localización del producto después de su comercialización. De esta forma resulta posible que, en cada punto de la cadena de producción, se entregue a la etapa siguiente un respaldo o registro que describa el producto y deje constancia de las condiciones en que se entrega. De esta manera, es posible disponer de la “hoja de vida” completa del producto, desde el lugar de sus inicios hasta que llega al consumidor final.

Este proceso conocido como trazabilidad es fundamental para detectar problemas en cualquier producto, pues permite reconstruir la historia completa de su vida en la cadena de producción, transformación y comercialización, permitiendo corregir los fallos, si es que los hubo o las manipulaciones defectuosas que se pudieran producir (Pettit, 2001; Caja et al., 2002; Opara, 2003).

Un programa de trazabilidad animal y sus productos requiere, entre otras herramientas, de un sistema de identificación único y seguro, basado en identificadores permanentes en el animal, a prueba de fraudes, factibles en la práctica e inocuos para el animal. Por otro lado, resulta imprescindible contar con un sistema transparente y creíble de auditoría o

verificación de la identidad del animal y de sus productos (McGrann y Wiseman, 2001; McKean, 2001; Caja et al., 2002).

Actualmente se utilizan diversos sistemas de identificación animal, desde los tradicionales (marcas a fuego, tatuajes, crotales) hasta la identificación electrónica (inyectables, crotales y bolos) tal como han revisado Caja et al. (2004). Sin embargo, muchos de los sistemas tradicionales, han mostrado una serie de inconvenientes como son pérdidas, problemas de lectura, fraudes, daños y alteración del bienestar o comportamiento del animal. Dichas limitaciones han sido superadas en su mayor parte por el uso de dispositivos electrónicos de identificación.

Por otro lado, el avance en técnicas biométricas de identificación en humanos ha hecho que se desarrollen nuevas metodologías para su uso en animales, como son la identificación por ADN y por la imagen de la retina. El análisis de polimorfismos del ADN permite verificar la identidad de animales y sus productos, y complementado con un sistema seguro de identificación se puede asegurar la trazabilidad completa de la cadena de producción (Cunningham y Meghen, 2001; Sánchez, 2002). En la práctica sin embargo, se han detectado errores del 2 al 9% (Ghirardi, 2006; Hernández-Jover, 2006) debidos a errores de etiquetado en la cadena de producción.

El uso de la imagen retinal ha demostrado ser un método rápido y eficaz para verificar la identidad en bovinos y ovinos (Allen et al., 2008; Gonzales-Barron et al., 2008; Barry et al., 2008), aunque no ha sido evaluado su uso como herramienta de trazabilidad.

El presente trabajo plantea, en primer lugar, la puesta a punto de la tecnología de la imagen retinal como método de verificación de identidad en ovinos, desde edades tempranas hasta adultos, y de esta manera determinar la edad óptima a la cual se puede tomar una imagen de buena calidad para utilizarla en comparaciones posteriores con fines de trazabilidad.

Por otra parte, se analiza la utilización práctica de la identificación electrónica (transpondedores inyectables y bolos) en comparación a los sistemas visuales (crotales oficiales) en animales destinados a matadero, complementado con el uso de la tecnología de la imagen retinal como sistema de auditoría o de control de identidad, permitiendo así obtener una estimación de la trazabilidad conseguida a lo largo de toda la cadena productiva.

CAPITULO 2

Revisión Bibliográfica

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONCEPTO DE TRAZABILIDAD Y SU APLICACIÓN A LOS PRODUCTOS ANIMALES

2.1.1 Terminología: Trazabilidad o rastreabilidad?

La traducción de la palabra “traceability” a otras lenguas es una fuente de controversia. En español se traduce de una forma directa como “trazabilidad”, pero este término se refiere a la habilidad de “trazar”, y “trazar” es la acción de dibujar y dejar trazas, no de encontrarlas. Por otro lado, traza significa huella o vestigio, aunque este significado no se reconoce en el verbo trazar.

En sentido estricto “rastreabilidad” es la habilidad de “rastrear”, y “rastrear” es seguir el rastro, lo que resultaría más adecuado. En la mayor parte de la bibliografía consultada se habla indistintamente de trazabilidad o rastreabilidad, aunque en la mayoría de los casos el término más utilizado es el primero.

De acuerdo con lo indicado por la Real Academia Española de la Lengua (RAE), ninguno de los términos, “trazabilidad” y “rastreabilidad”, está aceptado en la 22ª edición del Diccionario Oficial de la Lengua Española. Sin embargo, el avance de la 23ª edición ya incorpora el término “trazabilidad” y lo define como: “Posibilidad de identificar el origen y las diferentes etapas de un proceso de producción y distribución de bienes de consumo”.

Según la RAE, el verbo “trazar” deriva del Latín *tractiare* (de *tractus*; pasado de *trahere*; y que se traduce como arrastrar, tirar), y significa hacer trazos, delinear o diseñar la traza a seguir en una obra; discurrir y disponer los medios para el logro de algo; describir o exponer los rasgos por medio del lenguaje. Ninguno de estos significados es apropiado para el uso que se aplica actualmente a la palabra trazabilidad, por lo que ha sido propuesta como un neologismo (Caporale et al., 2001).

La trazabilidad se definiría como un conjunto de medidas, acciones y procedimientos que permiten registrar e identificar cada producto desde su origen hasta su destino final.

Mediante la trazabilidad resulta posible reconstruir la historia, recorrido o aplicación de un determinado producto, identificando:

- Sus componentes;
- Los procesos aplicados al producto durante su fabricación o manipulación;
- La localización durante su distribución.

Mediante toda esta información es posible entregar productos definidos en mercados específicos, con la garantía de conocer con certeza su origen e historia. El concepto de trazabilidad está asociado a procesos productivos modernos, a productos de calidad y elevado valor para el cliente final, así como a la seguridad alimentaria (Caporale et al., 2001; McKean 2001; Ammendrup y Barcos, 2006; Yordanov y Angelova, 2006).

Otra definición del término trazabilidad es la indicada por la Asociación Española de Codificación Comercial (AECOC, 2010) que se refiere a aquellos procedimientos preestablecidos y autosuficientes que permiten conocer, en un momento dado, la historia, ubicación y trayectoria de un producto (o lote de productos) a lo largo de la cadena de suministro, mediante el empleo de las herramientas adecuadas. Para ello resulta necesario asociar sistemáticamente un flujo de información a un flujo físico de mercancías.

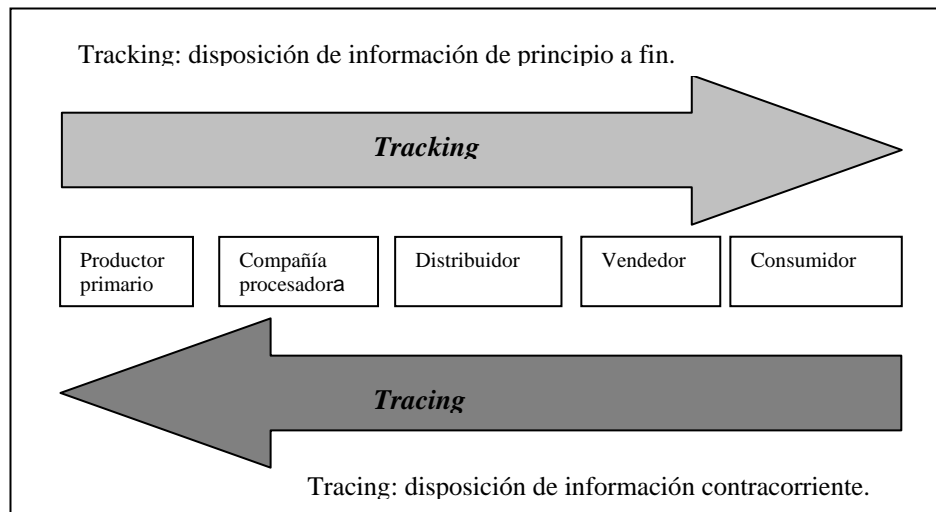
2.1.2 “Tracking” y “Tracing”

Según Schwägele (2005) la trazabilidad se puede entender compuesta por dos acciones claves y complementarias: “Tracking” y “Tracing”.

“Tracking” o trazabilidad descendente se puede definir como la capacidad de seguir la trayectoria de un producto y sus movimientos a través de la cadena de producción desde el principio al fin. “Tracing” o trazabilidad ascendente es la capacidad de identificar el origen de un producto o grupo de productos a través de registros, desde el fin al comienzo (contracorriente) de la cadena de producción (Figura 2.1).

La trazabilidad descendente se suele utilizar como garantía de calidad (certificación de calidad) y tiene especial utilidad para disminuir el tiempo de reacción de los costes de intervención frente a una crisis. Permite recuperar información sobre la localización de los productos en cada momento, en cualquier punto de la cadena de producción o de comercialización. Aquí, los prestadores de servicios logísticos desempeñan un papel esencial.

Figura 2.1. Tracking y Tracing a lo largo de la cadena de producción de un alimento (Schwägele, 2005).



La trazabilidad ascendente se centra principalmente en el control cualitativo de los productos. Tiene por objeto buscar o investigar las causas de un problema de calidad hacia arriba en la cadena de producción. Se trata de encontrar el origen y las características de los productos en cualquier punto de la cadena, con el fin de delimitar bien los problemas de tipo cualitativo, y resolverlos al menor coste y lo más rápidamente posible. La trazabilidad debe estar respaldada por un adecuado sistema de identificación del producto a trazar, así como del seguimiento de las características y/o tratamientos a los que éste haya sido sometido (Green y Hy, 2002; Schwägele, 2005).

2.1.3 Relación entre trazabilidad y otros términos

En la práctica resulta frecuente asociar trazabilidad a otros términos como son: autenticación, certificación de productos, marcas y controles de calidad. No obstante, aunque todos ellos suelen formar parte de un sistema de trazabilidad no son sinónimos (López et al., 2003). Así:

- Certificación supone una declaración en la que se mantiene que ciertas operaciones se han llevado a cabo en conformidad con las normas ambientales, sociales o relativas a la inocuidad y calidad de los alimentos en cuestión.
- Autenticación consiste en la identificación de los componentes de un producto y la confirmación de su procedencia.

- Una marca supone la identificación y puesta en conocimiento hacia el consumidor de ciertas características de un producto determinado.
- Los controles de calidad garantizan un compromiso, reconocido por las autoridades correspondientes, sobre la realización de determinadas prácticas y parámetros de calidad aplicados normalmente por productores y comercializadores.

Dado que el ámbito de la trazabilidad es el de la cadena de suministros global y no el de un actor individual de la cadena, para poder llevar a cabo una iniciativa de trazabilidad, se considera necesaria la intervención y colaboración de todos los agentes de la cadena. La iniciativa de trazabilidad aplicada debe ser estándar y entendible por todos los agentes de la cadena de suministro y, para conseguir la máxima eficiencia, debe posibilitar la automatización de los procesos de captura, registro y transmisión de la información necesaria (López et al., 2003; AECOC, 2010).

2.1.4 Herramientas modernas para la trazabilidad

Existen múltiples tecnologías que permiten rastrear con precisión el recorrido completo de un producto en la cadena de producción y comercialización. La utilización de identificación visual y electrónica, la integración de Internet, redes de comunicación, acceso inalámbrico, software especializado, dispositivos móviles y sistema global de posicionamiento (GPS), entre otros, hacen realidad la idea de poder detectar el punto exacto y el momento donde se produjo un evento. De una forma especial, en la implementación actual de los sistemas de trazabilidad resulta frecuente la utilización de distintas herramientas (López et al., 2003) tales como:

- Etiquetas visuales de lectura automática (códigos de barras, matriciales...);
- Tarjetas magnéticas;
- Dispositivos y etiquetas de radiofrecuencia (RFID) que monitorizan el desplazamiento y localización del producto;
- Identificación biométrica: impresión de huellas (digitales, nariz, paladar...), reconocimiento de voz (VRS), escaneo del iris o de la retina; análisis de marcadores moleculares (ADN);
- Marcadores químicos (sellos o tatuajes con pequeñas cantidades de compuestos químicos).

2.1.5 Trazabilidad alimentaria

La trazabilidad tiene aplicación en diversas áreas, sin embargo, es en la industria alimenticia donde se ha desarrollado con mayor fuerza. Los riesgos de contaminación de la cadena alimentaria, bioterrorismo, o la transmisión de enfermedades y plagas, han impulsado la implementación de sistemas de trazabilidad, particularmente en los países desarrollados.

Para controlar los riesgos a la salud humana y animal en la cadena alimentaria y así asegurar la confianza del consumidor, la administración necesita información que le permita establecer rápidamente la fuente de infección o contaminación de los productos alimenticios. Surge así la necesidad de establecer políticas de identificación y seguimiento individual de los alimentos, mediante la aplicación de tecnologías adaptadas a la modernización y globalización de los intercambios comerciales actuales, con lo que empieza a tomar notoriedad el concepto de trazabilidad alimentaria (Pettitt, 2001; Caja et al., 2002; Felmer et al., 2006).

2.1.5.1 Definición de trazabilidad alimentaria

Se define como la capacidad de rastrear un alimento durante toda la cadena de producción, transformación y comercialización hasta llegar al consumidor, lo que permite una identificación fiable de sus ingredientes, procesos y un control sanitario efectivo. Todos aquellos compuestos que forman parte de un alimento serán en consecuencia susceptibles de ser sometidos a un proceso de trazabilidad. La trazabilidad es por tanto una herramienta fundamental al servicio de la calidad y seguridad alimentaria (López et al., 2003; Felmer et al., 2006).

De acuerdo con el artículo 3 del Reglamento Europeo CE 178/2002, la trazabilidad alimentaria es *‘la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución, de un alimento, pienso, animal destinado a la producción de alimentos o sustancia destinada a ser incorporada en los alimentos o piensos o con probabilidad de serlo’*.

Por otro lado, la FAO/OMS (2006) la define como *la capacidad de seguir el movimiento de un alimento a través de etapa(s) especificada(s) de la producción, transformación y distribución’*.

Ambas definiciones ponen de manifiesto que los distintos operadores implicados en alguno de los eslabones de la cadena alimentaria, incluyendo los piensos para el ganado, deben de disponer de sistemas que aseguren la trazabilidad de los productos de los cuales son responsables en los términos que define la reglamentación en vigor.

En el caso particular de los animales para consumo humano, la trazabilidad implica seguir el proceso desde el nacimiento hasta su venta al detalle. De esta forma, ante cualquier duda o problema, se puede rastrear su paso por la cadena productiva hasta el lugar de nacimiento, posibilitando conocer detalles acerca de su crianza, alimentación, manejo, cuidados sanitarios, transporte y faenado (Pettitt, 2001; Felmer et al., 2006).

La trazabilidad en productos de origen animal también se aplica a productos no alimentarios como el cuero. La Directiva 76/769/CEE es la que regula la producción de productos textiles y artículos de cuero que puedan entrar en contacto directo y prolongado con la piel humana o cavidad bucal. En el caso de los cueros, éstos deben ser marcados por ambos lados con un número de partida y cada partida, correctamente embalada sobre una plataforma adecuada, debe llevar una tarjeta de identificación que permita realizar la trazabilidad del proceso seguido.

2.1.5.2 Necesidad del marcado y seguimiento de productos animales

El tema de la calidad y seguridad de los alimentos viene suscitando una inquietud creciente, tanto por parte de la administración como entre los consumidores. Las crisis alimentarias han puesto de manifiesto la facilidad con la que se extienden los problemas de bioseguridad en el terreno y la rapidez con que el consumidor rechaza los productos afectados. La resolución de estas crisis es además compleja, a pesar de todas las medidas de prevención que puedan adoptarse (Caja et al., 2002). Por otro lado, los países recurren a los sistemas de trazabilidad para alcanzar sus objetivos de control, prevención y erradicación de enfermedades animales.

En este contexto, la trazabilidad de los animales y sus productos ha ido cobrando importancia a medida que el consumidor ha ido perdiendo el control directo de la producción y venta de alimentos. Actualmente los supermercados de muchos países utilizan la trazabilidad para reforzar la fidelización de sus clientes, buscando poder informar sobre el origen de sus productos (McKean, 2001; Moreira y Gecele, 2005).

2.1.6 Perspectivas del mercado y la trazabilidad de productos animales

La trazabilidad se ha convertido en un elemento crítico en el mercado agroalimentario global. Este el caso de la Unión Europea, Estados Unidos y Japón, que se centran básicamente en la calidad y seguridad alimentaria. Los cambios en la demanda del consumidor por prácticas agrícolas sostenibles (baja huella de carbono) y la demanda cada vez mayor por una gama de productos de calidad superior y seguros, hacen que la trazabilidad sea un elemento importante del sistema de garantía de calidad total (Arana et al., 2002; Opara, 2003).

El comercio internacional de productos pecuarios está siendo cada vez más exigente en cuanto a necesidades que aseguren calidad e inocuidad de los alimentos. En este sentido, la trazabilidad animal es primordial para la certificación de las exportaciones. Las exigencias futuras de estos mercados de exportación, apuntan a que la trazabilidad e identificación animal jugará un rol de importancia y de exigencia para los mercados consumidores de carnes bovina, ovina y caprina, ya que el consumidor requiere conocer el origen de un animal y los procesos a los cuales ha sido sometido (Moreira y Gecele, 2005; Dagg et al., 2006).

Es importante tener claro que la trazabilidad no implica necesariamente calidad, aunque constituye el primer paso para lograrla; que involucra a todos los actores de la cadena; que asegura la total transparencia de los procedimientos; y que clarifica la responsabilidad de cada uno de los actores de la cadena, es decir: productor (criador y de engorde), transportista, matadero, exportador, distribuidor y comerciante al detalle (Opara, 2003).

2.2 MARCO LEGAL DE LA TRAZABILIDAD DE LOS PRODUCTOS ANIMALES

2.2.1 Antecedentes generales

Un aspecto básico en la implementación de un sistema de trazabilidad es la revisión de la legislación relevante existente, ya que todas las acciones de un programa de trazabilidad se deben desarrollar claramente en lo referente a su marco legal (Ammendrup y Barcos, 2006).

Los detalles de dicho programa se pueden resolver en relación a las responsabilidades de cada parte, documentación obligatoria, movimiento de animales y de productos de origen animal y un sistema de registro.

Otros aspectos que se deben considerar cuando se establece el marco legal de un sistema de trazabilidad son los siguientes (Ammendrup y Barcos, 2006):

- Definición, rol y alcance de la autoridad competente;
- Definición, rol y obligaciones de cada uno de los componentes del sistema;
- Documentación/notificación de los eventos relacionados con la salud animal, el transporte de animales y de productos animales, y del sistema de registro;
- Sistema de identificación animal, de granjas, de plantas procesadoras, y de vehículos de transporte animal y de productos de origen animal.

Es precisamente en la identificación, donde más se ha desarrollado la legislación tanto en la Unión Europea como en el resto del mundo. A continuación se describen los principales requisitos legales para la trazabilidad de productos animales en el mercado europeo y global en general.

2.2.2 Legislación de trazabilidad en la Unión Europea (UE)

A nivel de la UE existe una necesidad de implementar sistemas de trazabilidad que entreguen información sobre el origen, proceso, comercio y destino final de productos alimenticios. Tales sistemas aumentan la confianza de los consumidores y permiten a las autoridades reguladoras identificar y retirar del mercado alimentos peligrosos para la salud humana o no comestibles. Las crisis agroalimentarias originadas por la diseminación de patologías como las encefalopatías espongiformes transmisibles en bovino y ovino, y las toxiinfecciones como salmonelosis e infecciones por *Escherichia coli*, han sido el principal incentivo para implementar estos sistemas de trazabilidad en la UE (Caporale et al., 2001; McGrann y Wiseman, 2001; Pettitt, 2001; Schwagele, 2005).

Desde enero de 2005, la Ley General de Alimentos (Reglamento CE 178/2002) de la Unión Europea obliga a que todos los operadores de la cadena alimentaria dispongan de sistemas de trazabilidad, aun cuando sus clientes no lo soliciten. Dicha legislación hace referencia a: i) los principios y requisitos generales de la ley de alimentos; ii) establece la autoridad europea en seguridad alimentaria; y iii) proporciona los procedimientos en materia de seguridad alimentaria, es decir, la puesta en práctica de sistemas de trazabilidad

en las cadenas de producción de alimento en Europa.

En el artículo 18 de este reglamento se establece que la trazabilidad de un alimento, incluidos los destinados a animales, debe ser establecida en todas las etapas de producción, proceso y distribución; que los operadores deberán identificar a cualquier proveedor de alimentos, productos de origen animal o cualquier sustancia que se intenta o espera ser incorporada en un alimento, así como identificar a otros operadores a los cuales ellos han provisto de sus productos. Para ello se debe contar con sistemas y procedimientos que permitan que esta información este a disposición de las autoridades competentes. Asimismo, el alimento debe estar adecuadamente etiquetado o identificado para facilitar su trazabilidad, con la información o documentación relevante de acuerdo con los requisitos de provisiones más específicas (Reglamento CE 178/2002).

La recogida y mantenimiento de toda la información útil para la trazabilidad no debería afectar a los costos de producción, por lo que debe ser implementada mediante dispositivos de bajo coste y procesos de transferencia de información eficientes. Los registros tomados en formato papel se consideran actualmente inadecuados, por lo que se recomienda el registro de datos automatizado (Schwägele, 2005).

2.2.2.1 Legislación de trazabilidad para ganado bovino y su carne

De una forma significativa, la identificación y registro de animales bovinos, porcinos, ovinos y caprinos se inició en la UE a partir de 1992 (Directiva del Consejo 92/102/CEE). Posteriormente la legislación se ha ampliado y especificado para cada especie animal.

Desde el 1 de enero de 1998 el Reglamento CE 820/97, estableció como obligatoria la doble identificación, el registro del ganado vacuno, y el etiquetado de su carne y de los productos derivados de ésta. El Reglamento CE 1760/2000, actualmente en vigor, modificó algunos aspectos relativos al etiquetado de la carne. Así, desde enero de 2000 los bovinos europeos deben disponer de un “*Documento de Identidad Bovina*” (DIB), también conocido como pasaporte, en el cual consta un código de identificación, así como informaciones adicionales relacionadas con el animal y la explotación de procedencia. Este pasaporte debe estar disponible dentro de los 14 d tras la notificación del nacimiento del ternero, y es obligatorio que acompañe al animal en cada desplazamiento desde su nacimiento hasta el matadero. Si el país dispone de Base de Datos centralizada eficiente, puede sustituirse por una notificación oficial en el caso del comercio nacional.

Posteriormente, en el Reglamento CEE 911/2004 se han detallado las características de los crotales oficiales que deben utilizarse en la identificación de los bovinos, que deben contener al menos: el nombre o código o distintivo de la autoridad competente (o de la autoridad competente central del estado miembro que las asignó), 2 letras del código ISO correspondientes al país de origen, y un código numérico que no exceda los 12 dígitos.

Por otro lado, en cada explotación debe existir un *Libro de registro* donde queden anotadas las variaciones del censo de ganado (nacimientos, muertes, movimientos de entrada o de salida) y sus respectivas fechas. Se obliga a los ganaderos a comunicar las variaciones a las autoridades competentes dentro de un plazo de 3 a 7 d. Cada estado miembro debe además establecer, a escala nacional, una Base de Datos Nacional que contenga en tiempo real toda la información sobre los animales de todas las explotaciones del país, incluidos sus movimientos.

En cuanto al etiquetado de la carne, actualmente sólo existe reglamentación específica en el caso de la especie bovina (Reglamento CE 1760/2000 del Parlamento y Consejo Europeo). El etiquetado de las canales debe realizarse al final de la línea de sacrificio y posteriormente al sellado sanitario oficial por parte de los servicios veterinarios.

Las etiquetas aplicadas deben llevar los datos exigidos por las diferentes normativas oficiales de la UE. Su número de referencia es el número de orden de la canal en el matadero, que posteriormente se relaciona en el registro de sacrificio con el número de crotal y del DIB. La etiqueta debe acompañar a la canal hasta la sala de despiece, donde se identifica cada pieza que se obtenga de ella con otra etiqueta que llevará el mismo número que la canal.

En el caso específico de la carne, la legislación exige la aplicación de una etiqueta a cada trozo de carne y cada unidad de material de envasado y, en todos los casos, la información deberá estar escrita y visible para el consumidor en el punto de venta. Esta etiqueta es actualmente la única herramienta de trazabilidad de la cadena seguida por la carne en la UE. La etiqueta debe contener menciones obligatorias y, en su caso, menciones voluntarias. Las menciones obligatorias son:

- Número o código de referencia que garantice el vínculo entre la carne y el animal o los animales de que procede. Dicho número podrá ser el de identificación individual del animal o el de identificación correspondiente a un grupo de animales. Los grupos vendrán determinados por el número de canales o cuartos que se despiquen conjuntamente y que constituyan un solo lote para la planta de despiece

correspondiente. El tamaño de estos lotes no podrá en ningún caso exceder de la producción de un día.

- Número de autorización del matadero en el que haya sido sacrificado el animal o grupo de animales, así como el estado miembro o tercer país en el que se encuentre el matadero. La mención será la siguiente: “Sacrificado en: (nombre del estado miembro o tercer país) (número de autorización)”.
- Número de autorización de la sala de despiece en la que haya sido procesada la canal o el grupo de canales y el estado miembro o tercer país en el que se encuentre; la mención será la siguiente: “Despiece en: (nombre del estado miembro o tercer país) (número de autorización)”.

Desde enero de 2002 las anteriores menciones se deben completar con el estado miembro o tercer país de nacimiento del animal y el/los estado(s) miembro(s) o tercer país de engorde, cuando así sea. No se indicará un estado miembro o tercer país de engorde cuando el animal haya pasado menos de 30 d en su territorio.

Por otro lado, la carne de vacuno no está exenta de cumplir el etiquetado general de los productos alimenticios, aunque se han hecho algunas excepciones respecto a las canales y la carne entera. Así, desde septiembre de 2000 son obligatorios el código de referencia, el estado miembro o tercer país de sacrificio del animal y el de elaboración de la carne. Desde enero de 2002, cuando el país de elaboración no coincida con el de origen de la carne, se debe incluir el dato del origen, entendiendo por tal el país o los países de que procede la carne, es decir donde ha nacido el animal y donde se ha engordado.

Otras informaciones referidas a la alimentación, raza, edad, sistema de producción, etc. se incluyen mediante un sistema voluntario de etiquetado certificado por un organismo independiente de control.

2.2.2.2 Legislación de trazabilidad para ganado ovino, caprino y su carne

El sistema oficial de identificación y registro de ovinos y caprinos en la UE está detallado en el Reglamento CE 21/2004, que posteriormente ha sido parcialmente modificado por los Reglamentos CE 933/2008 y CE 759/2009. En dicha normativa se adopta un doble sistema de identificación consistente en el uso de dos crotales o de un crotal más un dispositivo electrónico, siendo obligatorio el uso del electrónico en los países con un censo de ovinos y caprinos superior a 600.000 animales.

Los dispositivos de identificación se colocarán en un plazo máximo de 6 meses a partir del nacimiento y, en cualquier caso, antes de que el animal abandone la explotación en la que ha nacido. No obstante, con carácter excepcional, las autoridades competentes podrían ampliar dicho plazo hasta 9 meses para los animales criados en sistemas de ganadería extensiva, de acuerdo con las disposiciones de la UE.

El Reglamento hace además una excepción permitiendo que los animales destinados al sacrificio antes de los 12 meses de edad y no destinados a la exportación, puedan ser identificados con un sólo crotal, que deberá colocarse antes de que el animal abandone la explotación de nacimiento.

Además se especifica la necesidad de registrar las explotaciones y los movimientos de los animales, siendo obligatorio la creación y mantenimiento de una base de datos informatizada cumpliendo con las fechas antes mencionadas.

En el caso de España se ha aprobado el Real Decreto 947/2005, modificado por el Real Decreto 1486/2009, para la implementación oficial de la normativa comunitaria. Todos los animales nacidos en España después del 9 de julio de 2005, deben ser identificados mediante una marca auricular (crotal plástico) y un identificador electrónico, que en el caso de los ovinos debe ser un bolo ruminal. Sin embargo, en ovinos, dicho bolo podrá sustituirse por un crotal electrónico; y en caprinos, se podrá sustituir por una de las siguientes alternativas: crotal electrónico, marca electrónica (pulsera) en la cuartilla de la extremidad posterior derecha o un inyectable en el metatarso derecho, todo previa aprobación de la autoridad competente. Los dos dispositivos que lleve un mismo animal deberán tener el mismo código de identificación que estará compuesto por los siguientes caracteres: la identificación de España, según el código de país de acuerdo con la norma UNE-ISO 3166 (letras ES en el crotal o el código 724 en el identificador electrónico) seguidas de 12 caracteres numéricos. El crotal de plástico se colocará, salvo imposibilidad, en la oreja derecha del animal.

Para los animales que se destinen a sacrificio antes de los 12 meses de edad y consumo en el territorio español, se especifica una única marca auricular (crotal plástico pequeño), aprobada por la autoridad competente, que se colocará en la oreja izquierda del animal. Por ello, la trazabilidad en los ovinos y caprinos menores de 12 meses no se realiza en España de manera individual sino por lotes, aplicándose los siguientes niveles de trazabilidad (Ghirardi, 2006):

- Lotes de cebo.
- Lotes y sub-lotes de matadero.
- Lotes y sub-lotes de sala de despiece.
- Lotes y sub-lotes de comercialización.

Como se mencionó anteriormente, la normativa para etiquetado de carne sólo rige para la carne bovina, por lo tanto, la carne ovina y caprina, hasta el momento, carece de una reglamentación que normalice el etiquetado de su carne.

En la Tabla 2.1 se resumen las principales características de las normativas en vigor en la UE para las diferentes especies y sus fechas críticas.

Tabla 2.1. Resumen de la legislación europea aplicadas a las distintas especies rumiantes de interés ganadero.

| Especie | Normativa | Exigencias | Fechas críticas de identificación |
|----------------------|---|--|---|
| Bovinos Búfalos | Reglamento CE 1760/2000 Reglamento 911/2004 | Doble crotal Pasaporte o DIB Libro de registro en granja Base de datos informatizada | < 20 días de vida o antes de abandonar la explotación. |
| Bisontes | Reglamento CE 509/1999 | Doble crotal | < 9 meses de edad. |
| Ovinos y Caprinos | Reglamento 21/2004 Reglamento 933/2008 Reglamento 759/2009 | Doble identificación: 2 crotales o 1 crotal y 1 dispositivo electrónico. Registro de explotaciones y movimientos de animales. Base de datos informatizada. Excepción: 1 solo crotal en animales destinados a sacrificio antes de 12 meses de edad y no destinado a exportación. Obligación de dispositivo electrónico a partir de 1 enero 2010 | < 6 meses de edad o antes de abandonar la explotación. < 9 meses en caso de ganadería extensiva. Antes de abandonar la explotación. |

2.2.3 Normativas de trazabilidad en el mercado global

Las medidas para trazar animales y sus productos a través de los sistemas de producción han sido incorporadas en estándares internacionales como el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (SPS) de la Organización Mundial del Comercio (OMC). Este acuerdo provee a los países miembros de la OMC de un derecho a poner la trazabilidad en ejecución como una medida SPS. Sin embargo, este derecho va

acompañado de ciertas obligaciones. Las medidas deben estar basadas en una protección de los riesgos, estar científicamente justificadas, apropiadas a las circunstancias, no ser más restrictivas de lo que requiere el comercio, y aplicadas constantemente, incluyendo el país que impone las medidas y otros países.

Las medidas que se basan en estándares internacionales se consideran necesarias. Si fuera requerido por el país exportador, los países importadores deberán considerar cualquier demanda de equivalencia de medidas de manejo de riesgo alternativo y deberán adaptar las medidas a las condiciones regionales (Wilson y Beers, 2001; OMC, 2005).

La trazabilidad no se cita específicamente en los acuerdos de la OMC, sin embargo, el uso de medidas que incorporan trazabilidad está cubierto por estos acuerdos. Aunque no está referido directamente en el Acuerdo SPS, la trazabilidad se puede asignar por mandato como medida SPS por el país importador como requisito específico, o puede ser una medida propuesta por el país exportador como equivalente a las medidas requeridas por el país importador (Wilson y Beers, 2001).

En 2001 la Comisión Económica para Europa de la Organización de las Naciones Unidas (UN/ECE) concluyó el proyecto iniciado en 1997 que tuvo por objeto la creación de un lenguaje internacional para carne bovina. Se trata de un sistema de estandarización, nomenclatura y numeración de los atributos de los productos, desarrollado por expertos de las principales regiones productoras y exportadoras del mundo, para facilitar el comercio internacional de carne bovina, permitiendo superar las dificultades de comunicación técnica entre compradores y vendedores. Las especificaciones son transmitidas por medio de mensajes electrónicos estandarizados y los embalajes son identificados con códigos de barras que pueden estar asociados a trazabilidad individual o por lote (EAN International, 2002; Yordanov y Angelova, 2006).

Este sistema de trabajo para los cortes de carne debe ser precedido por sistemas de trazabilidad con captura automática de datos, procesamiento de los mismos y comunicación electrónica de las informaciones sobre la producción y procedencia de los animales. La diversidad de los sistemas de producción de ganado en el ámbito internacional y las múltiples prácticas utilizadas por las diferentes cadenas de suplementos requieren una visión completa de toda la cadena, lo que sólo es posible con patrones internacionales de comercio, como por ejemplo los patrones del European Article Number y Uniform Code Council (EAN, UCC). La unión de ambos ha generado el llamado Sistema GS1 dedicado al diseño e implementación de estándares y soluciones globales

para mejorar la eficiencia y visibilidad de las cadenas de suministros y la demanda a nivel mundial (EAN International, 2002; Shanahan et al., 2009; GS1, 2010).

La clave para la elaboración de sistemas de trazabilidad eficientes y económicos, es conseguir satisfacer a distintos clientes y necesidades legales por medio de la aplicación de un patrón global. El sistema utilizado debe facilitar el manejo eficaz de la cadena de producción y el comercio internacional, así como ofrecer herramientas estandarizadas que permitan a todos los actores de la cadena productiva comunicarse a través de un lenguaje global de negocios. El GS1 ha hecho esfuerzos para crear estos patrones globales de trazabilidad bovina (GS1, 2010).

Un ejemplo de ellos son los códigos de barras de EAN-UCC (ahora llamados GS1) como portadores de datos. Un código de barras consiste en una serie de barras (oscuras) y espacios (blancos) verticales, paralelos y contiguos utilizados para representar números mediante patrones de anchura predeterminados. Estos datos pueden ser el Número de Artículo Comercial Global (GTIN) en sí mismo, o cualquier información adicional atribuida al artículo. La lectura se realiza mediante un láser que permite la recogida de datos con rapidez y precisión en tiempo real (EAN International, 2002; GS1, 2010).

El sistema de numeración de GS1 ofrece una exclusividad global que elimina los problemas de duplicación e interpretación errónea, pues todos los usuarios del sistema GS1 en el mundo siguen las mismas reglas de codificación. Una numeración GS1 es reconocida no sólo por empresas locales que están asociadas entre ellas, sino que también por empresas que operan en el exterior. Cada número de GS1 es exclusivo en el mundo entero de forma inequívoca. Este sistema de numeración también ofrece la posibilidad de cargar informaciones adicionales, como por ejemplo un número de referencia de una compañía o industria, fecha de faena; número de crotal del animal, etc. (EAN International, 2002; GS1, 2010).

A finales del año 2000, el Grupo de Expertos Europeos de la Carne (EMEG) junto con EAN Internacional, examinaron las implicaciones del Reglamento CE 1760/2000, sobre el etiquetado de la carne de bovino, y como se podría aplicar el sistema EAN-UCC al servicio de la cadena de producción de la carne bovina.

Así se creó la “*Guía de trazabilidad de la carne bovina*”. El objetivo de esta guía es proporcionar una solución para la implementación del reglamento antes mencionado utilizando una numeración y un sistema de código de barras aceptados internacionalmente (EAN International, 2002). La guía está pensada para los estados miembros de la UE,

países no pertenecientes a la UE que exportan a los estados miembros de la UE, así como para países que no son parte de la UE y que han decidido adoptar la regulación de etiquetado de la carne para hacer trazabilidad de la cadena de producción de carne bovina (EAN International, 2002).

Las exigencias de los mercados consumidores para comprar carne bovina son cada vez mayores. Cada vez se desarrollan más y se hacen más rigurosas las reglamentaciones y normativas legales obligatorias que regulan el funcionamiento de los sistemas de trazabilidad que se aplican a la producción doméstica de carne de esos países. Gradualmente esas mayores exigencias se van trasladando a la carne importada (Dagg et al., 2006).

2.3 MÉTODOS PARA LA TRAZABILIDAD ANIMAL Y SUS PRODUCTOS

2.3.1 Concepto y necesidades de los esquemas de trazabilidad

Uno de los aspectos más difíciles de conseguir en los esquemas de aseguramiento de calidad es su confiabilidad. Para garantizar la trazabilidad de la carne, se debe establecer un sistema de control y verificación a través de toda la cadena de producción. Diversos procedimientos se pueden aplicar para asegurar el origen de animales, de las canales y de los cortes, tales como: doble crotal de identificación, pasaporte animal, identificación del matadero, y etiquetado certificado de la carne. Sin embargo, la verificación de fraude necesita grandes esfuerzos en estrategias y técnicas de control para verificar el origen de la carne “a posteriori” (McKean, 2001; Arana et al., 2002).

El proceso de trazabilidad en los productos de origen animal, se inicia con la identificación al *Nacimiento* (1), se prolonga durante toda la vida del animal en la *Granja* (2), continúa con el *Transporte al matadero* (3), con la posterior transferencia de identificación a la canal después del sacrificio en el *Matadero* (4) y a los cortes que se originan en el *Despiece* (5), así como su posterior *Transporte y Distribución* (6), hasta llegar el producto final a los *Puntos de venta* (7) (McKean, 2001; Caja et al., 2002; Ghirardi, 2006).

Al implementar un sistema de trazabilidad de animales y de sus productos se deben identificar los elementos básicos que lo componen, estos son (Caporale et al., 2001; Caja et al., 2002; Ammendrup y Barcos, 2006):

- Los dispositivos de identificación;
- Registros de actividades (movimientos);
- Bases de datos (centralizadas o interconectadas); y
- Sistema de validación del conjunto (auditoría externa).

Al diseñar o evaluar un esquema de trazabilidad se deben considerar tres aspectos claves:

- Creación de una Base de Datos eficiente. Para ello es fundamental determinar qué datos se incorporan en la misma, de forma que se pueda suministrar a los consumidores toda la información requerida y, por otro lado, contenga datos de utilidad para el productor o que hagan sus productos diferentes de los de la competencia o les agreguen valor.
- Procedimientos de recogida de los datos a nivel de campo y formato de almacenamiento en la Base de Datos para disponer al instante de la información procesada, evitando costes innecesarios y exceso de burocracia.
- Elección del sistema adecuado para la identificación de los animales. Este deberá estar vinculado a los puntos anteriores para mejor eficiencia del sistema.

Estos tres factores contribuyen mayoritariamente al valor de la inversión de un sistema de trazabilidad y deben ser considerados como una unidad en el momento de ponerlo en práctica a fin de conseguir la máxima eficiencia. De nada sirve invertir en el más sofisticado sistema de identificación de los animales si no se tienen en cuenta los primeros dos puntos. Lo mismo ocurre a la inversa (Duran, 2001).

2.3.2 Elementos de un sistema de trazabilidad animal

2.3.2.1 Sistemas y dispositivos de identificación animal

Uno de los puntos claves en la trazabilidad de animales y de sus productos es la implementación de un sistema eficiente de identificación animal, lo que es además el punto de partida de la totalidad del proceso. La trazabilidad animal actual requiere, al menos, el uso de un código de identidad único para cada animal y de un sistema creíble y verificable para asegurar la identidad (Caporale et al., 2001; McKean, 2001; Caja et al., 2002; Ammendrup y Barcos, 2006).

Actualmente se dispone de una amplia gama de tecnologías para su aplicación en la identificación de animales y de sus productos, pero sorprendentemente, pese a los cambios observados en las últimas décadas, los sistemas de identificación modernos y tradicionales coexisten en muchos países (Caja et al., 2002; 2004; Felmer et al., 2006; Ghirardi, 2006).

Los sistemas de identificación animal pueden clasificarse en dos grandes grupos de acuerdo a la naturaleza de los caracteres utilizados (Caja et al., 2004; Felmer et al., 2006; Ghirardi, 2006): naturales y artificiales.

2.3.2.1.1 *Sistemas basados en caracteres naturales*

Los caracteres naturales, también llamados biométricos, son rasgos propios del animal. Todos ellos se basan en la existencia de una suficiente variabilidad natural de los caracteres que puede ser utilizada para diferenciar individualmente a cada animal (Caja et al., 2004; Felmer et al., 2006; Ghirardi, 2006). Pueden clasificarse según utilicen caracteres:

- *Visibles o externos*: características de los faneros y sus accidentes, como son el color y patrón de la capa, alteraciones del pelo, nasograma, etc. (Standford et al., 2001; Minagawa et al., 2002; Barry et al. 2007).
- *No visibles o internos*: necesitados de procedimientos especiales de lectura o análisis, como es el caso de grupos sanguíneos, imagen del iris o la retina, ADN, etc. (Musgrave y Cambier, 2002; Dziuk, 2003; Golden, et al., 2004).

La identificación animal basada en caracteres naturales visibles presenta ciertas desventajas, como la laboriosidad de su realización (confección de reseñas, diseño, dirección del pelo, etc.) o las dificultades de su interpretación (diseño, nasograma, etc.), especialmente con operadores poco habituados. El empleo de nuevas tecnologías ha ayudado a superar algunas de estas desventajas (como es el caso de la fotografía digital y tratamiento de imágenes), pero las posibilidades de automatización de la lectura son muy escasas (Caja et al., 2004; Ghirardi, 2006; Burghardt y Campbell, 2007).

Por otro lado, el uso de caracteres naturales externos se ve muy limitado o puede conducir a errores cuando el número de animales a identificar es elevado o los animales presentan características fenotípicas parecidas. Ninguno de estos métodos es utilizado de forma rutinaria para la identificación de animales de abasto.

El uso de caracteres naturales internos, especialmente en el caso de imágenes retinales y de los polimorfismos de ADN, es de alta fiabilidad para la identificación. Sin embargo, la verificación de la identificación no puede ser realizada de forma inmediata puesto que requiere de una serie de procesos más o menos laboriosos, por esta razón se han valorado más como métodos de auditoría de un sistema de trazabilidad que como sistemas de identificación en sí mismos (Sanchez, 2002; Golden et al., 2004; Ghirardi, 2006). Las principales características de estos caracteres naturales mencionados y su uso como métodos de identificación son comentadas con mayor profundidad en un apartado desarrollado posteriormente, ya que la evaluación de este tipo de marcadores es uno de los objetivos de la presente tesis.

2.3.2.1.2 Sistemas basados en caracteres artificiales

Las limitaciones prácticas del uso de caracteres naturales han llevado a desarrollar diversos métodos que utilizan materiales o procedimientos externos para generar caracteres artificiales, la mayor parte de tipo visible. Dentro de este segundo grupo se distingue (Blancou, 2001; Landais, 2001; Caja et al., 2004) entre los que se basan en:

- *Producir marcas o señales* en el cuerpo del animal mediante procedimientos físicos o químicos (hierros candentes, muescas o señales en orejas y cuernos, tatuajes, decolorantes del pelo, corrosivos de la piel y el pelo, etc.)
- *El uso de dispositivos* en los que se incluye un código de identificación y que se aplican externa o internamente al animal.

Algunos de los métodos artificiales de identificación que se aplican directamente sobre el animal, como las marcas a fuego y las señales, aun se siguen utilizando en algunos países como sistemas oficiales para realizar registros en libros genealógicos de varias razas animales (Caja et al., 2004).

Actualmente, la importancia de la identificación animal y sobre todo que ésta sea individual, permanente e inalterable, está justificada por la puesta en marcha de programas de seguridad sanitaria, alimentaria, por la certificación de productos de origen animal, y por la defensa de marcas comerciales y denominaciones de origen.





La utilización de dispositivos tanto externos como internos es una práctica común en la ganadería actual. Se utilizan unos u otros según la especie, necesidades y manejo de cada explotación (Caja et al., 2004; Ghirardi, 2006). Un resumen de los distintos métodos de

identificación se presenta en la Tabla 2.2.

A efectos de implementar un esquema de trazabilidad de animales y de sus productos, algunos sistemas destacan actualmente por su interés práctico, reducido coste o posibilidades de automatización. Resultan de especial interés actual en ganadería:







- a) *Crotales convencionales*: Son los dispositivos externos más utilizados en la actualidad para la identificación individual de animales de interés ganadero. Pueden ser de diversas formas (tipo bandera, botón), materiales (plástico, metal), tamaños y colores. La tasa de retención de los crotales es extremadamente variable (60 a 98%) dependiendo de las características del crotal utilizado, la especie, raza y condiciones ambientales (Caja et al., 2004; Santamarina et al., 2007; Carné et al., 2009). La resistencia a las condiciones ambientales es una de las características críticas para la elección del material con el que se fabrican. El lugar donde se coloca el crotal es específico de cada tipo y especie, así como igualmente crítico para su permanencia en el animal. Debe tenerse en cuenta además que los crotales son cuerpos extraños al animal, por lo que deben estar fabricados en materiales biocompatibles. Sin embargo, se citan reacciones alérgicas e infecciones secundarias, posteriores a la aplicación, que dilatan el orificio de fijación y originan pérdidas (Wardrope, 1995; Edwards, et al., 2001; Ghirardi, 2006). Los crotales de poliuretano son los más utilizados actualmente y, cuando están bien diseñados y adaptados a la especie y raza animal, son una opción recomendable para la identificación de rumiantes. Sólo deben ser considerados como un sistema de identificación oficial y permanente cuando son a prueba de fraude y no reutilizables (Caja et al., 2004; Felmer et al., 2006). Dado el crecimiento en el intercambio global y las preocupaciones del consumidor por la seguridad alimentaria, hoy en día se requieren sistemas más rápidos y efectivos de identificación y verificación animal que los clásicos crotales o registros manuales, pues una de las principales consideraciones para un sistema de identificación y verificación animal es que permita la adquisición de la información en forma rápida y segura (Felmer et al., 2006).

Tabla 2.2. Métodos de identificación animal artificiales basados en marcas corporales y en la aplicación de dispositivos.

| Sistema | Dispositivo | Descripción | Ventajas | Inconvenientes | Precio | | Figura |
|----------------------------|--------------------------|--|--|--|---------------|----------------------|---|
| | | | | | Compra (US\$) | Uso ¹ (%) | |
| M A R C A S | Marcado a fuego (hierro) | Marca con hierro incandescente. Tipo de marcas: a) de propiedad (letras, anagrama) b) individual (números) | Fácil aplicación. Visible a media distancia Permanente. Bajo precio. | Impresión defectuosa. Poco visible con cambios de pelaje. Depreciación del cuero. Afecta bienestar animal. Riesgo de deformarse. | 0,1-0,2 | 152-130 |  |
| | Marcado al frío | Marca con nitrógeno líquido (decolorante) que destruye los melanocitos. | Fácil aplicación. Visible distancia. Persistente. No deprecia el valor del cuero. | Imposible uso en pelajes muy claros. Grabado irregular. Fraude al teñir el pelo. | 0,1-0,3 | 161-142 |  |
| C O R P O | Marcado por corrosión | Marcas con sustancias corrosivas (depilatorios) que destruyen los folículos pilosos. | No deprecia el valor del cuero. Nítido y rápido. Visible a distancia. | Técnica laboriosa y difícil de controlar en la intensidad y extensión la acción depilante. | 0,2-0,3 | - | |
| | Tatuaje | Marca en dermis o mucosas mediante el depósito de tinta no degradable. | Permanente. No deprecia el valor de partes de interés comercial. | Laboriosa y cuidadosa aplicación. Dificultad de lectura en pieles oscuras. Deformación con el crecimiento. Confusión de números. | 0,3-0,4 | 259-220 |  |
| L E S | Señales | Muecas en las orejas según códigos numéricos preestablecidos. | Fácil aplicación. Bajo precio. | Códigos complejos. Afecta bienestar animal. Alterable por heridas o amputaciones. Infecciones secundarias. | 0,01-0,05 | 147-123 |  |

¹ Precio relativo respecto a crotales visuales. Incluye: Mano de obra, lectores, y uso de base de datos.

Tabla 2.2. Métodos de identificación animal artificiales basados en marcas corporales y en la aplicación de dispositivos.

| Sistema | Dispositivo | Descripción | Ventajas | Inconvenientes | Precio | | Figura |
|--|---|--|---|---|---------------|---|---|
| | | | | | Compra (US\$) | Uso ¹ (%) | |
| Dispositivos corporales | Crotales | Dispositivos de plástico o metal de variadas formas, aplicados en orejas de los animales. | Fácil aplicación y lectura. Bajo costo. Pueden incluir letras y códigos de barra. | Facilidad de adulteración y problemas de lectura posterior debido al daño por mordidas o roturas. Pérdidas. | 0,1-0,6 | 100 |  |
| | Otros: collar, brazaletes, etc. | Dispositivos de diversos materiales que se colocan en cuello o extremidades. | Fácil aplicación. | Facilidad de adulteración y reemplazo. Identificación temporal | 0,4-0,8 | - |  |
| | Inyectables | Transpondedor se inyecta en el cuerpo del animal dentro de tejido subcutáneo, intramuscular o en otras regiones corporales. | Fácil aplicación. Difícil adulteración. | Pérdidas y roturas directamente relacionadas con el lugar de aplicación. Riesgos de residuos del dispositivo en la carne. | 1,0-2,0 | - |  |
| Dispositivos de identificación electrónica | Crotales | Transpondedor incluido dentro del material plástico, ya sea el que forma el crotal, o en discos electrónicos que se fijan a crotales convencionales. Se aplican en orejas. | Fácil aplicación. Sencilla y segura recuperación en matadero. | Pérdidas, fallos electrónicos. Vulnerables al fraude por su facilidad para ser retirados o sustituidos por otros. | 1,0-2,5 | 134-162 |  |
| | Bolos ruminales | Transpondedor incluido en una cápsula de cerámica, plástico o metal. Se administra vía oral y se queda en forma permanente en los pre-estómagos de rumiantes. | Fácil aplicación. Difícil adulteración. Retención alta. Fácil recuperación en matadero. | Riesgo de heridas y obstrucciones esofágicas. No visibles desde el exterior sin equipos de lectura. | 1,0-2,5 | 134-162 |  |
| Otros (Collares y brazaletes) | Transpondedor incluido dentro de material plástico que se coloca en cuello o patas a través de un elemento de | Fácil aplicación y gran distancia de lectura. | Posibilidad de adulteración y reemplazo. Edad crítica de aplicación. | 65,0 | 2958-2462 |  | |

Fuente: Comill, 1999; Garín, 2002; Ghirardi, 2006; Caja et al., 2004, 2007a.

b) *Dispositivos electrónicos de identificación*: la necesidad de disponer de métodos de identificación animal que faciliten la trazabilidad de sus productos y que puedan ser usados globalmente despertó el interés por la identificación electrónica (IDE) mediante dispositivos pasivos de radiofrecuencia (RFID) que utilizan radiaciones electromagnéticas no ionizantes (Caja et al., 2002, 2004). Estas características permiten que los tejidos del animal sean penetrados con pocos efectos de radiación o atenuación en medios acuosos. Los sistemas de IDE actuales están constituidos por dispositivos electrónicos pasivos (sin baterías) de pequeño tamaño, llamados transpondedores, que son activados a distancia por unidades de lectura llamadas transceptores. El término transpondedor deriva de las palabras inglesas transmitter (transmisor) y responder (respondedor) y define a los dispositivos electrónicos de radiofrecuencia capaces de almacenar y posteriormente transmitir una información (código) que servirá para identificar de manera individual a un animal portador del mismo. El término transceiver (transceptor) deriva de las palabras inglesas transmitter, (transmisor) y receiver (receptor) y define a los dispositivos electrónicos capaces de activar y recibir la respuesta de los transpondedores (Conill, 1999; Caja et al., 1998a; 2002). Después de la transmisión de información y la descarga de energía almacenada, el transpondedor queda inactivo hasta el siguiente ciclo de activación. La comunicación entre el transpondedor y el lector puede hacerse usando sistemas de transmisión alterna (half-duplex, HDX) o simultánea (full-duplex, FDX) que han sido estandarizados por las normas de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO, por su sigla en inglés) 11784 y 11785 (ISO, 1996, 2009).

El Comité Internacional para el Registro Animal (ICAR, por su sigla en inglés) ha autorizado una serie de dispositivos electrónicos para su uso en identificación animal entre los que destacan los siguientes (ICAR, 2009):

i) *Inyectables*: Para todas las especies animales y en una amplia variedad de tamaños. El transpondedor está cubierto por una cápsula de vidrio biocompatible (recientemente también de plástico) y se inyecta a través de una aguja en diferentes partes del cuerpo de los animales como axila, base de la oreja, metatarso, ingule, base de la cola, etc. (Lambooij et al., 1995; Caja et al., 1998b; Conill et al., 2002; Hogewerf et al., 2009). El uso de inyectables está limitado por las pérdidas, roturas por golpes en la zona inyectada y por la necesidad de recuperación en los animales que van a matadero. Además, la recuperación en matadero está condicionada por la

migración del transpondedor en los distintos tejidos, lo cual está condicionado por la reacción de incompatibilidad frente a cuerpos extraños (Conill et al., 2002; Abecia et al., 2004; Caja et al., 2005; Carné et al., 2009). Sin embargo, como el transpondedor inyectable es el único dispositivo de IDE que permanece, en la mayor parte de los casos, en la canal del animal, se puede utilizar como método de trazabilidad en la línea de matanza de un matadero, haciendo una lectura al principio y al final de la línea (Abecia et al., 2004; Caja et al., 2005). Últimamente también se ha evaluado el uso de transpondedores inyectados intraperitonealmente, donde se demostrado su ausencia en la canal (Caja et al., 2005; Babot et al., 2006; Hogewerf et al., 2009).

- ii) **Crotales electrónicos:** Para todas las especies animales. El transpondedor está incluido en la parte hembra de un crotal de plástico del tipo botón. Al igual que con los crotales convencionales es importante tener en cuenta las pérdidas y daños causados en las orejas por reacciones alérgicas e infecciones. La capacidad de lectura se ve afectada por pérdidas, roturas y fallos electrónicos. La reducción de la capacidad de lectura debido a pérdidas de dispositivos es relativamente baja en rumiantes en condiciones intensivas. En ovinos se han reportado niveles medios de pérdidas del 3,2%, siendo principalmente debido a infecciones post-aplicación y desgarros por enganche de los crotales en objetos (Rusk, 2002). En el caso del bovino las pérdidas también son bajas si se considera solo el periodo de cebo en terneros, pero si se amplía al ciclo productivo completo, las pérdidas pueden llegar al 10% (Ghirardi, et al., 2005). En caprinos adultos las pérdidas son algo más altas que en ovinos, aunque no se han establecido claramente las causas de dichas pérdidas (Caja et al., 1998c). Resultados obtenidos recientemente en cabritos muestran casos de un 100% de retención (Carné et al., 2009). En general, los crotales electrónicos han demostrado buenos resultados para IDE en rumiantes, siempre y cuando cuenten con un sistema de cierre antifraude.
- iii) **Bolos electrónicos:** Exclusivamente para rumiantes. El transpondedor se coloca dentro de una cápsula de alta gravedad específica (bolo) que se aplica oralmente, quedando en forma permanente retenido en los pre-estómagos de los rumiantes, principalmente en el retículo (Caja et al., 1999). Los bolos suelen estar hechos de materiales cerámicos densos ya que se requiere de un material radio-translucido. Las características de tamaño y peso condicionan los niveles de retención obtenidos, así como la edad mínima y peso corporal al cual pueden ser administrados (Ghirardi et

al., 2006ab; 2007; Castro et al., 2010). El bolo ruminal ha adquirido una mayor relevancia en rumiantes debido a que presenta una elevada retención en condiciones extensivas, no muestra fallos ni roturas, es de difícil alteración o fraude, y fácilmente administrable y recuperable en el matadero. Además, es inocuo y seguro para el animal, pues no se han observado efectos negativos sobre la salud ni el rendimiento productivo de estos, así como tampoco se han observado efectos negativos en la ingestión y digestibilidad de los alimentos (Caja et al., 2002, 2004; Garín et al., 2003; Caja et al., 2004; Ghirardi et al., 2007). Los valores de retención obtenidos con los tipos de bolos electrónicos usados actualmente en ovinos y bovinos son altas, pero no así en el caso de los caprinos, donde los resultados son variables según raza y rebaño (87,5 a 100%) (San Miguel et al., 2005; Capote et al., 2005; Carné et al., 2009). Debido a esto se requiere el uso de bolos optimizados en cuanto a tamaño, peso y gravedad específica, tal como recientemente se ha obtenido para el caso específico del ganado caprino (Carné et al., 2010).

- iv) Pulsera electrónica: El transpondedor está incluido dentro de una capsula de protección primaria que posteriormente se fija o incluye dentro de otro material, por lo general plástico, que luego se ajusta a la pata del animal. Estudios recientes han utilizado estas pulseras para la IDE de caprinos obteniendo resultados óptimos en cuanto a capacidad de lectura (>98%) (Carné et al., 2011).

2.3.2.2 Bases de datos

El desarrollo de una base de datos es uno de los aspectos más importantes y complejos que tiene relación con la identificación, registro y trazabilidad animal. Sus principales objetivos son: mantener un registro actualizado de todas las explotaciones, rebaños, animales, propietarios o responsables; informar sobre las altas, bajas y movimientos de los animales; informar sobre los dispositivos de identificación distribuidos a los granjeros; informar sobre el estado sanitario de individuos, rebaños y explotaciones; suministrar información para autorizar movimientos (en comercio nacional y exportación) y la certificación de los animales; trazar el movimiento de animales para usos sanitarios y productivos; proporcionar los datos necesarios para el etiquetado de la carne; suministrar datos para los esquemas de pago de ayudas; permitir mantener el registro actualizado de las explotaciones; y suministrar información estadística a los diferentes departamentos del

gobierno (Bambauer, 2007; Sprenger, 2007).

España ha realizado muchos esfuerzos en la implementación de la EID y ha desarrollado distintas bases de datos para ello (Maté, 2009). La primera y mas importante fue RIIA (Registro de Identificación Individual de Animales). Esta base de datos se interconectó con las ya previamente establecidas REGA (Registro general de Explotaciones Ganaderas), que incluye datos GIS (Geographic Information System), y REMO (Registro de Movimientos de especies de interés ganadero). Las 3 bases de datos constituyeron así SITRAN (Sistema Integral de Trazabilidad Animal).

En estas bases se almacena la información relativa a cada animal (código de identificación, fecha de nacimiento, sexo, raza, identidad de su madre, código de la explotación de nacimiento, datos sanitarios, país de nacimiento, relación de movimientos y códigos de las explotaciones por las que ha pasado, etc.) y también numerosos datos sobre todas las explotaciones (identificación, coordenadas GPS, tipo de explotación, datos de la misma, del titular, identidad del veterinario responsable, estado sanitario) y en particular, su censo en cualquier fecha de los 3 últimos años. Dada la gran y valiosa información que contiene, la base de datos se convierte en una pieza clave para el comercio del ganado y para la gestión de primas o ayudas comunitarias (Ghirardi, 2006).

2.4 SISTEMAS BIOMÉTRICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y TRAZABILIDAD ANIMAL

Un sistema biométrico permite el reconocimiento o verificación automático de la identidad de un individuo basado en características biológicas. Es esencialmente un sistema de reconocimiento de patrones que opera mediante la adquisición de datos biométricos de un individuo, extrayendo un conjunto de características de ellos. Luego la muestra se transforma, utilizando algún tipo de función matemática, en una plantilla biométrica. Esta plantilla proporcionará una representación normalizada, eficiente y discriminatoria de la característica estudiada, que puede así ser objetivamente comparada con otras plantillas con el fin de determinar la identidad de un individuo.

La mayoría de los sistemas biométricos permiten dos modos de funcionamiento: un modo de inscripción para agregar plantillas a una base de datos, y un modo de identificación, donde se crea una plantilla para un individuo para luego hacer una comparación contra esta plantilla preinscrita en la base de datos (Masek, 2003; Jain et al. 2004).

Cualquier característica biológica puede ser usada como sistema biométrico de identificación, siempre y cuando cumpla con los siguientes requisitos:

- Universalidad: cada individuo debe tener la característica.
- Distintivo: dos individuos deben ser lo suficientemente diferentes para la característica estudiada.
- Permanencia: la característica debe ser lo suficientemente estable durante un período de tiempo, a ser posible toda la vida del individuo.
- Medible: la característica se debe poder cuantificar.

En la práctica, un sistema biométrico debe ser rápido, preciso, inocuo, y suficientemente resistente a actividades de tipo fraudulento.

2.4.1 Sistemas biométricos en animales

En humanos, los sistemas biométricos se han desarrollado sobre la base de huellas dactilares, rasgos faciales, voz, geometría de la mano, escritura, imágenes de la retina y el iris. En el caso de los animales, los sistemas utilizados se han basado en caracteres o rasgos naturales propios del animal. Resulta imprescindible la existencia de una suficiente variabilidad natural de los caracteres que pueda ser utilizada para diferenciar a cada animal (Caja et al., 2004; Gonzales-Barron and Ward, 2005; Felmer et al., 2006; Ghirardi, 2006).

Como se ha mencionado previamente, los sistemas biométricos se clasifican según se basen en características externas y visibles (alteraciones del pelo, huellas nasales, etc) o en características internas y no visibles (análisis de ADN, grupos sanguíneos, imagen del iris, de la retina, etc.).

Entre los más importantes en animales, destacan:

2.4.1.1 Imagen del iris

La tecnología del reconocimiento del iris ha sido desarrollada para su uso comercial en humanos y probada experimentalmente en animales. Esta metodología se basa en la detección de las imperfecciones granulares en la periferia de la pupila, las cuales proporcionan diferencias únicas para cada ojo e individuo.

El proceso de reconocimiento del iris implica la adquisición de una imagen del ojo, donde el patrón del iris es extraído, codificado y almacenado en una base de datos, para posteriormente permitir la comparación de imágenes y el consecuente reconocimiento del individuo.

Aunque la captura de la imagen del iris puede realizarse rápidamente y de manera digital, su uso en identificación animal está limitado por el hecho que el patrón del iris no se estabiliza hasta que el animal tiene varios meses de edad. Además, dicho patrón se puede alterar como consecuencia de lesiones o infecciones oculares (Musgrave y Cambier, 2002; Dziuk, 2003; Gonzales-Barron y Ward, 2005).

2.4.1.2 Huella genética por polimorfismos del ADN

Esta tecnología se basa en el análisis del polimorfismo o variabilidad (cambios en la secuencia de nucleótidos) que se observa en el genoma. La extracción de ADN se realiza de cualquier tejido o líquido tisular que posea células nucleadas. Para identificación animal, lo más común es utilizar sangre, pelos y tejido de la oreja del animal al momento de la crotalación (Figura 2.2)

Una vez extraído el ADN se amplifica usando la “reacción en cadena de polimerasa” (PCR) y se analizan los cambios en la secuencia de nucleótidos (Cunningham y Meghen, 2001; Dalvit et al, 2007). Cada región polimórfica analizada se puede utilizar como marcador genético para distinguir entre individuos, y el perfil combinado de un conjunto de marcadores genéticos permite la identificación individual, con la excepción de los gemelos monocigóticos y los clones, que son idénticos (Cunningham y Meghen, 2001).

Figura 2.2. Crotales especiales y su tenaza para la toma de biopsias de tejido auricular para análisis de ADN.



Diversos marcadores se pueden utilizar para obtener la huella de ADN, pero debido a su abundancia y alto grado de polimorfismo, los microsatélites son los marcadores tradicionalmente usados para la identificación genética en animales domésticos. Los microsatélites, también llamados STR (short tandem repeats), son repeticiones muy pequeñas, pero que proporcionan gran información sobre la diversidad y variabilidad genética de las poblaciones gracias a tres características fundamentales:

- Segregan siguiendo un patrón de herencia mendeliana.
- Están distribuidos en todo el genoma.
- Se componen de unidades repetitivas conservadas, generalmente de 2 a 6 pares de bases, pero que varían en el número de repeticiones. A consecuencia de esto último, en el largo promedio de una secuencia de un microsatélite (100-250 pares de bases) puede existir una gran diversidad de tamaños, pudiendo detectarse estas diferencias mediante las técnicas de biología molecular actualmente disponibles.

La Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) ha seleccionado, estandarizado y recomendado una serie de microsatélites que proporcionan la mayor información y que sirven como marcadores de referencia para distintas especies animales. Así, el perfil de ADN, a través del uso de un subconjunto de 8 a 12 microsatélites seleccionados (Arana et al., 2002; Sánchez, 2002), puede confirmar la identificación de una muestra respecto a otra de referencia, con niveles de probabilidad de 99,9%, lo que puede utilizarse para el proceso de verificación de la trazabilidad de animales y de su carne (Caja et al., 2002; Ghirardi, 2006; Hernández-Jover, 2006).

La dificultad para automatizar completamente el genotipado de los microsatélites, ha despertado el interés por nuevos tipos de marcadores genéticos, como los SNP (single nucleotide polymorphism), que son polimorfismos del ADN debido a sustituciones o inserciones/eliminaciones de nucleótidos simples. Los SNP son marcadores bialélicos y su grado de polimorfismo es consecuentemente más bajo que el de los STR. Sin embargo, como resultado de su abundancia en el genoma y la simplicidad de su análisis, son la alternativa de futuro para la identificación individual de animales y las auditorías de trazabilidad (Sánchez, 2002; Caja et al., 2004; Felmer et al., 2006; Dalvit et al, 2007).

2.4.1.3 Imagen retinal

2.4.1.3.1 Bases anatómicas

El ojo está formado por 3 capas o tunicas:

- Túnica externa (esclerótica y córnea)
- Túnica media o úvea (coroides, iris y cuerpo ciliar)
- Túnica interna o retina.

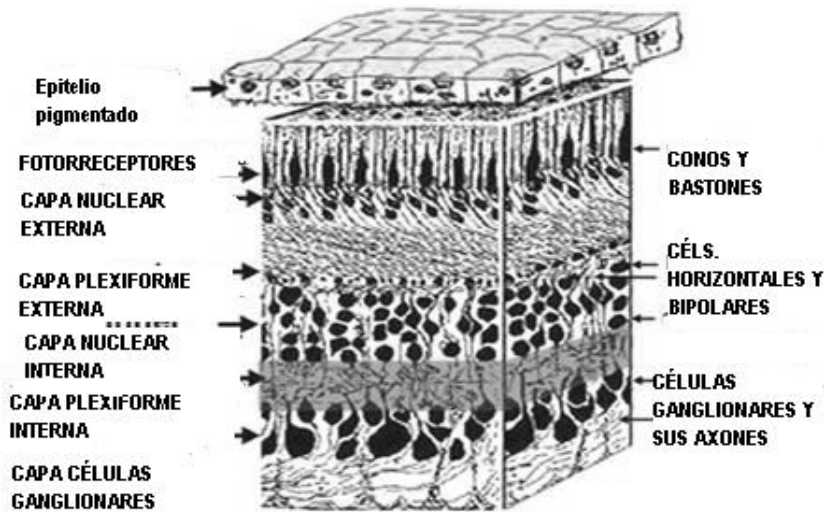
La retina a su vez forma parte del denominado fondo ocular, donde además encontramos el disco óptico (punto central de la retina por donde salen del ojo los axones de las células ganglionares retinales); la mácula, la fóvea; y en algunos animales, el tapetum lucidum. El tapetum lucidum es una membrana que está inmediatamente detrás (o a veces dentro) de la retina, y cuya función es reflejar la luz a través de la retina, incrementando así la luz disponible para los fotorreceptores. Esto incrementa la visión en condiciones de poca luz.

La retina es un tejido sensible a la luz que recubre la superficie interna del ojo. El espesor de este tejido varía de 100 a 500 μm . Está formada por numerosas capas celulares y sinápticas que pueden ser divididas grosso modo en 2 capas (Figura 2.3): una capa externa fina y monocelular (conocida como el epitelio de la retina sensorial o epitelio pigmentado) y una capa interna sensorial compleja (conocida como la retina sensorial o retiniana) en la que se encuentran los receptores nerviosos.

La retina es uno de los tejidos metabólicamente más activos del cuerpo (Young, 1978) y sus capas están irrigadas por un complejo sistema arterio-venoso. La arteria retinal entra en el interior del ojo junto con el nervio óptico y luego se divide para irrigar las capas internas de la retina. El sistema venoso drena la sangre desde las capas retinales internas hacia una vena central retinal que sale del ojo también junto a la arteria y el nervio óptico.

La configuración geométrica (tamaño, forma, concentración y longitud de venas y arterias) del sistema arterio-venoso, o patrón vascular retinal, se produce durante el crecimiento fetal al igual que el resto de la vasculogénesis y angiogénesis (Funk, 1997; Galán et al., 2006; Allen et al., 2008).

Figura 2.3. Capas de la retina (Michaelson, 1980).



La ramificación que se observa en la angiogénesis retinal es un proceso complejo, que puede explicarse mediante la ecuación de Laplace, según la cual la suma de soluciones simples de funciones (u) doblemente diferenciables en tres dimensiones (x, y, z) resulta nula:

$$\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} = 0$$

Este mismo patrón de diferenciación es seguido por otros procesos naturales tales como la formación de afluentes de los ríos, las ramas y las raíces de las plantas (Peterson, 2001; Whittier et al., 2003; Master, 2004).

Las principales características propias del patrón vascular retinal son las siguientes (De Schaepdrijver et al., 1989):

- Presencia de una gran red vascular en la capa interior sensible a la luz.
- Extensión de los vasos sanguíneos desde el disco óptico hacia el margen entre la porción sensible e insensible a la luz.
- Compuesto por vasos pequeños ($<100 \mu\text{m}$ de diámetro) y grandes (100 y $200 \mu\text{m}$ de diámetro), estos últimos directamente visibles.

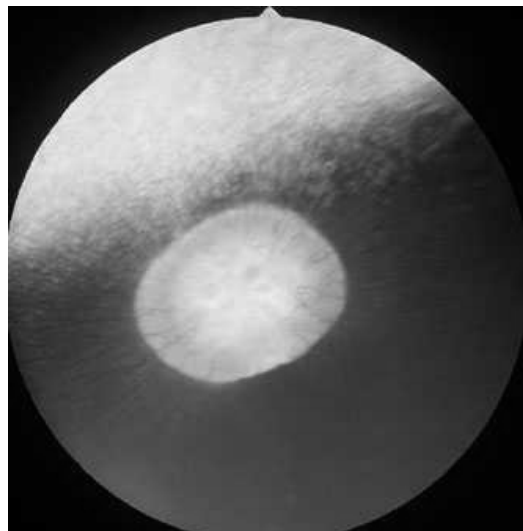
La vascularización ocular es diferente en cada especie en función del patrón vascular encontrado en el fondo de ojo (fundus). De esta manera se distinguen 4 tipos de patrones circulatorios intra-retinales (Bellhorn, 1997; Gonzales-Barron y Ward, 2005):

- a) Holangiótico: La retina interna está surcada por una red de vasos sanguíneos derivados de la arteria central retinal o de arterias cilio-retinales. Este patrón se observa en los primates, carnívoros, algunos marsupiales y roedores (ratas y ratones), ungulados artiodáctilos (rumiantes y suidos) y mamíferos marinos.
- b) Merangiótico: Sólo ciertas áreas de la retina interna está irrigada por los vasos retinales. Este patrón está presente en los lagomorfos (conejos y liebres).
- c) Parangiótico: Sólo una pequeña área de la retina que rodea al disco óptico está vascularizada por pequeñas arteriolas, vénulas y capilares. Este patrón se presenta en los solípedos (équidos).
- d) Anangiótico: Hay ausencia completa de vasos intra-retinales. Está presente en algunos roedores (conejo de indias).

2.4.1.3.2 Características del patrón vascular retinal en diferentes especies

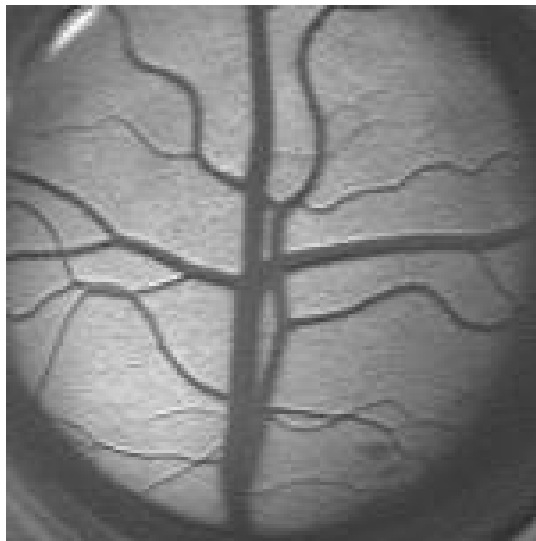
- **Equinos:** La vascularización retinal en los équidos es de tipo parangiótico y única respecto a con otros animales domésticos, puesto que casi el 95% de su retina es avascular (Figura 2.4). En la imagen retinal se observa un total de 60 a 70 vasos pequeños, donde es imposible diferenciar arteriolas de vénulas, que surgen desde el borde del disco óptico e irrigan una pequeña zona de la retina. El tapetum es fibroso y con una ligera melanosis. El disco óptico está situado ventralmente al centro del ojo, es elipsoide y levemente deprimido (Ehrenhofer et al., 2002; Gonzales-Barron y Ward, 2005).

Figura 2.4. Imagen retinal del equino (Gonzales-Barron y Ward, 2005).



- **Bovinos:** Los bovinos presentan un patrón vascular retinal holangiótico, con 3 venas principales las cuales son muy prominentes y 3 o más arteriolas. Normalmente la vena y arteriola dorsal se entrelazan una con otra (Figura 2.5). El tapetum es fibroso y está bien desarrollado. El disco óptico es ovalado horizontalmente o a veces redondo y a menudo tiene bordes irregulares (Bellhorn, 1997; Gonzales-Barron y Ward, 2005).

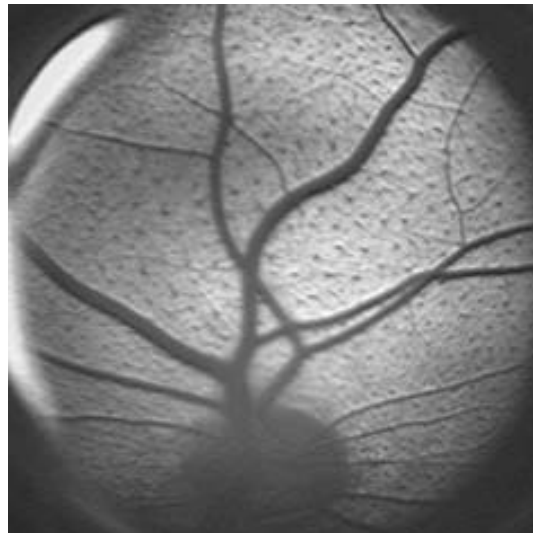
Figura 2.5. Imagen retinal del bovino capturada con el dispositivo Optireader.



- **Porcinos:** Al igual que los rumiantes, los porcinos presentan un patrón vascular retinal holangiótico, con 3 ó 4 arteriolas importantes que son de origen cilio-retinal. El sistema venoso se caracteriza por una red periférica importante que luego confluye en las venas principales próximo al disco óptico y siguen su curso junto a las arteriolas. Próximo al disco óptico, en la porción temporal de la retina, existe un área en la que los grandes vasos no se observan. El ojo del porcino no presenta tapetum. El disco óptico es horizontalmente elipsoide (Bellhorn, 1997; Gonzales-Barron y Ward, 2005).
- **Caprinos:** El patrón vascular retinal de los caprinos es holangiótico y muy similar al de los bovinos y ovinos. Los caprinos tienen 3 a 6 arterias retinales (1 a 3 dorsales y 2 a 3 ventrales) y 2 ó 3 venas retinales (1 dorsal y 1 ó 2 ventrales). Frecuentemente, las arterias se ramifican de una arteria común, la arteria principal, que emerge de la porción dorso-temporal del disco óptico. A veces esta arteria emerge perpendicular

desde el centro del disco óptico y se ve un punto común desde donde emergen las arterias. La región dorsal del fondo ocular es más vascularizada que la ventral, debido a la intensa ramificación de los vasos con un patrón dicotómico. Las venas llegan a la porción central del disco óptico, y en muchos casos se unen en una vena mayor antes de salir del fundus. Por otra parte, 4 a 8 vénulas y arteriolas se irradian desde el disco óptico hacia la región temporal y medial del fondo ocular. El disco óptico puede ser redondo u ovalado. Por lo general el borde pigmentado está muy delimitado, aunque puede ser una zona de transición difusa debido a la intensa mielinización del disco. Un anillo ovalado con pigmentación rodea la cabeza del nervio óptico (Figura 2.6) (Gonzales-Barron y Ward, 2005; Galán et al., 2006).

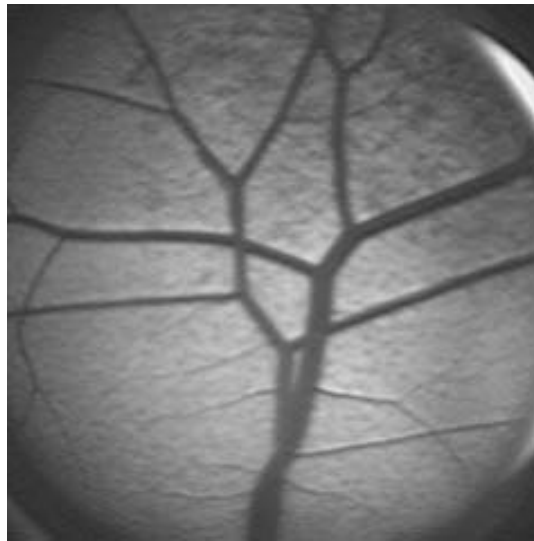
Figura 2.6. Imagen retinal del caprino capturada con el dispositivo Optireader.



- **Ovinos:** El patrón vascular retinal de los ovinos es holangiótico y también muy similar al de los bovinos y caprinos, aunque más homogéneo que en los caprinos. Presenta 3 ó 4 pares de vasos: arterias y venas dorsales (ventral, ventro-nasal y ventro-temporal). Es común encontrar la vena ventral o la arteria ventro-nasal sola, sin su correspondiente par. Adicionalmente, 5 a 8 arteriolas y vénulas se irradian desde la porción medial y temporal del disco óptico. Todos estos pares de vasos retinales se pueden entrelazarse unos con otros, aunque este hecho es más evidente en los vasos dorsales debido a su gran tamaño. Las arterias pueden emerger desde 2 ó 3 puntos diferentes de la periferia del disco óptico: dorsal, dorso-temporal y dorso-nasal. Por otro lado, al igual que en los caprinos, las venas convergen en la porción

central del disco óptico. La ramificación arterial y venular no es muy intensa y sólo unas pocas vénulas y arteriolas secundarias son visibles. Todos los vasos retinales siguen un curso recto y la mayoría de las veces las ramificaciones son en ángulos de 90 a 120°. El disco óptico es elíptico o arriñonado. Tiene un borde pigmentado, pero muchas veces es confuso y puede pasar desapercibido debido al pigmento de la zona no-tapetal (Figura 2.7) (Gonzales-Barron y Ward, 2005; Galán et al., 2006).

Figura 2.7. Imagen retinal del ovino capturada con el dispositivo Optireader.



2.4.1.3.3 Patrón vascular retinal como identificador biométrico

La identificación por imagen retinal se basa en la premisa que el patrón vascular retinal es único para cada animal y está presente desde el nacimiento y no cambia durante la vida del animal (Whittier et al., 2003; Gonzales-Barron et al., 2008).

Las imágenes de la retina se adquieren a través de la pupila con un dispositivo óptico especialmente diseñado para capturar el patrón vascular retinal. En el caso de ganadería el dispositivo dispone normalmente de una videocámara digital de fondo ocular asociada a un ordenador portátil, el que a su vez está ligado a un sistema de posicionamiento global (GPS) que permite la encriptación automática de fecha, hora y lugar de la captura de la imagen, lo que hace al sistema prácticamente a prueba de fraudes (Optireader, Optibrand, Fort Collins, Colorado, USA). El dispositivo permite introducir información adicional como número de crotal, código de tratamiento, edad, sexo, etc. (Figura 2.8).

Figura 2.8. Equipo Optireader.

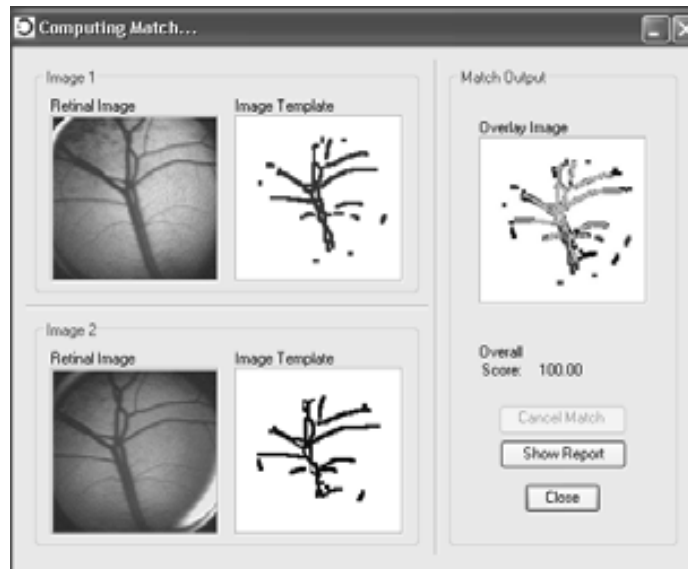


Para capturar las imágenes, la cámara se debe colocar a 1 cm del ojo del animal y en un ángulo de aproximadamente 45°, apuntando hacia la base de la oreja opuesta. La cámara tiene una fuente de luz que ilumina el fondo ocular y permite visualizar la vascularización de la retina en la pantalla del ordenador que está asociado a la cámara.

Las imágenes y datos recolectados se almacenan en archivos encriptados de tipo “blob” (binary large object), que posteriormente pueden ser transferidos a una base de datos central en línea a través de un software específico. Una vez ingresados estos archivos en la base de datos, las imágenes retinales pueden visualizarse como archivos “jpeg” y ser utilizadas para comparaciones posteriores.

El software incluye un sistema para realizar comparaciones de imágenes utilizando un algoritmo matemático que se basa en buscar el grado de similitud en tamaño, posición y ángulos de las ramificaciones de los vasos sanguíneos retinales observados entre pares de imágenes retinales. El software superpone las imágenes a comparar para calcular un índice de coincidencia que va de 0 a 100, donde cuanto más alto es el valor, más alta es la probabilidad que las imágenes comparadas pertenezcan al mismo ojo, y por lo tanto, al mismo animal (Allen et al., 2008) (Figura 2.9).

Figura 2.9. Comparación de imágenes retinales hechas por el software específico de Optibrand.



Es importante determinar un valor umbral del índice de coincidencia para aceptar o rechazar una imagen desconocida al compararla con una imagen de referencia tomada con anterioridad. Debido a que la identificación biométrica está basada en un carácter que es único, permanente e irreplicable, su utilización es muy precisa y a prueba de fraudes o de posterior pérdida de la identidad de un animal.

La tecnología de la imagen retinal ha sido usada para verificar la identidad en bovinos y ovinos (Allen et al., 2008; Gonzales-Barron et al., 2008; Barry et al., 2008), aunque no ha sido evaluada como una alternativa en tiempo real a la identificación por ADN para auditar la identidad de animales en esquemas actuales de trazabilidad, lo cual es objeto de la presente tesis.

CAPITULO 3

Objetivos

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

La presente tesis doctoral tiene por objeto la puesta a punto de la metodología de la imagen retinal y su uso como método de verificación de identidad en el ganado ovino tanto en condiciones de granja como de matadero.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcanzar el objetivo general antes mencionado, se diseñaron un total de tres experiencias con las que se pretendió conseguir los siguientes objetivos específicos:

3.2.1. Imagen retinal en corderos de engorde y reposición

- Determinación del período de entrenamiento necesario para que un operador consiga obtener imágenes retinales de calidad.
- Determinación del criterio de aceptación de imágenes para verificar la identidad de ganado ovino de diferentes edades.
- Evaluación de resultados del uso de la imagen retinal como método de verificación de la identidad de corderos marcados mediante crotales y bolos electrónicos hasta el año de edad.

3.2.2. Optimización del procedimiento de captura de imágenes retinales en ovino

- Determinación de la edad óptima desde el nacimiento a partir de la cual la imagen retinal puede ser usada como referencia para la verificación de la identidad en corderos de hasta un año de edad.

3.2.3. Auditoría de un sistema de trazabilidad basado en dispositivos visuales y electrónicos mediante el uso de la imagen retinal en condiciones de granja y matadero

- Evaluación del uso de crotales convencionales y bolos electrónicos en condiciones de granja experimental y comercial.
- Seguimiento de la transferencia de identidad de los corderos a sus canales en el matadero, en condiciones de sacrificio a pequeña y gran escala, mediante el uso de transpondedores inyectables y el etiquetado de las canales.
- Aplicación de las imágenes retinales como sistema de auditoría en línea para evaluar la trazabilidad de los corderos y de sus canales en condiciones de granja y de matadero, respectivamente.

CAPITULO 4

Experimento 1: Reconocimiento de la imagen retinal para la verificación de identidad de corderos de engorde y reposición

Retinal image recognition for verifying the identity of fattening and replacement lambs

CAPÍTULO 4

Reconocimiento de la imagen retinal para la verificación de identidad de corderos de engorde y reposición

Retinal image recognition for verifying the identity of fattening and replacement lambs

4.1 RESUMEN

Con el objetivo de verificar la presunta identidad de ovinos en un estudio de trazabilidad basada en el uso de crotales visuales y bolos electrónicos, se utilizó el reconocimiento de la imagen retinal como biomarcador para auditar la identidad de 152 corderos de 2 razas lecheras (Manchega, $n = 82$; Lacaune, $n = 70$). Los corderos fueron identificados con crotales temporales (nacimiento al destete), y crotales oficiales y mini-bolos electrónicos (destete al año de edad). A los 3 meses, 58 corderos quedaron como reposición y el resto se envió a matadero. Se registraron las imágenes retinales (RI) y el tiempo de captura (CT) del ojo izquierdo y derecho de cada cordero, por duplicado y por el mismo operador, utilizando un dispositivo Optireader (Optibrand, Fort Collins, CO) a los 3, 6 y 12 meses de edad en 152, 58 y 58 corderos, respectivamente. Las RI capturadas a los 3 meses se utilizaron como referencia, y para evaluar el entrenamiento del operador y la precisión de la técnica. Se hicieron comparaciones intra- e inter-edad para calcular el índice de coincidencia o “matching score” (MS, 0 a 100) de pares de RI del mismo ojo, usando un software de Optibrand. La habilidad del operador mejoró con las sesiones de entrenamiento, pero el MS alcanzó un valor estable después de la sexta sesión (264 imágenes; $MS = 93,2 \pm 1,5$). Los valores de CT también disminuyeron al comparar operador entrenado vs. no entrenado (63 ± 5 vs. 144 ± 15 s; $P < 0,001$). Los datos de entrenamiento fueron eliminados del análisis posterior. El valor umbral de MS para aceptar una imagen desconocida fue estimado con imágenes del operador entrenado elegidas al azar (804 imágenes) y realizando un análisis de curva ROC para $MS = 70$. No se detectaron efectos raza, ojo o edad en el MS de las comparaciones intra-edad a los 3, 6 y 12 meses, el cual promedió $96,3 \pm 0,3$. El CT fue mayor en corderos Lacaune que en Manchegos ($P < 0,01$) y disminuyó con la edad (34 ± 4 y 21 ± 2 s, para 6 y 12 meses; $P < 0,001$). Respecto a la trazabilidad de los corderos, un 2,8% de crotales temporales se perdieron hasta el destete (trazabilidad de 97,2%). No se reportaron pérdidas de ningún crotal oficial ni mini-bolo desde el destete hasta el año (trazabilidad de 100%). Los MS de las comparaciones inter- edades usadas como biomarcadores para auditar la trazabilidad, no variaron según edad o raza, promediando $92,6 \pm 0,5$. Usando las RI a los 3 meses como referencia, todas las comparaciones con RI a los 6 y 12 meses de edad mostraron un $MS > 70$, lo cual confirma el 100% de trazabilidad de los corderos. En conclusión, la imagen retinal resultó una técnica precisa para auditar la identidad de corderos vivos desde el destete hasta un año de edad.

4.2 ABSTRACT

With the objective of verifying the presumed identity of sheep in a traceability study based on visual ear tags and electronic boluses, retinal image recognition was used as an auditing biomarker on 152 lambs of 2 dairy breeds (Manchega, $n = 82$; Lacaune, $n = 70$). Lambs were identified with temporary ear tags (birth to weaning), and with official ear tags and electronic mini-boluses (weaning to yearling). At 3 mo of age, 58 lambs were recruited for flock replacement, and the rest were transported to a slaughterhouse. Retinal images (RI) and capturing times (CT) were recorded from the left and right eyes of each lamb by duplicate and by the same operator using an OptiReader device (Optibrand, Fort Collins, CO) at 3, 6 and 12 mo of age in 152, 58 and 58 lambs, respectively. The 3-mo RI were used as reference images and to assess operator training and accuracy of the technique. Intra- and inter-age comparisons were made to obtain the matching score (MS; 0 to 100) of pairs of RI from the same eye, using Optibrand's software. Operator skill improved with training sessions but MS reached a plateau after the sixth session (264 images; $MS = 93.2 \pm 1.5$). Values of CT also decreased in trained compared with untrained operator (63 ± 5 vs. 144 ± 15 s, respectively; $P < 0.001$). Training data were eliminated from further analysis. Matching exclusion criteria was estimated from trained operator images at random (804 images) using a non-parametric receiver operating characteristic curve analysis for $MS = 70$. No breed, eye or age effects were detected in the MS intra-age comparisons at 3-, 6- and 12-mo periods, which averaged 96.3 ± 0.3 . Capturing time was longer in Lacaune than in Manchega lambs ($P < 0.01$) and decreased by age (34 ± 4 and 21 ± 2 s, for 6- and 12-mo periods, respectively; $P < 0.001$). Regarding lamb traceability, 2.8% temporary ear tags were lost from birth to weaning (traceability, 97.2%) but no official ear tag or mini-bolus losses were reported from weaning to yearling (traceability, 100%). Inter-age MS comparison, used as the biomarker for traceability auditing, did not vary by age or breed, on average being 92.6 ± 0.5 . Using the 3-mo RI as reference, all 6- and 12-mo RI showed $MS > 70$ which supported 100% lamb traceability. In conclusion, retinal imaging was an accurate technique for auditing the identity of living lambs from weaning to yearling.

4.3 INTRODUCTION

Meat traceability is a complex (i.e., from birth to retail sales) and incompletely solved process (Arana et al., 2002; Caja et al., 2002) requiring the use of identification (**ID**) devices and of auditing systems (McKean, 2001, Caja et al., 2002). Current livestock ID range from visual to electronic devices but biometrics (e.g., genetic fingerprinting and retinal imaging) have been proposed to overcome the main limitations of ID devices and for auditing (Caja et al., 2004; Felmer et al., 2006; Barry et al., 2008).

Use of retinal images (**RI**) is based on the uniqueness and invariability of the retinal vascular pattern of each eye. Completion of retina at birth varies according to species precocity, individuals and diseases (Flowers et al., 1985; Hellström et al., 2002). First results point out that sheep clones can be differentiated by RI (Whittier et al., 2003). Barry

et al. (2008) reported slight changes in the curvature of retinal vessels of Irish crossbred lambs from 1 to 22 wk of age which did not affect the matching score (**MS**) of the RI comparisons between ages. Nevertheless, MS is not a continuous variable and previous data transformation is required before statistical analysis (Puig et al., 2009). This data transformation was not done in the study by Barry et al. (2008), which made uncertain some of their results. Moreover, there is no information on RI analyses for longer periods, as well as left and right eye relationship and breed effect.

The objective of this study was to verify the presumed identity of sheep traced from weaning to yearling by ear tags and electronic boluses, using RI as the auditing biomarker. The adequate discrimination threshold for the effective matching of pairs of RI, the required length of the operator training period and the repeatability of the methodology between eye duplicates and ages was also investigated in 2 breeds of sheep differing in precocity. A specific model for the treatment of matching score data from RI was also developed.

4.4 MATERIALS AND METHODS

The experimental procedures and animal care conditions were approved by the Ethical Committee on Animal and Human Experimentation (Reference CEEAH 656/07) of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona, Spain).

4.4.1 Animals, rearing and management

Manchega and Lacaune weaned lambs (approximately 1 mo of age, 11.5 ± 0.2 kg BW) born at the Experimental Farm of the S1GCE (Servei de Granges i Camps Experimentals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain), were used. Manchega and Lacaune are dairy sheep breeds from Spain and France, respectively, differing in precocity, growth speed and milk yield, but of similar adult frame and BW (Marie et al., 2002; Flores et al., 2008). Lambs were intensively fed with a commercial growth-fattening concentrate (NE_F , 1.90 Mcal/kg; CP, 17.4%; as fed), barley straw and water for ad libitum. A total of 152 lambs (Manchega, $n = 82$; Lacaune, $n = 70$) reached the harvesting weight as Spanish “Recental” lambs (approximately 3 mo of age, 23 to 25 kg BW) and were slaughtered ($n = 94$; Manchega, $n = 54$; Lacaune, $n = 40$) or chosen for replacement of the breeding flock ($n = 58$; Manchega, $n = 28$; Lacaune, $n = 30$). Replacement ewe lambs

joined the adult flock at 28 kg of BW and grazed (6 h/d) Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) as a group and were complemented indoors according to their requirements. Replacement ram lambs were reared separately and fed according to their requirements.

4.4.2 Animal identification

All lambs were identified with official temporary (lambs traced as a group intended for slaughter) and permanent (lamb individually traced and for replacement) ID devices, according to European Union regulations (EC 21/2004; amended by EC 933/2008) and current Spanish legislation (Real Decreto 947/2005; amended by 1486/2009). The temporary ear tags were inserted at birth in the middle of the left ear of the lambs and consisted of 2 rectangular flags made of polyurethane with a tamper-proof (pin and cup) male-female closing system (2.8 g, 40 × 14.5 mm; Allflex-Azasa, Madrid, Spain). Lambs were also identified at weaning (1 mo of age) with permanent official ear tags attached to the right ear and with electronic mini-boluses recorded with the same individual code.

The permanent ear tags had triangular flags made of polyurethane, which were laser recorded and a tamper-proof (pin and cup) male-female closing system (5.2 g; 38 × 39 mm; Allflex-Azasa, Madrid, Spain). The electronic mini-boluses (19 g, 56.2 × 11.9 mm; Allflex-Azasa, Madrid, Spain) contained a standardized 32 × 3.8-mm half-duplex transponder recorded with a 16-digit code according to the current Spanish legislation (Real Decreto 947/2005; amended by 1486/2009) and with ISO 11784 and 11785 standards on animal electronic ID (ISO, 1996, 2009). Boluses were administered by a trained operator using an adapted balling gun (Rumitag, Espluges de Llobregat, Barcelona, Spain) as described by Ghirardi et al. (2007a).

Temporary official ear tags for lambs intended for harvesting were removed at 6 mo of age, when replacement lambs joined the breeding flock, and were replaced by the management ID ear tags of the farm.

4.4.3 Retinal images

The RI were obtained using the Optireader device (Optibrand, Fort Collins, CO), a commercially available device designed for capturing retinal vascular images in animals.

The Optireader device included a video fundus camera able to capture RI pictures and any other digital image, and a controller with keyboard, screen and an embedded Global Positioning System (**GPS**) receiver. The controller is a central processing unit that works with the camera to capture and store the RI and other information. The Optireader device links the images captured with the location, exact time and date, all set by the GPS receiver.

All RI were captured in duplicate and by the same operator in morning sessions, done thrice a week, with 3 to 17 lambs (9.2 ± 1.1 lambs on average), inside a barn and under natural daylight conditions. The operator was novel in RI capture, but experienced in sheep management and restrain, and previously subjected to a short theoretical and practical course (3-d length) for obtaining the main quality standards required for a novice operator according to the Optibrand operator benchmarks (i.e., collecting only high quality RI with a MS > 85 between duplicates and demonstrated thorough understanding of how the OptiReader device worked). Nevertheless, the average proficiency criterion (time for acquiring RI < 1 min per eye) was not fulfilled, which was used to evaluate the operator's skill progression without compromising the RI quality.

Lambs were restrained in a self-closing head locker and the operator immobilized the animal head with one hand, while handling the camera with the other. After setting the location, time and data via the GPS receiver, the operator typed the permanent ear tag ID number into the keyboard of the OptiReader and took a first picture of the ear tag located on the side of the corresponding eye. Left eyes were processed before right eyes. The device automatically captured the best quality RI (e.g. minimum glare and proper focus) according to previously configured parameters on the controller (i.e. animal species, sheep; targeting selectivity, 0). After targeting activation, the camera was directed at the lamb's eye, positioned at approximately 1 cm from the eye and an angle of 45°, pointing toward the base of the animal's opposite ear, according to recommendations of the manufacturer (Optibrand). The camera had a light source which illuminated the fundus of the eye (ocular fundus) and allowed the visualization of the retinal vascular pattern on the controller's screen (Figure 4.1). A RI was considered acceptable when it showed a contrasted vascular pattern and vertical and horizontal alignment in relation to the screen guidelines, and when there were no black edges, glare, obstructions or blurriness, as reported in the OptiReader device user guide (Optibrand).

In addition to GPS coordinates, date, time (to the nearest 0.1 s) and ear tag picture, the

capturing time (CT) was also recorded by the device and used to evaluate the operator proficiency. The CT was measured to the nearest 10^{-3} s elapsed between targeting activation and capture of an RI of acceptable quality. This time included the several attempts done until obtaining an acceptable RI.

Figure 4.1. Left: Capturing a retinal image in a yearling sheep, restrained in a head locker and under natural daylight conditions inside a barn, by using an OptiReader device (CM, camera; ICC, image capturing controller). Right: Retinal images of left and right eyes of 3 mo of age fattening lambs.



Recorded RI and associated data were stored on a 64 Mb compact flash memory card (SanDisk, Shoot & Store Card, Milpitas, CA) in the form of encrypted binary large object (so called “blob”) files, and transferred to a central database on-line supported by using the Data Management software v. 4.1.3 of Optibrand. Uploaded RI were viewed as “jpeg” files and used for subsequent matching trials of pairs of images. The Optibrand software matching process used an implemented matching algorithm based on the degree of similarity, size, position and branch angles of retinal vessels designed to perform about 20 pairs of matches per minute (Allen et al., 2008). The Optibrand’s Data Management software overlaps the images to compute a MS which ranged between 0 and 100. The higher the score, the more likely the images in the pair are from the same eye.

In order to determine when the operator was proficient enough to obtain RI of quality, thereby being considered as a trained operator according the Optibrand benchmarks

criteria (novice operator), the first RI taken from approximately the half of the lambs at 3 mo of age (33 lambs from each breed, 264 images in total) was used. Training data were analyzed separately from the rest of RI taken during the experiment.

A minimum MS threshold was determined as matching decision criteria. With this aim, 2 series of 1-to-1 comparisons of pairs of RI (excluding the data used for studying the training period) were carried out for determining the sensitivity (true positives) and the specificity (true negatives) of the technique. A set of true match comparisons was selected (404 pairs of RI) from different duplicates of the same eye taken at 3, 6 and 12 mo of age. Further, a set of false pairs was selected (400 pairs of RI) from images of eyes of different lambs chosen at random.

A total of 608 RI were collected from 152 lambs of 3 mo of age (2 images from both eyes) which were used as reference for further analysis. The replacement lambs were re-imaged at 6 and 12 mo of age (464 images).

Intra- and inter-age comparisons of pairs of RI for each eye were made, thereby obtaining 1 intra-age (duplicates) and 4 inter-age (3 vs. 6 mo, and 3 vs. 12 mo taking into account the duplicates) MS for each eye. Intra-age comparisons of pairs of RI were used to setup the working methodology and to evaluate operator training, whereas inter-age comparisons were used to audit the lamb identity assessed by ear tags and electronic miniboluses for lamb traceability.

4.4.4 Statistical analyses

Matching score threshold was determined by means of a non-parametric receiver operating characteristic (**ROC**) curve analysis using the ROC procedure of SPSS v. 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). The ROC curve is a graphical method, extensively used for assessing the characteristics of a diagnostic test where the true positive rate (sensitivity) is plotted against the false positive rate (1-specificity) for different cut-off points. Each point on the ROC plot represents a sensitivity/specificity pair for a decision threshold.

Before to the statistical analysis, the MS data were expressed as a proportion variable ranging between 0 and 1 and were analyzed in order to identify their distribution profile. An excess of values equal to 1 (MS = 100) were observed in the MS data, indicating that the distribution did not correspond to the profile of a continuous distribution such as the Beta or the Logistic-normal distributions. Consequently, for analyzing this semicontinuous

data, the 1-inflated Beta distribution was used, building a specific model for the treatment of MS data from RI. Parameter estimation was done by maximizing the corresponding log-likelihood function using a program made in R free computing software (www.r-project.org; see Appendix). Similar zero-inflated Beta models have been recently used for analyzing proportions in finances (Cook et al., 2008).

To compare the inter-age images used for identity verification and for auditing the traceability, we also considered random effects models. The models have the special feature of the excess of 1's (one-inflated Beta model terms). Logarithmic transformations (\log_{10}) for CT data were done. Least square means of CT were obtained with the MIXED procedure of SAS (v. 9.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC) according to a split-plot model (whole plot = breed, subplot = eye) with repeated measures (age) and including first order interactions and the error term. The single eye was considered the experimental unit. Not significant interactions were deleted from the model. The statistical significance and tendency were declared at $P < 0.05$ and $P < 0.1$, respectively.

4.5 RESULTS AND DISCUSSION

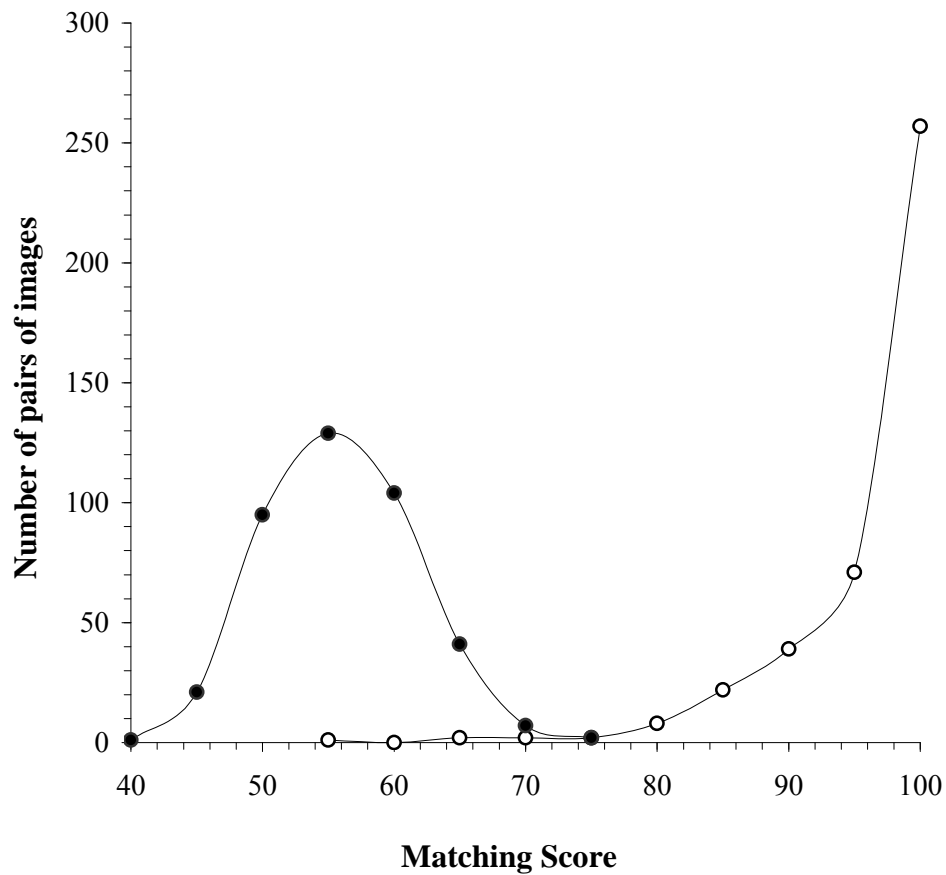
4.5.1 Determining the matching score threshold

The distributions of MS frequencies in the data set used to determine the sensitivity in true positives and the specificity in true negatives of the technique are shown in Figure 4.2. No images obtained during the training period (sessions 1 to 6, as later indicated) were used to avoid the effect of operator training as recommended by Allen et al. (2008) and Gonzales-Barron et al. (2008).

True negatives showed a symmetric distribution and peaked at $MS = 55$, whereas true positives showed a left skewed distribution reaching the greatest frequency at $MS = 100$, indicating that both distributions were distinct and slightly overlapped. Allen et al. (2008) indicated that the suitable threshold varies according to the nature of the forensic application chosen. In our case, the use of RI as the auditing technology for verifying lamb identity implies to discriminate between true and false matches at a stringent level. From the resulting non-parametric ROC curve obtained in our results (Figure 4.3), the cut-off or threshold MS value estimated to minimize the false matching error and the false non-matching error in order to accept or reject a claimed identity, was $MS = 70$. Estimated

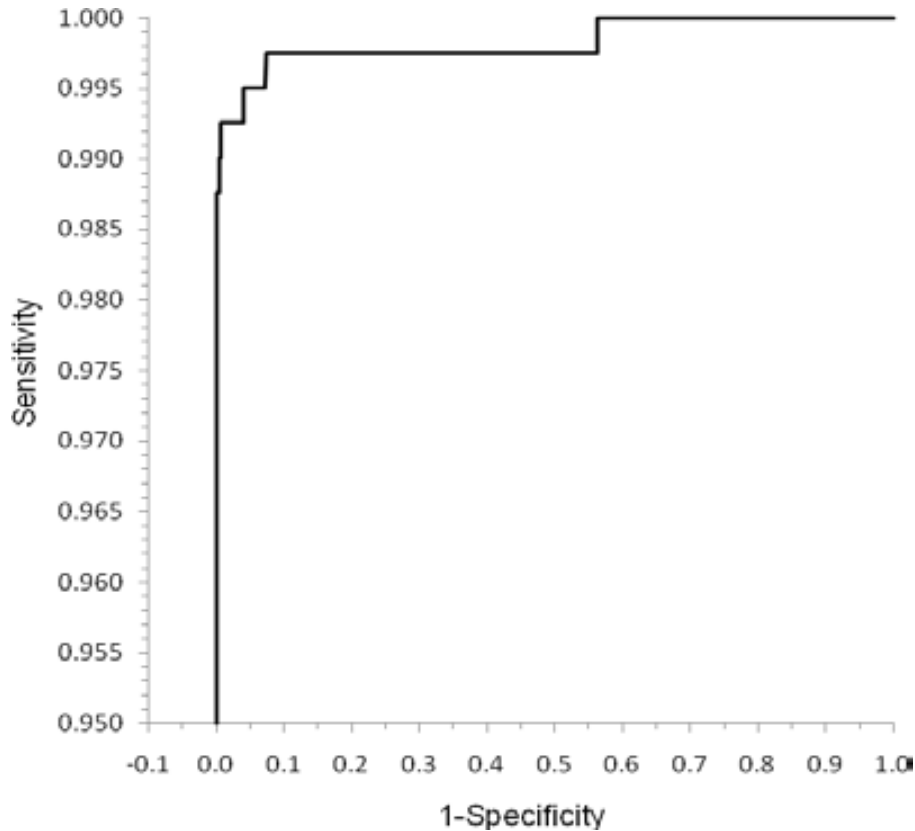
false matching error rate for this threshold was 0.5%, while the estimated false non-matching error rate was 1.1%. As a result, the specificity and sensitivity values obtained were 0.995 and 0.989, respectively. This 99.5% accuracy for verifying lamb identity was considered adequate for minimizing the false positives in sheep traceability in practice, being the value greater than obtained in previous implementation studies in which molecular markers were used for auditing lamb traceability (Caja et al., 2007b).

Figure 4.2. Distribution of matching score frequencies for true negative (correct non-matching, ●) and true positive (correct matching, ○) in lambs after the training period.



Our obtained value of MS threshold agreed with that reported by Gonzales-Barron et al. (2008; MS = 70) in adult sheep, despite the difference in age with our lambs, although their specificity and sensitivity values were 0.992 and 0.998, respectively. Allen et al. (2008) graphically chose an inspection threshold of MS = 75 in cattle of different ages, but no specificity and sensitivity data were calculated.

Figure 4.3. Receiver operating characteristic (ROC) curve obtained for matching score of retinal images in lambs after the training period of the operator.



4.5.2 Matching score data treatment

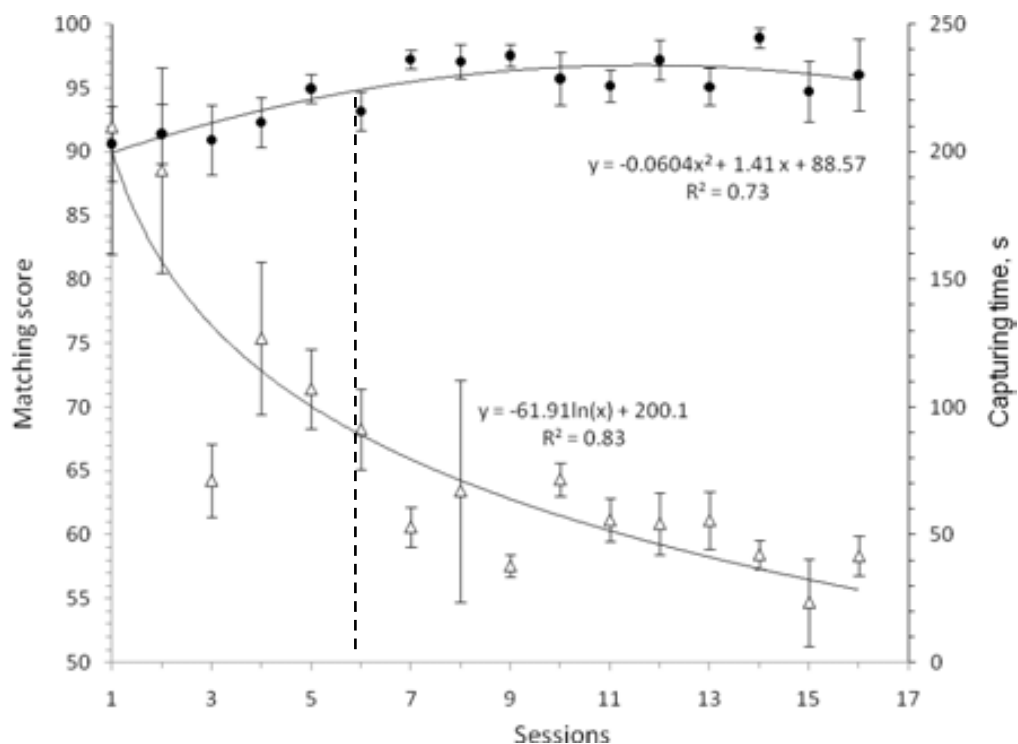
A careful examination of the data set showed an inflated distribution of values at MS = 100. This fact was a consequence of the matching algorithm used by the Optibrand Data Management Software which was designed for a high throughput (approximately 20 pair matches/min). Although the exact algorithm used in this software is unknown, the most plausible explanation was that each image was partially analyzed at the beginning of the process and, if the agreement was satisfactory, the algorithm finalized the calculations and attributed a MS = 100. Otherwise, the algorithm would continue analyzing the RI and give an estimated and specific MS value. Consequently, this algorithm provided inflated MS values of 100, with a non equal probability (nonzero probability) and we decided to use the one-inflated bivariate Beta distribution, and to build a specific model for the treatment of MS data from RI as proposed previously by Puig et al. (2009) and detailed in the Appendix.

4.5.3 Training period

Using MS and CT values as decision criteria, the training period was considered as completed when the MS reached a plateau ($P > 0.05$; Figure 4.4); simultaneously the operator achieved the image collection proficiency stated in the Optibrands benchmarks of 1 min per eye, on average. This occurred after the sixth training session (MS = 93.2 ± 1.5 ; CT = 91.3 ± 15.8 s) in which the RI of both eyes of a total of 66 lambs (33 lambs of each breed) were collected in duplicate (264 images in total).

Operator training has been shown to be a key factor for collecting quality RI using the OptiReader device (Whittier et al., 2003; Allen et al., 2008), although no experimental data has been reported to show the differences between untrained and trained operators. Allen et al. (2008) and Gonzales-Barron et al. (2008) proposed a 2- to 3-wk period of training which agreed with the results of our study if 3 half-day sessions per week were carried out.

Figure 4.4. Changes in matching score (●) and capturing time (○) values of retinal images in lambs according to the experience accumulated by the operator across the working sessions carried out.



Values of MS during the considered training period (sessions 1 to 6) ranged between 90.1 and 93.4 (i.e., 3-mo-old Lacaune lambs and untrained operator in Table 4.1), being on average lower than the rest of the MS data sets used (Table 4.1; $P < 0.01$). No eye side or breed effects were detected during the training period ($P > 0.05$).

A progression of operator skill was observed from 1 to 6 sessions with increased proficiency for collecting RI of acceptable quality and a CT reduction. Capturing time decreased logarithmically ($y = 61.9 \ln x + 200$; $R^2 = 0.83$; $P < 0.05$) from 210 ± 50 s, at session 1, to 53 ± 8 s, at session 7 ($P < 0.001$; Figure 4.4), but no differences were reported thereafter ($P > 0.05$). On average, 2.6 ± 0.2 images were rejected until a RI of acceptable quality was obtained, during the training period.

Table 4.1. Intra-age¹ comparisons of matching scores² of retinal image according to operator skill, breed (Manchega, Lacaune) and eye side (left, right) at different ages in lambs (values are means \pm SE).

| Operator skill | Age, mo | Manchega | | Lacaune | | Overall |
|----------------------|---------|-------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| | | Left | Right | Left | Right | |
| Untrained | 3 | 92.5 \pm 1.9 (33) ³ | 92.5 \pm 2.2 (33) | 90.1 \pm 1.8 (33) | 93.4 \pm 1.7 (33) | 92.1 \pm 1.1 ^a (132) |
| Trained ⁴ | 3 | 97.2 \pm 0.7 (49) | 97.9 \pm 0.7 (49) | 94.4 \pm 1.3 (37) | 95.3 \pm 1.2 (37) | 96.4 \pm 0.5 ^b (172) |
| | 6 | 98.0 \pm 0.5 (28) | 94.4 \pm 1.5 (28) | 98.2 \pm 0.6 (30) | 94.1 \pm 1.5 (30) | 96.2 \pm 0.6 ^b (116) |
| | 12 | 96.9 \pm 1.1 (28) | 95.8 \pm 1.8 (28) | 96.1 \pm 1.0 (30) | 96.5 \pm 1.0 (30) | 96.3 \pm 0.6 ^b (116) |
| | Overall | 97.3 \pm 0.4 (105) | 96.4 \pm 0.7 (105) | 96.1 \pm 0.6 (97) | 95.3 \pm 0.7 (97) | 96.3 \pm 0.3 ^b (404) |

¹ Comparisons between image duplicates of the same lamb and eye taken at the same age.

² Computed overlapping score of a pair of images (ranging from 0 to 100), obtained by the Optibrand's Data Management software v. 4.1.3 (Optibrand, Fort Collins, CO).

³ Values in parentheses are number of eyes studied.

⁴ Training period images excluded. The operator was considered trained when only collected retinal images with matching score greater than 85 and the average time to acquire images was less than 1 min per eye.

^{a,b} Within a column, values with different superscripts differ ($P < 0.01$). No differences between ages for the trained operator were observed ($P > 0.05$) and no effects of eye side, breed and their interactions were detected in all cases ($P > 0.05$).

In contrast, CT during the training period ranged between 75 and 181 s and its overall mean was longer than the means from other periods in the trained operator (Table 4.3 and Figure 4; $P < 0.001$). In this case, an eye side effect was detected on CT, the time required being lower for the right eye than for the left eye (Table 4.3; $P = 0.004$), which may be a consequence of processing the left eye first according to our methodology; the lamb being more stressed just after capturing and restraining. A tendency was also observed by breed during the training period, the Manchega lambs showing lower CT than the Lacaune lambs (122 ± 15 s vs. 164 ± 27 s, respectively; $P = 0.054$) which may be consequence of the greater age of the Manchega lambs to reach the slaughter age.

Of the 132 pairs of RI compared in the training period, 127 pairs (96.2%) were over the previously determined MS threshold ($MS \geq 70$) and were considered as being from the same lamb. When eyes were analyzed separately, no differences in percentage of RI over the threshold were detected between the left and right eye RI (97.0 vs. 95.5%, respectively; Table 4.2; $P = 0.78$), allowing the left or the right eye to be used indistinctly for verifying lamb identity.

4.5.4 Intra-age comparisons

The MS values of the RI duplicates obtained from the same eye were intra-age compared using the purged data set after excluding the training period images (sessions 7 to 16; 808 images). No differences by breed ($P = 0.69$) or between the left and right eyes ($P = 0.98$) were observed for trained operator data and, consequently, their MS values were pooled and the overall mean calculated (Table 4.1). Correlation between values of MS for the left and right eye were extremely low ($R^2 = 0$ to 0.06; $P = 0.85$). As a consequence, indistinct use of the left or the right eye may be done for verifying lamb identity.

At 3 mo of age, the MS mean values for trained operator ranged between 94.4 and 97.9 across breed and eye. No breed or eye effect were detected ($P > 0.05$; Table 4.1). On average, 98.8% of RI showed a $MS \geq 70$ (data not shown), which was a greater percentage than the results obtained in the training period. With regard to CT, values at 3 mo of age were approximately half of those obtained in the training period, ranging between 37 and 83 s according to breed and eye (Table 4.3 and Figure 4). Left and right eye CT values tended to differ ($P = 0.052$; Table 4.3), the interaction of breed \times eye being significant (P

= 0.035) and the Manchega lambs showing greater CT for the left than the right eye. On average, 2.5 ± 0.2 images were rejected by the trained operator at 3 mo of age.

Table 4.2. Percentage of retinal images showing matching scores¹ (MS) greater than the acceptance threshold ($MS \geq 70$) according to operator skill, breed (Manchega, Lacaune) and eye side (left, right) at different ages in lambs.

| Image comparison | Age, mo | Operator skill | Manchega | | Lacaune | | Overall | |
|------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | | | Left | Right | Left | Right | Left | Right |
| Intra-age ² | 3 | Untrained | 97.0 | 93.9 | 97.0 | 97.0 | 97.0 | 95.5 |
| | | | (33) ³ | (33) | (33) | (33) | (66) | (66) |
| | 3 | Trained ³ | 100 | 100 | 97.3 | 97.3 | 98.8 | 98.8 |
| | | | (49) | (49) | (37) | (37) | (86) | (86) |
| 6 | Trained ³ | 100 | 96.4 | 100 | 96.7 | 100 | 96.6 | |
| | | (28) | (28) | (30) | (30) | (58) | (58) | |
| 12 | Trained ³ | 100 | 96.4 | 100 | 100 | 100 | 98.3 | |
| | | (28) | (28) | (30) | (30) | (58) | (58) | |
| Inter-age ⁴ | 3 vs. 6 ⁵ | Trained | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | | (27) | (26) | (30) | (25) | (57) | (51) |
| 3 vs. 12 ⁶ | Trained | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| | | (27) | (26) | (30) | (26) | (57) | (52) | |

¹Computed overlapping score of a pair of images (ranging from 0 to 100), obtained by the Optibrand's Data Management software v. 4.1.3 (Optibrand, Fort Collins, CO).

²Comparisons between image duplicates of the same lamb and eye taken at the same age.

³Values in parentheses are number of eyes studied.

⁴Training period images excluded. The operator was considered trained when only collected retinal images with $MS > 85$ and the average time to acquire images was less than 1 min per eye.

⁵Comparisons between images of the same eye and lamb, taken at different ages.

⁶A total of 8 images were incorrectly declared unmatched by the software (false negative) and were excluded.

⁷A total of 7 images were incorrectly declared unmatched by the software (false negative) and were excluded.

Table 4.3. Capturing time (s) of retinal images according to operator skill, breed (Manchega, Lacaune) and eye side (left, right) at different ages in lambs (values are means \pm SE)

| Operator skill | Lamb age, Mo | Lamb breed | | | | | | Overall |
|------------------------|--------------|--|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------|
| | | Manchega | | Lacaune | | Left eye | Right eye | |
| | | Left eye | Right eye | Left eye | Right eye | | | |
| Untrained ¹ | 3 | 168 \pm 24 ^a (33) ² | 75 \pm 12 ^b (33) | 148 \pm 22 ^a (33) | 181 \pm 37 ^a (33) | 158 \pm 16 ^{ex} (66) | 128 \pm 20 ^{fw} (66) | |
| | 3 | 66 \pm 10 ^a (49) | 37 \pm 6 ^b (49) | 83 \pm 14 ^a (37) | 75 \pm 12 ^a (37) | 73 \pm 8 ^y (86) | 53 \pm 6 ^x (86) | |
| | 6 | 27 \pm 3 (28) | 30 \pm 4 (28) | 34 \pm 6 (30) | 42 \pm 9 (30) | 31 \pm 3 ^z (58) | 36 \pm 5 ^y (58) | |
| Trained ³ | 12 | 18 \pm 2 ^{ab} (28) | 14 \pm 2 ^b (28) | 30 \pm 6 ^a (30) | 21 \pm 4 ^{ab} (30) | 24 \pm 3 ^{ez} (58) | 18 \pm 2 ^{iz} (58) | |

¹Corresponding to sessions 1 to 6 in which 264 retinal images were collected.

²Values in parentheses are number of eyes studied.

³Training period images excluded. The operator was considered trained when only collected retinal images with matching score greater than 85 and the average time to acquire images was less than 1 min per eye.

^{a,b}Within a row, mean values between eye and breed with different superscripts differ ($P < 0.05$).

^{e,f} Within a row, overall mean values with different superscripts differ ($P < 0.05$).

^{w,x,y,z} Within a column, overall mean values with different superscripts differ ($P < 0.05$).

Comparison of RI at 6 mo of age showed similar MS results to those obtained at 3 mo of age; on average, 98.3% had $MS \geq 70$ (data not shown); no breed ($P = 0.89$) or eye effects were detected in MS at 6 mo of age (Table 4.1; $P = 0.96$). Capturing time continued decreasing according to the greater operator skill, and ranged between 27 and 42 s (Table 4.3; $P > 0.05$). Although the CT was lower in Manchega than Lacaune lambs, the difference was not significant in this case (29 ± 3 vs. 38 ± 6 s; $P = 0.74$). On average, 1.4 ± 0.1 images were rejected at 6 mo of age, showing an improvement of operator skill (44%) from the 3 mo of age period.

Finally, at 12 mo of age, MS values steadied and were similar to those of 3 and 6 mo of age (Table 4.1; $P > 0.05$) although the percentage of RI with $MS \geq 70$ reached the greatest value (99.1%). No differences by breed or eye were detected (Table 4.1; $P > 0.05$). With regard to CT at 12 mo of age, mean value was shorter than at 3 and 6 mo of age and did not exceed 30 s per eye (Table 4.3; $P < 0.001$). As previously indicated, CT in Manchega lambs were lower than in Lacaune (16 ± 1 vs. 26 ± 4 s; $P = 0.014$), this difference between breeds being consistent across all periods but without an apparent reason. Moreover, CT values of the right eye were lower ($P = 0.032$) than those of the left eye, agreeing with the results obtained during the training period. The overall CT obtained at 12 mo of age was markedly lower (21 ± 2 s) than reported previously by Rusk et al. (2006; 56 s) and Gonzales-Barron et al. (2008; 50 s) in adult ewes, which agreed with the low rate of rejected images for a RI of acceptable quality achieved in our data at 12 mo of age (0.7 ± 0.1 images), and a marked improvement of the operator skill was achieved when compared with the 3 mo of age data (72%). Nevertheless, there is no information available on the subjective criteria used by different authors for excluding or accepting sheep RI at different ages.

4.5.5 Lamb traceability

Lamb traceability by artificial markers was assessed by calculating the retention rate of ear tags and electronic mini-boluses. At the start of the experimental period, 2.8% of the lambs had lost the official temporary ear tags (97.2% traceability). No losses of electronic mini-boluses or permanent official ear tags, both applied at weaning, were reported throughout the experiment, showing 100% traceability from weaning to yearling under intensive fattening and grazing conditions.

Traceability auditing of lamb identity obtained from electronic mini-boluses or permanent official ear tags data, was done by comparing the RI from the same lamb eye at different ages and using the 3 mo of age RI as reference. Table 4.4 shows the 2 types of inter-age comparisons done: 3 vs. 6 mo and 3 vs. 12 mo of age.

Obtained results showed that 8 (6.9%) and 7 (6.0%) RI comparisons by the Optibrand software of 3 vs. 6 mo and 3 vs. 12 mo of age, respectively, failed to match at the chosen threshold (6.9% on average). The matching failure for the same pair of images was repeatable. Nevertheless, visual verification of these images by 2 observers led to the conclusion that these images were of high quality (contrasted vascular pattern, vertical and horizontal alignments in relation to the screen guidelines, and without black edges, glare, obstructions or blurriness) and came from the same lamb, and their MS values were eliminated from the comparison, as reported in Table 4.4. This fact did not occur in the intra-age comparisons. Although reasons for these false negatives were unknown, we discarded that they were due to a RI deficient quality and we attributed it to an incorrect overlapping made by the software. Further research on this issue is warranted.

Table 4.4. Matching scores¹ of retinal images compared inter-age² according to breed (Manchega, Lacaune) and eye side (left, right) in lambs (values are means ± SE)

| Age comparisons | Manchega | | Lacaune | | Overall | |
|--------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Left | Right | Left | Right | Left | Right |
| 3 vs. 6 mo ³ | 94.6 ± 1.4 (27) ⁴ | 93.2 ± 1.5 (26) | 94.3 ± 1.1 (30) | 91.9 ± 1.4 (25) | 94.5 ± 0.9 (57) | 92.6 ± 1.0 (51) |
| 3 vs. 12 mo ⁵ | 93.7 ± 1.3 (27) | 93.7 ± 1.2 (26) | 91.5 ± 1.3 (30) | 92.5 ± 1.2 (26) | 92.5 ± 0.9 (57) | 93.1 ± 0.8 (52) |

¹Computed overlapping score of a pair of images (ranging from 0 to 100), obtained by the Optibrand's Data Management software v. 4.1.3 (Optibrand, Fort Collins, CO).

² Comparisons between images of the same eye and lamb obtained by the trained operator at different ages. No effects of age, eye side, breed and their interactions were detected ($P > 0.05$).

³A total of 8 images were incorrectly declared unmatched by the software (false negative) and were excluded. The failure was repeatable, but visual verification led to the conclusion that they came from the same lamb.

⁴ Values in parentheses are number of eyes studied.

⁵A total of 7 images were incorrectly declared unmatched by the software (false negative) and were excluded. The failure was repeatable, but visual verification led to the conclusion that they came from the same lamb.

Purged inter-age values of MS were, on average, lower than previously reported intra-age values, ranging between 91.5 and 94.6 (Table 4.4). No breed, eye or age effects were detected, being the last 93.5 ± 0.8 and 92.6 ± 0.7 , on average for 3 vs. 6 mo and 3 vs. 12 mo of age, respectively ($P = 0.43$). Mean MS values obtained in our results were slightly lower than reported by Barry et al. (2008; 96.0), in lambs from 8 to 22 wk of age, and by Gonzales-Barron et al. (2008; 95.6) in adult ewes under indoors conditions which may be a consequence of a more restricted criteria of RI acceptance.

Despite the lower MS value obtained in our results, the RI inter-age comparison made confirmed the 100% traceability of the lambs from weaning to yearling obtained by the permanent official ear tags and the electronic mini-boluses.

4.6 CONCLUSIONS

The use of retinal imaging was a useful technique for verifying the presumed identity of live lambs from 3 to 12 mo of age. In order to accept or reject a claimed lamb identity, the use of retinal images collected at 3 mo of age as a reference and of a cut-off matching score value of 70, provided enough specificity and sensitivity to achieve 100% traceability in fattening and yearling lambs. No eye side and breed effects were detected in matching scores. Nevertheless, an extra percentage of approximately 7% of pairs of images considered by the software as not matching were false negative, so, we recommended the visual checking of rejected pairs of images. Moreover, we detected an inflated distribution of matching score values at 100, which seems to be a consequence of the matching algorithm used by the data management software of the equipment, making necessary the use of a specific model for the treatment of matching score data. No mention to these facts was previously reported.

Under similar conditions to those used in this study, the use of retinal images is an accurate technique for verifying the identity of living sheep, mainly overcoming the retention and readability limitations associated with the use of identification devices. Moreover, retinal imaging may be a real-time alternative to currently available biomarkers needing to collect samples for laboratory analysis with the aim of auditing the traceability of sheep.

4.7 APPENDIX

An excess of matching values equal to 1 ($MS = 100$), not corresponding to the profile of a continuous distribution between 0 and 1, were detected in the whole matching score (**MS**) data set used. Consequently, for analyzing these semicontinuous data, the one-inflated Beta distribution and the one-inflated bivariate Beta distribution were used. The one-inflated Beta distribution, defined over $x \in [0; 1]$ has a probability density function (**PDF**) of the form,

$$f(x; \mu, \phi, p) = p I(x) + (1 - p)(1 - I(x)) \frac{\Gamma(\phi)}{\Gamma(\mu\phi) \Gamma((1 - \mu)\phi)} x^{\mu\phi - 1} (1 - x)^{(1 - \mu)\phi - 1}$$

Here $I(x)$ is an indicator function, that is, $I(1) = 1$ and $I(x) = 0$ for $x \neq 1$. The right part of this PDF, which corresponds to the classical Beta distribution, was parameterized according to Ferrari and Crivari-Neto (2004). This model is equivalent to the zero-inflated Beta distribution if each observation x is replaced by $1 - x$. We also assumed that for $x \neq 1$, the corresponding population mean μ_i depended linearly on the covariates by means of an appropriate link function like the logit. Then, in our data sets we assumed that $\log(\mu_i / (1 - \mu_i)) = \beta_0 + \beta_1 Z_i$ where Z_i is a dichotomic variable indicating the lamb breed (Manchega, 1; Lacaune, 2). The one-inflation parameter p_i was also modeled in terms of μ_i to reflect the empirical fact that high values of μ_i are accompanied by a high proportion of 1's. Thus, we assumed that $p_i = \mu_i^\gamma$, where γ is a parameter to be estimated from the data.

For studying the inter-eye images, bivariate models were also considered. These models could be understood in a similar way to those described in Qiu et al. (2008), but with the special feature of the one-inflated terms. For instance, let (x, y) be the two dimensional random vector that represents the MS observations from the left and right eyes of the same animal. The one-inflation phenomenon is more complicate for these bivariate patterns, because the 1's can appear in only one component or in both. The PDF of the one-inflated bivariate Beta distribution that we have considered can be written as follows:

$$g(x, y) = \begin{cases} p_{11} & x = 1, y = 1 \\ p_{x1} f(x; \mu_x, c) & x \neq 1, y = 1 \\ p_{1y} f(y; \mu_y, c) & x = 1, y \neq 1 \\ (1 - p_{11} - p_{x1} - p_{1y}) f(x, y; \mu_x, \mu_y, c) & x \neq 1, y \neq 1 \end{cases}$$

Here p_{11} , p_{x1} and p_{1y} indicate the proportion of observations of the form $(1,1)$, $(x,1)$ and $(1,y)$ respectively. Moreover, $f(x; \mu_x, c)$ and $f(y; \mu_y, c)$ are the PDF of the classical Beta distribution with population means μ_x and μ_y , and the same dispersion parameter c . The bivariate PDF $f(x,y; \mu_x, \mu_y, c)$ is just the PDF of the bivariate Beta distribution of Olkin and Liu (2003). It has the following expression,

$$f(x, y; \mu_x, \mu_y, c) = \frac{x^{\frac{c\mu_x}{1-\mu_x}-1} y^{\frac{c\mu_y}{1-\mu_y}-1} (1-x)^{\frac{c}{1-\mu_y}-1} (1-y)^{\frac{c}{1-\mu_x}-1}}{B(\mu_x, \mu_y, c)(1-xy)^{c(\frac{\mu_x}{1-\mu_x} + \frac{\mu_y}{1-\mu_y} + 1)}}$$

More details can be found in Puig et al. (2009). For parameter estimation, we have maximized the corresponding log-likelihood function and the asymptotic standard errors were calculated from the Hessian of the log-likelihood at the maximum. With this aim, a program made in R was used and which is available from the authors upon request.

CAPITULO 5

Experimento 2: Determinación de la edad óptima para capturar la imagen del patrón vascular retinal de corderos

Determining the optimal age for recording the retinal vascular pattern image of lambs

CAPÍTULO 5

Determinación de la edad óptima para capturar la imagen del patrón vascular retinal de corderos

Determining the optimal age for recording the retinal vascular pattern image of lambs

5.1 RESUMEN

Se usaron 143 corderos recién nacidos de raza Ripollésa para evaluar la edad óptima a la cual el patrón vascular retinal puede utilizarse como referencia para su identificación y trazabilidad. Se registraron imágenes retinales por duplicado de ambos ojos (2.534 imágenes) desde el nacimiento al año de edad (1, 8, 30, 82, 180 y 388 días) usando un dispositivo Optireader (Optibrand, Fort Collins, CO). Se hicieron comparaciones intra- e inter- edades (9.316 pares de imágenes) y se usó el índice de coincidencia (matching score, MS) como criterio de exclusión de la identidad de un cordero ($MS < 70$). Las imágenes retinales se usaron para verificar la identidad de corderos vivos de 4 categorías comerciales Españolas: Cordero lechal (1 mes de edad y < 12 kg PV, $n = 136$); Cordero recental o ligero (3 meses de edad y < 25 kg PV, $n = 134$); Cordero pesado o de reposición (6 meses de edad y ~ 35 kg PV, $n = 59$); y Cordero primal o de 1 año (> 12 meses de edad y ~ 50 kg PV, $n = 25$). Los valores de MS fueron tratados con un modelo basado en la distribución beta bivariada inflada en 1 y los datos tratados fueron comparados usando un test de verosimilitud. Las comparaciones intra-edad mostraron que el MS promedio y el porcentaje de imágenes con valores de $MS \geq 70$ aumentaron con la edad desde el día 1 al 80 ($81,0 \pm 1,0$ a $95,9 \pm 0,4$, y $75,8$ a 100% , respectivamente) y luego permaneció estable. Las comparaciones de imágenes inter-edad para los corderos a los 30 días mostraron que el porcentaje de imágenes con $MS \geq 70$ fue mayor cuando se usaron como imágenes de referencia las capturadas a los 8 días en lugar de las de 1 día de edad ($94,8$ vs. $87,4\%$; $P < 0,05$). En los corderos recental las imágenes a los 30 días obtuvieron mejor resultados que las de 8 días de edad ($99,6$ vs. $93,6\%$; $P < 0,05$). Para corderos pesados y primales, las imágenes retinales capturadas a los 82 días permitieron la confirmación del 100% de la identidad de los corderos, mientras que las imágenes a los 8 días mostraron un porcentaje menor ($87,9$ y $89,8\%$, respectivamente para corderos pesados y primales; $P > 0,05$); no se detectaron diferencias para imágenes a los 30 días de edad ($97,4$ y $98,0\%$, respectivamente para corderos pesados y primales; $P > 0,05$). El 100% de imágenes con $MS \geq 70$ se alcanzó cuando las imágenes fueron capturadas en corderos de mayor edad (180 y 388 días de edad). En conclusión, la imagen retinal fue una herramienta útil para verificar la identidad y auditar la trazabilidad de corderos vivos desde el nacimiento hasta un año de edad. Los valores de MS fueron satisfactorios cuando las imágenes de referencia fueron obtenidas en corderos de 1 mes o más edad.

5.2 ABSTRACT

Newborn Ripollesa lambs ($n = 143$) were used to assess the optimal age at which the vascular pattern of the retina can be used as reference for identification and traceability. Retinal images from both eyes were recorded from birth to yearling (d 1, 8, 30, 82, 180 and 388 of age) in duplicate (2,534 images) using a digital camera (Optibrand, Fort Collins, CO). Intra- and inter-age image comparisons (9,316 pairs of images) were carried out and matching score (MS) used as exclusion criterion of lamb identity ($MS < 70$). Retinal images were used for verifying the identity of live lambs of 4 Spanish commercial categories: milk-fed lambs (MF; so-called “lechal”, 1 mo of age and < 12 kg BW, $n = 136$); fattened light lambs (FL; so-called “recental”, 3 mo of age and < 25 kg BW, $n = 134$); recruited replacement lambs (RR; so-called “ovino mayor”, 6 mo of age and ~ 35 kg BW, $n = 59$); and, yearling replacement lambs (YR; > 12 mo of age and ~ 50 kg BW, $n = 25$). Values of MS were treated with a model based on the one-inflated bivariate beta distribution and treated data were compared by using a likelihood ratio test. Intra-age image comparisons showed that average MS and percentage of images with $MS \geq 70$ increased with lamb age from d 1 to 82 (81.0 ± 1.0 to 95.9 ± 0.4 , and 75.8 to 100%, respectively) and steadied thereafter. Inter-age retinal image comparisons for MF lambs at 30 d showed that percentage of images with $MS \geq 70$ was greater when reference images at 8-d were used instead of 1-d images (94.8 vs. 87.4%, respectively; $P < 0.05$). In FL lambs, 30-d retinal images matched better than those at 8 d of age (99.6 vs. 93.6%, respectively; $P < 0.05$). Regarding RR and YR lambs, the 82-d images allowed the confirmation of 100% lamb identity, whereas 8-d images showed a lower ($P < 0.05$) percentage of matching (87.9 and 89.8%, respectively for RR and YR lambs; $P > 0.05$); no differences were detected for 30-d images (97.4 and 98.0%, respectively for RR and YR lambs; $P > 0.05$). Total percentage of matching was achieved when images were obtained from older lambs (180 and 388 d). In conclusion, retinal imaging was a useful tool for verifying the identity and auditing the traceability of live lambs from suckling to yearling. Matching scores were satisfactory when the reference retinal images were obtained from 1-mo or older lambs.

5.3 INTRODUCTION

Traditional livestock identification (**ID**) systems, including branding, tattooing, ear notching and ear tagging (metal and plastic) have been shown to be susceptible to loss, unreadability and possible fraudulent operations as well as being the object of animal welfare concerns (Wardrope, 1995; Edwards et al., 2001; Garín et al., 2003). Electronic ID, based on using passive radiofrequency transponders (i.e., injectable, ear tag and bolus), overcame some of these limitations and may be a cost-effective option for livestock (Caja et al., 2004; Saa et al., 2005).

Recent advances in biometrics have provided new ID technologies based on natural traits (e.g., DNA profile, facial and eye recognition) among which retinal imaging has proved to be a simple and accurate method for verifying the ID of cattle and sheep (Allen

et al., 2008; Gonzales-Barron, et al., 2008; Rojas-Olivares et al., 2011a). The vascular pattern of the retina is a unique and distinctive trait in animals and humans, that suffer few changes from birth to adult life, and even differentiates monozygotic twins and clones (Whittier et al., 2003; Golden et al., 2004; Gonzales-Barron et al., 2008).

A specific device, designed for capturing the vascular pattern of the retina of livestock under farm conditions is currently available (Optibrand, Fort Collins, CO). The Optibrand device is commonly used for verifying the identity of cattle and sheep for the 4-H cooperation and development program in the United States (Rusk et al., 2006) and has been proposed as a real-time alternative to genetic fingerprinting for auditing the identity of animals in current traceability schemas (Rojas-Olivares et al., 2011a).

The aim of this study was to determine the optimal age at which the vascular pattern of the retina can be used as reference for lamb ID, and to evaluate retinal imaging as a tool for verifying the ID of 4 Spanish commercial categories of harvesting lambs from suckling to yearling.

5.4 MATERIALS AND METHODS

Experimental and animal care procedures were approved by the Ethical Committee on Animal and Human Experimentation (Reference CEEAH 656/07) of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Spain).

5.4.1 Animals and management

A total of 143 lambs of Ripollesa meat breed from the Experimental Farm of the SIGCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) of the Universitat Autònoma de Barcelona were used for verifying the ID of live lambs of 4 commercial categories: milk-fed lambs (**MF**; so-called “lechal”, 1 mo of age and < 12 kg BW, n = 136); fattened light lambs (**FL**; so-called “recental”, 3 mo of age and < 25 kg BW, n = 134); recruited replacement lambs (**RR**; so-called “ovino mayor”, 6 mo of age and ~35 kg BW), n = 59); and, yearling replacement lambs (**YR**; >12 mo of age and ~50 kg BW, n = 25).

The feeding and management of the lambs was similar to that described by Rojas-Olivares et al. (2011a). In brief, the ewes grazed during the day and the lambs suckled from their mothers overnight (1500 to 1000 h) and were creep-fed a commercial starter

concentrate until weaning. Eight lambs died during the suckling period (5.6%). The rest of the lambs were weaned when > 12 kg BW (14.4 ± 0.2 kg BW, on average) at approximately 7 wk of age (50.8 ± 0.6 d, on average). Weaned lambs ($n = 135$) were moved to straw-bedded fattening pens and fed ad libitum with a commercial concentrate, barley straw, and water until they reached the harvesting weight as FL lambs. One more lamb died during fattening. A total of 69 FL lambs left the farm for slaughtering and the rest were fed alfalfa hay and rationed commercial concentrate according to requirements (INRA, 2007) for producing RR lambs intended for replacement stock. Finally, 34 RR lambs were sold at 6 mo of age for breeding and the rest ($n = 25$) were retained for breeding in the same experimental flock. Replacement ewe-lambs ($n = 20$) joined the adult flock and grazed with them as a group, being complemented separately indoors with hay and concentrate according to their requirements; ram-lambs ($n = 5$) were fed alfalfa and rye-grass hay, and rationed concentrate indoors.

5.4.2 Lamb individual identification

Each lamb was identified at birth as intended for slaughter according to European regulation EC 21/2004 (amended by EC 933/2008) with an official temporary ear tag (2 rectangular flags made of polyurethane with a tamper-proof closing system, 2.8 g, 40×14.5 mm; Allflex-Azasa, Madrid, Spain) in the left ear.

A second official ear tag used for permanent ID of breeding stock (EC 21/2004 and EC 933/2008) was inserted in the right ear (2 triangular flags made of polyurethane with a tamper-proof closing system, 5.2 g; 38×39 mm; Allflex-Azasa) of the lambs at weaning. Lambs were also electronically identified with a new prototype of mini-bolus (19 g, 56.2×11.9 mm; Allflex-Azasa) containing standardized 32×3.8 -mm half-duplex transponders recorded with the same individual code as the ear tags. Boluses were administered by trained operators using an adapted balling gun (Rumitag, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain).

5.4.3 Retinal imaging

A total of 2,534 retinal images were captured by a trained operator using an Optireader device (Optibrand, Fort Collins, CO) under natural daylight conditions inside the barn, as

described by Rojas-Olivares et al. (2011a). Lamb age for capturing the reference retinal images varied according to the commercial category used. Retinal images of MF lambs ($n = 135$) were captured at d 1 (1.3 ± 0.1 d and 3.9 ± 0.1 kg BW, on average), d 8 (8.4 ± 0.1 d of age on average) and d 30 (30.0 ± 0.1 of age and 9.7 ± 0.2 kg BW, on average) during the suckling period. Retinal images of the FL lambs ($n = 134$) were captured at d 82 (82.4 ± 1.3 d and 22.2 ± 0.2 kg BW, on average) near the end of the fattening period. Retinal images of the RR lambs ($n = 59$) were captured at d 180 (180.4 ± 1.0 d and 34.1 ± 0.6 kg BW, on average). Retinal images of the YR lambs were captured at d 388 (387.7 ± 1.2 d and 49.4 ± 2.0 kg BW, on average) during the first mating season. Total number of eyes for each age considered, and from which the images were captured in duplicate, are summarized in Table 5.1.

Lamb restraining for retinal imaging varied according to lamb weight; the MF lambs were held in the arms of the operator during the image capturing process, whereas the rest of the lambs were restrained by using a head-locker with the lamb head immobilized by the operator. Retinal images of both eyes were recorded in duplicate, starting from the left side with the operator being right-handed. For image capturing, the video camera objective was directed to each lamb eye at approximately 1 cm with an angle of 45° , following the recommendations of the manufacturer (Optibrand) as described by Rojas-Olivares et al. (2011a). Capturing time (CT) was also recorded by the Optireader device to the nearest to 10^{-3} s and consisted of the time required from targeting activation until a retinal image of enough quality was taken (Gonzales-Barron et al., 2008). This time included the several attempts made until obtaining a retinal image of acceptable quality (i.e., contrasted vascular pattern, vertical and horizontal alignments in relation to the screen guidelines, and without black edges, glare, obstructions or blurriness). Recorded retinal image and associated data were stored and transferred to an on-line central database supported by the Optibrand's DMS (Data Management Software, v. 4.1.3) to calculate the matching score (MS) between pairs of images.

In order to assess the optimal age at which the captured retinal image can be used as the reference image for verifying the lamb identity and to audit the traceability process, a series of intra- and inter-age comparisons of retinal images were made. As duplicate images were taken, 6 intra-age and 15 inter-age MS comparisons for each eye were done. Only inter-age comparisons from early to later dates were evaluated (i.e., 1 vs. 8, 30, 82, 180 and 388 d; 8 vs. 30, 82, 180 and 388 d; 30 vs. 82, 180 and 388 d; 82 vs. 180 and 388

d; 180 vs. 388 d). A minimum of MS of 70 was used as exclusion criterion (0.989 sensitivity, i.e. probability of a correct match; and 0.995 specificity, i.e. probability of a correct non-match), as previously determined by Gonzales-Barron et al. (2008) and Rojas-Olivares et al. (2011a), using the non-parametric receiver operating characteristic curve methodology, in sheep.

5.4.4 Statistical analyses

An excess of MS values equal to 100 was observed, indicating that data did not correspond to the profile of a continuous distribution. Consequently, the one-inflated Beta distribution (Olkin and Liu, 2003; Ferrari and Cribari-Neto, 2004) and a specific model for the treatment of MS data (expressed from 0 to 1) from retinal images were used similarly to Rojas-Olivares et al. (2011a). Parameter estimation was made by maximizing the corresponding log-likelihood function using a program made in R free computing software (www.r-project.org) as previously reported (Rojas-Olivares et al., 2011a).

Logarithmic transformations (\log_{10}) for CT data were calculated, and the least square means of CT were subsequently obtained with the MIXED procedure of SAS (v. 9.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC). Factors included in the model were eye side (left or right), age of the lamb (d 1, 8, 30, 82, 180, and 388), their interactions, and the residual error.

Percentage of images showing an MS over the threshold considered ($MS \geq 70$; Gonzales-Barron et al., 2008; Rojas-Olivares et al., 2011a) were analyzed with the CATMOD procedure of SAS, and a Logit model with an estimation method of maximum likelihood (Cox, 1970) was used. Effects evaluated were eye side, age of the lamb, their interactions and the residual error. The statistical significance was declared in all cases at $P < 0.05$ and non significant ($P > 0.20$) effects were removed from the final models.

5.5 RESULTS AND DISCUSSION

5.5.1 Retinal images repeatability and capturing performances

Intra-age comparisons of retinal images between duplicates, used to estimate the repeatability of the retinal imaging methodology, gave overall MS values that varied widely (37.6 to 100; data not shown). No correlation ($R^2 < 0.1$, $P > 0.05$) between MS of the left and right eyes was detected, agreeing with Rojas-Olivares et al. (2011a) and, consequently, retinal images of each eye were treated as independent variables and the obtained MS values were pooled. Averaged MS according to the age of the lambs ranged between 81.0 and 97.3 (Table 5.2). Range of variation of MS values was greater than earlier reported for intra-age comparisons of retinal images in 3-mo of age fattened lambs and adult sheep (Rojas-Olivares et al., 2011a). Evolution of intra-age MS values according to the age of the lambs (Figure 5.1) showed a logarithmic trend ($R^2 = 0.97$, $P < 0.001$), that increased dramatically from d 1 to 30 ($P < 0.05$) and reaching a plateau from d 82 to 388 ($P > 0.05$). The greatest MS mean value was obtained in YR lambs at 388 d of age (97.3 ± 0.8), being similar to the value reported by Rojas-Olivares et al. (2011a; 96.3 ± 0.6) in lambs under the same management conditions and age but from different breeds (i.e., Lacaune and Manchega).

Intra-age comparisons also showed that the percentage of pairs of images over the exclusion criterion ($MS \geq 70$) did not vary by eye side ($P > 0.05$) although it increased with the age of the lambs (Table 5.3). Percentage of images over the exclusion criterion ranged between 75.8 and 100%, reaching a value which did not differ from 100% at 82 d of age ($P > 0.05$). Moreover, a total of 95.0% of the pairs of image duplicates compared after 30 d of age were declared to be from the same lamb eye.

Overall CT values also varied widely (1.8 to 515.5 s) in our study, being affected by eye side at 30, 82 and 180 d of age ($P < 0.05$) but not at earlier or later ages (Table 5.1).

Table 5.1. Number of eyes studied, capturing time and retinal images rejected until obtaining one of acceptable quality according to lamb age (values are means \pm SE).

| Item | Lamb age, d | Eye | | Overall |
|--------------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | | Left | Right ¹ | |
| Eyes, n | 1 | 143 | 142 | 285 |
| | 8 | 139 | 137 | 276 |
| | 30 | 136 | 135 | 271 |
| | 82 | 134 | 133 | 267 |
| | 180 | 59 | 59 | 118 |
| | 388 | 25 | 25 | 50 |
| Capturing time, s | 1 | 65.6 \pm 4.8 | 69.1 \pm 4.3 | 67.3 \pm 3.2 ^u |
| | 8 | 49.7 \pm 4.3 | 48.2 \pm 3.8 | 49.0 \pm 2.8 ^{vx} |
| | 30 | 28.4 \pm 3.0 ^a | 37.9 \pm 3.6 ^b | 33.2 \pm 2.4 ^{wy} |
| | 82 | 59.3 \pm 5.5 ^a | 45.8 \pm 3.8 ^b | 52.6 \pm 3.4 ^x |
| | 180 | 31.1 \pm 2.9 ^a | 26.2 \pm 4.5 ^b | 28.7 \pm 2.7 ^y |
| | 388 | 18.6 \pm 3.0 | 18.2 \pm 4.7 | 18.4 \pm 2.7 ^z |
| Images rejected, n | 1 | 1.9 \pm 0.3 ^a | 2.9 \pm 0.2 ^b | 2.4 \pm 0.2 ^x |
| | 8 | 1.2 \pm 0.1 ^a | 2.1 \pm 0.2 ^b | 1.6 \pm 0.1 ^y |
| | 30 | 0.8 \pm 0.1 ^a | 1.3 \pm 0.1 ^b | 1.0 \pm 0.1 ^z |
| | 82 | 1.8 \pm 0.1 ^a | 1.9 \pm 0.1 ^a | 1.8 \pm 0.1 ^y |
| | 180 | 1.9 \pm 0.2 ^a | 1.5 \pm 0.2 ^a | 1.7 \pm 0.1 ^y |
| | 388 | 1.1 \pm 0.3 ^a | 1.0 \pm 0.3 ^a | 1.0 \pm 0.2 ^z |

¹A total of 5 retinal images from the right eye were lost at d 1, 8, 30 and 82 of age due to operational mistakes.

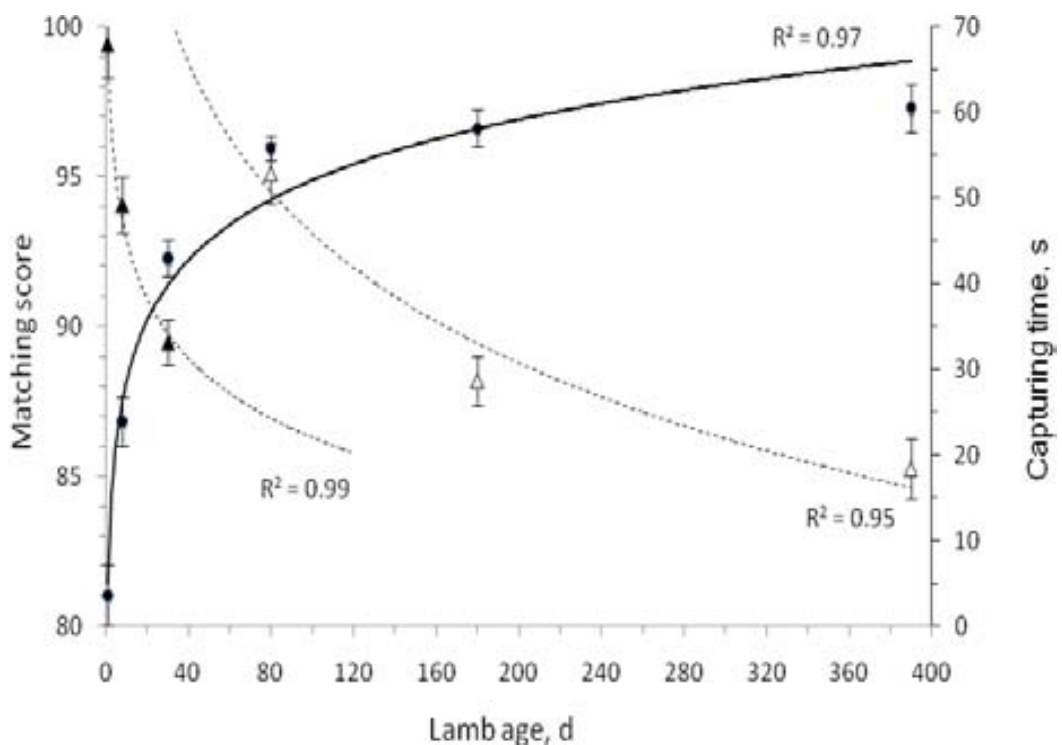
^{a-b} Within a row, values with different superscript differ ($P < 0.05$).

^{u-z} Within a column, values with different superscript differ ($P < 0.05$).

Differences between eyes were related to the procedure followed by the operator (starting with the left eye) and to the joint effect of lamb age and restraining method. Obtained CT values decreased logarithmically with lamb age and varied markedly according to the restraining method used (suckling lambs held in the arms, 50 ± 2 s, $R^2 = 0.99$; weaned lambs head-locked, 42 ± 2 s, $R^2 = 0.95$; $P < 0.05$) as shown in Figure 5.1. The difference of CT values for left eye compared to right eye detected at d 30 (-9.5 s, P

< 0.05; Table 5.1), was considered to be a consequence of the operator being right-handed. The opposite was observed when the lambs were restrained in the head-locker (Table 5.1), agreeing with previous results of Rojas-Olivares et al. (2011a), as a result of the lamb being more stressed when the first retinal imaging was done (left eye). Despite the light BW of suckling lambs from d 1 to 30, manual restraining was slow, and so the use of an adapted head-locker for young lambs should be recommend for implementing the retinal imaging methodology in practice. Mean CT values in weaned lambs were in the range of those reported by Rojas-Olivares et al. (2011a; 18 to 73 s) but the overall mean for weaned lambs (42 ± 2 s) was lower than the values reported by Rusk et al. (2006; 56 s) and Gonzales-Barron et al. (2008; 50 s) for lambs and adult ewes.

Figure 5.1. Evolution of intra-age matching score (●) and capturing time of retinal images according to the age of the lambs (suckling, ▲; weaned, Δ). Values are means \pm SE.



Number of images rejected until obtaining one of acceptable quality showed an evolution similar to CT values, decreasing from d 1 to 30, then increasing from d 82 to 180 to reach values close to 2.0, and eventually reaching an average value of 1.0 at d 388

(Table 5.1). A greater number of images were rejected in the right eye than in the left eye from d 1 to 30 ($P < 0.05$), which was considered to be a consequence of the procedure followed and the operator fatigue (i.e., right-handed operator starting with the left eye). Right to left eye differences disappeared ($P > 0.05$) when the weaned lambs were restrained in the head-locker (d 82 and thereafter; Table 5.1). Obtained values were greater than those reported on average by Rojas-Olivares et al. (2011a) in Lacaune and Manchego lambs of similar age (0.7 images rejected) which may be a consequence of the behavioral characteristics of the Ripollés lambs used, a local meat breed proved to be more susceptible to stress than the Lacaune and Manchego lambs (Pedernera-Romano et al., 2010).

5.5.2 Accuracy of lamb identity verification for traceability

Inter-age comparison of pairs of images used to verify the identity of lambs at different ages showed lower MS values than intra-age comparisons (Table 5.2, diagonal vs. under the diagonal values). The use of reference retinal images for inter-age comparisons captured at 30 d or from older lambs yielded high MS values (Table 5.2). Moreover, the use of reference retinal images taken in young lambs (1 and 8 d of age) yielded lower inter-age MS values than retinal images taken in the same lambs at 180 and 388 d of age (Table 5.2). Barry et al. (2008) reported a similar trend for inter-age MS comparisons in cross-bred lambs with no differences by age when the lambs were older than 8 wk. The greatest MS value in our study (94.8 ± 0.6) was obtained when comparing the 82 vs. 180 d of age images, which was similar to the value reported by Rojas-Olivares et al. (2011a) in a similar inter-age comparison in lambs (3 vs. 6 mo of age; $MS = 93.5 \pm 0.8$).

Table 5.2. Matching score of retinal images according to the age of the lamb at which the reference image was taken for comparison¹.

| Lamb age, d | Age of the lamb at the reference retinal image capture, d | | | | |
|-------------|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | 1 | 8 | 30 | 82 | 388 |
| 1 | 81.0 ± 0.9 ^A | | | | |
| 8 | 81.4 ± 0.7 ^a | 86.8 ± 0.8 ^A | | | |
| 30 | 79.7 ± 0.7 ^{abw} | 84.8 ± 0.5 ^{ax} | 92.3 ± 0.6 ^B | | |
| 82 | 77.6 ± 0.7 ^{bw} | 83.0 ± 0.6 ^{abx} | 91.3 ± 0.4 ^{ay} | 95.9 ± 0.4 ^B | |
| 180 | 74.0 ± 1.0 ^{bew} | 80.2 ± 0.9 ^{bex} | 89.2 ± 0.7 ^{aby} | 94.8 ± 0.6 ^{az} | 96.6 ± 0.6 ^B |
| 388 | 72.2 ± 1.5 ^{cw} | 78.2 ± 1.0 ^{cw} | 86.7 ± 1.0 ^{bx} | 93.2 ± 0.9 ^{ay} | 94.3 ± 0.9 ^y |
| | | | | | 97.3 ± 0.7 ^B |

¹Values within the diagonal are intra-age comparisons (repeatability of duplicates). Values under the diagonal are inter-age comparisons of retinal images used for verifying lamb identity.

^{A-D} Within the diagonal, values with different superscript differ ($P < 0.05$).

^{a-d} Within a column, values with different superscript differ ($P < 0.05$).

^{x-z} Within a row, values with different superscript differ ($P < 0.05$).

On the other hand, our results were slightly lower than the MS values reported in 8 to 22 wk of age lambs by Barry et al. (2008; 96.0) and those found in adult ewes by Gonzales-Barron et al. (2008; 95.6). Results of MS reported by Barry et al. (2008), using images captured at 1 wk of age as the reference, were slightly higher than those obtained at a similar age in our study (86.0 vs. 81.6, respectively). According to Barry et al. (2008), the improvement of MS values with the age of the lambs is a consequence of the low quality of the images captured in young lambs due to technical reasons (i.e., out-of-focus, glared and poorly contrasted images) rather than due to structural changes that occurred in the retina during lamb development. Thus, these authors only observed small modifications of the blood vessel pattern (i.e., more marked curvature) at secondary branch level in ca. 10% of lamb eyes ($n = 4$, over 38 eyes), although further development ceased at wk 8 of age and these changes had a minor impact on their retinal image MS values. In our study, we observed 9.9% of eyes ($n = 231$, over 2,329 eyes) with low MS values ($MS < 70$) in the inter-age comparisons, but only 10 of them (4.3%) showed small structural changes in the vascular pattern of the retina (i.e., flattened curves).

A careful examination of the inter-age pairs of retinal images with low MS values showed quality problems (out of focus, low contrast, and some glare or obstructions) as a consequence of the small size of the eye and of lamb restraining difficulties. Moreover, 1.9% of pairs of compared retinal images (177 pairs from a total of 9,316 pairs of images compared) were detected as inexplicably matched incorrectly by the Optibrand software ($MS < 70$) in the different inter-age comparisons. A greater number of mismatched images (6.5%) was detected previously by Rojas-Olivares et al. (2011a) in inter-age retinal images of sheep. Visual verification of these images led to the conclusion that they came from the same lamb eye and, consequently, the MS values of these comparisons were eliminated to avoid biased results. This mismatching did not occur in the intra-age comparisons, as also reported by Rojas-Olivares et al. (2011a), but the reasons for the false negative matching are unknown.

Table 5.3. Percentage of retinal images showing matching scores over the acceptance threshold ($MS \geq 70$) according to the age of the lamb used as reference image for comparisons¹.

| Lamb age, d | Age of the lamb at reference retinal image capture, d | | | | | |
|-------------|---|---------------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | 1 | 8 | 30 | 82 | 180 | 388 |
| 1 | 75.8 ^A | | | | | |
| 8 | 88.3 ^a | 88.8 ^B | | | | |
| 30 | 87.4 ^{ax} | 94.8 ^{ay} | 95.6 ^C | | | |
| 82 | 80.8 ^{bx} | 93.6 ^{aby} | 99.6 ^{az} | 99.6 ^D | 100 ^D | |
| 180 | 68.1 ^{cx} | 87.9 ^{cy} | 97.4 ^{az} | 100 | 100 | |
| 388 | 54.2 ^{dx} | 89.8 ^{cby} | 98.0 ^{ay} | 100 | 100 | 100 ^D |

¹Values within the diagonal are percentage of images having matching scores over the threshold ($MS \geq 70$) for the intra-age comparisons (repeatability of duplicates). Values under the diagonal are percentage of images having $MS \geq 70$ for the inter-age comparisons.

^{A-D} Within the diagonal, values with different superscript differ ($P < 0.05$).

^{a-d} Within a column, values with different superscript differ ($P < 0.05$).

^{x-z} Within a row, values with different superscript differ ($P < 0.05$).

Although some differences in the development of the retina may be expected according to breed, obtained results showed that the quality of retinal images captured using the standard Optibrand camera is the main factor limiting the use of retinal imaging at early ages in sheep. Better quality and more consistent retinal images can be obtained if reference images are captured from lambs of at least 1 mo of age or from weaned lambs. Nevertheless, Barry et al. (2008) also found a drop in MS between wk 10 and 16 of age, attributed to lamb weaning stress (weaning, wk 12 to 14), which was not observed at d 80 (3 wk after weaning) in our study.

Similar results were obtained when the percentage of images above the agreed MS acceptance threshold ($MS \geq 70$), and when the purged data set (without the false negative MS values) were taken into account (Table 5.3). Percentages of retinal images above the threshold criterion varied widely from 54.2 to 100% according to the age of the lambs at which the reference retinal image was taken. This value may be used to evaluate the retinal imaging methodology for traceability purposes. Retinal images taken at 1 and 8 d of age were inadequate for an accurate verification of lamb identity (percentage of matched images $< 95\%$). On the contrary, high accuracy was obtained when retinal images taken at 30 d of age or later were used for verifying lamb identity (percentage of matched images $> 95\%$). Moreover, percentage of images over the threshold steadied at 100% when the retinal images used as the reference were taken at 82 d of age or thereafter. Results obtained for the inter-age MS comparisons, showed that 30 d of age was the earliest age at which retinal images can be captured for accurate lamb traceability in practice.

Compared to retinal image values, lamb traceability obtained by using the temporary ear tags in MF lambs was 97.1% at the end of the suckling period (2.9% of the temporary ear tags were lost or showed severe bite damages, making them unreadable at 30 d of age). Additionally, 8.0% temporary ear tags were lost or were unreadable at the end of the experiment in the YR lambs (388 d of age) yielding 92.0% traceability. On the other hand, the official permanent ear tags inserted in the right ear at weaning showed 100% traceability from weaning to yearling. These results agreed with those reported by Rojas-Olivares et al. (2011a) in Manchega and Lacaune lambs under similar conditions. On the contrary, lamb traceability calculated by the retention rate of mini-boluses was unexpectedly low, being 98.5% in the LF lambs (from weaning to harvesting) and decreasing to 92.0% in YR lambs from weaning to yearling. Mini-bolus retention in our

study contrasted with the high retention values (> 98%) reported earlier for similar electronic devices in lambs and adult ewes (Ghirardi et al., 2006b, 2007a). Retention divergence may be attributed to differences in the bolus features, as devices in our work belonged to a different manufacturer.

With regard to the different Spanish commercial categories of harvesting lambs studied, the obtained results showed that the optimal ages at which the reference retinal image should be taken varied according to the lamb commercial category (Table 5.3). Milk fed lambs (“lechal” lambs harvested at 30 d of age) showed greater values of percentage of retinal images over the MS threshold at 8 d compared to 1 d of age (94.8 vs. 87.4%, respectively; $P < 0.05$). Light fattened lambs (“recental” lambs harvested at 82 d of age) showed greater values at 30 d compared to 8 d of age (99.6 vs. 93.6%, respectively; $P < 0.05$). Lambs recruited for replacement (“ovino mayor” harvested at 180 d of age) showed greater values at 30 d compared to 8 d of age (97.4 vs. 87.9%, respectively; $P < 0.05$), although values at 82 d did not differ from those obtained at 30 d and yielded 100% traceability. Finally, in the case of yearling lambs, similar results to RR lambs were obtained when retinal images were taken after 30 d of age.

5.6 CONCLUSIONS

The use of retinal imaging proved to be an accurate methodology for lamb identity verification from suckling to yearling. One month of age was the recommendable age for taking the reference retinal images for maximizing lamb identity verification for the auditing the traceability of lambs.

CAPITULO 6

Experimento 3: Conveniencia del uso dispositivos visuales y electrónicos e imágenes retinales como sistemas primarios y secundarios de identificación, para trazar y auditar corderos vivos y sus canales

Suitability of visual and electronic devices and of retinal images, as primary and secondary identification systems, for tracing and auditing live lambs and their carcasse

CAPÍTULO 6

Conveniencia del uso dispositivos visuales y electrónicos e imágenes retinales como sistemas primarios y secundarios de identificación, para trazar y auditar corderos vivos y sus canales

Suitability of visual and electronic devices and of retinal images, as primary and secondary identification systems, for tracing and auditing live lambs and their carcasses

6.1 RESUMEN

Se estudió la trazabilidad de corderos mediante diferentes dispositivos de identificación (ID) y condiciones de trabajo. En la Exp. 1 se procesaron 241 corderos en un matadero de pequeñas dimensiones. Como ID primaria se usaron crotales oficiales temporales (V1, oreja izquierda) al nacimiento. Como ID secundaria se utilizaron crotales oficiales permanentes (V2, oreja derecha) y mini-bolos electrónicos (MB, oral) en 104 corderos al destete; y transpondedores inyectables subcutáneos (IT, axila izquierda) en 81 corderos. Tanto MB como IT contenían transpondedores half-duplex de 32 mm. Para auditar la ID se tomaron imágenes retinales (RI) en corderos vivos (de ambos ojos) a los 80 d de edad ($n = 98$). Al sacrificio se comparó el efecto de la posición de la cabeza en la calidad de las RI (normal, $n = 67$; invertida, $n = 31$). La trazabilidad en granja no varió entre dispositivos (98,6 a 100%; $P > 0,05$), pero en matadero fue de 78,8% para los IT. Los V1 y V2 fueron retirados al separar la cabeza y los MB en la evisceración. Mediante los IT se observó que se alteró el orden de las canales al pesaje, lo que redujo la trazabilidad a 68,3%. La ID de todos los corderos vivos se confirmó mediante RI, sin embargo, la coincidencia de RI en los corderos sacrificados disminuyó y varió según la posición de la cabeza (normal vs. invertida, 56,4 vs. 75,0%; $P < 0,05$). En la Exp. 2, los corderos ($n = 308$) fueron procesados en un matadero a gran escala. Como ID primaria se usaron crotales no oficiales de tipo “tip-tag” (V3) y como ID secundaria, se usaron IT a 20 d del sacrificio. Además, se tomaron RI en 153 corderos vivos (ambos ojos) y en matadero (cabezas invertidas) y se etiquetaron las canales antes del pesaje. La trazabilidad en granja fue menor en V3 vs. IT (87,5% vs. 95,1%; $P < 0,05$) y en el matadero fue de 64,1% para los IT. El orden de las canales se mantuvo (100%) hasta su clasificación. Las RI permitieron verificar la ID en el 70% de los ojos en matadero. En conclusión, V1, V2, MB e IT permitieron una eficiente trazabilidad individual de corderos vivos a pequeña y gran escala; el uso de crotales no oficiales (V3) se desaconsejó. Sin embargo, todos los dispositivos fueron ineficientes para trazar canales, para lo que se necesitan dispositivos especialmente diseñados. La trazabilidad individual desde la granja a la canal sería posible, usando dispositivos de ID de radiofrecuencia, si el orden de las canales en el matadero no se alterase. Las RI auditaron eficientemente corderos vivos y la mayoría de canales, y su uso puede ser de interés para trazar corderos destinados a carnes de consumo étnico. No se recomienda el uso de transpondedores inyectables para la ID de corderos, de acuerdo con investigaciones previas, aunque pueden ser una herramienta útil para trazar canales cuando su orden se vea comprometido.

6.2 ABSTRACT

Lamb traceability using different identification (ID) devices was studied under different operation conditions. In Exp. 1, lambs ($n = 241$) were fattened and harvested in small-sized units. Lamb primary ID was done at birth with temporary official ear tags (V1, left ear). Secondary ID was done at weaning in 104 lambs with 1 permanent official ear tag (V2, right ear) and 1 electronic mini-bolus (MB, orally), and in 81 lambs with s.c. injects (IT, left armpit); MB and IT used 32-mm half-duplex transponders. Retinal images (RI) of live lambs ($n = 98$) were taken at 80 d of age (both eyes) for ID auditing. Head position was compared (normal, $n = 67$; reversed, $n = 31$) after harvesting. On-farm traceability did not vary by ID device (98.6 to 100%; $P > 0.05$), but was 78.8% for IT at slaughter; V1 and V2 were removed at beheading, and MB at evisceration. Carcass order was altered at weighing, as shown by IT, reducing traceability to 68.3%. All live-live RI matched, but live-harvested matching markedly decreased in the normal vs. reversed position (56.4 vs. 75.0%; $P < 0.05$). In Exp. 2, lambs ($n = 308$) were fattened and harvested in large-sized units. Non-official “tip-tag” ear tags (V3) were used as primary ID, and IT injected 20 d before harvesting were the secondary ID. Retinal images (both eyes) were taken in 153 live and harvested lambs (heads downwards). Paper labels were also used to trace carcasses at weighing and grading. On-farm traceability was lower in V3 than IT (87.5% vs. 95.1%, respectively; $P < 0.05$) but slaughterhouse traceability for IT was 64.1%. Nevertheless, carcass order was 100% maintained until grading. Retinal images allowed verifying lamb ID in 70.0% of harvested lamb eyes. In conclusion, V1, V2, MB and IT were efficient devices for individually tracing live lambs in small- and large-sized operation units, but non-official ear tags (e.g., V3) are decidedly misadvised. Nevertheless, all devices were inefficient for tracing carcasses which will need specially designed devices. Individual tracing from farm to carcass using radiofrequency ID devices would be possible if carcass order is maintained in the slaughterhouse. Retinal images efficiently audited live lambs and most carcasses and its use may be of interest for tracing ethnical type lambs. We do not recommend the use of injects for lamb ID, agreeing with previous research, but they may be a useful tool for tracing carcasses when their order is compromised.

6.3 INTRODUCTION

Implementation of effective traceability schemas for food safety requires the use of a primary identification (ID) system (i.e., natural or artificial marks) to individually mark the items, and of an independent and credible auditing system for verifying this ID (McGrann and Wiseman, 2001; McKean, 2001; Caja et al., 2002). Auditing may use secondary ID systems based on natural or artificial tamper-proof marks.

Many types of artificial marks (e.g., iron-branding, tattooing and visual ear tagging) have been used for livestock ID in practice, but their performances are often not good enough (Caja et al., 2004). Electronic ID based on radiofrequency devices (e.g., injectable, ear tag and bolus transponders) overcome some of these constraints and may be an

automatic and cost-effective system for livestock ID and traceability (Caja et al., 2002, 2004; Saa et al., 2005).

Biomarkers (e.g., genetic fingerprinting and retinal imaging) may also be an option for traceability auditing in the animal food chain (Caja et al., 2004, 2007; Felmer et al., 2006; Barry et al., 2008).

The retinal vascular pattern is a natural and distinctive trait in animals and humans that does not significantly change during a lifespan (Whittier et al., 2003; Gonzales-Barron et al., 2008; Rojas-Olivares et al., 2011b). Recent studies have proved the efficiency of retinal imaging in cattle (Allen et al., 2008; Rusk et al., 2006) and sheep (Barry et al., 2008; Gonzales-Barron et al., 2008; Rojas-Olivares et al., 2011a). Nevertheless, there is no information on the use of retinal imaging to verify animal ID throughout the meat chain.

The aim of this study was to evaluate the efficiency of 3 types of ear tags (i.e., official – temporary or permanent– and non official ear tags) and 2 electronic devices (i.e., mini-boluses and injectable transponders), and to assess on the use of retinal imaging to verify the identity of live and harvested lambs under small- and large-sized operation units.

6.4 MATERIALS AND METHODS

The experimental procedures and animal care conditions followed the recommendations of the good practices guide for meat sheep of the Spanish Ministry of Environment, Rural and Marine Affairs (MARM, 2007) and of the Ethical Committee on Animal and Human Experimentation (CEEAH) of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona. Spain).

6.4.1 Experiment 1: Traceability under small operation conditions

6.4.1.1 Animals and management

A total of 241 lambs born on the Experimental Farm of the SIGCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona, Spain) were used. Lambs came from different breeds and lambing seasons: Manchega (n = 109) and Lacaune (n = 74) born in the fall season, and Ripollesa (n = 58) born in spring. Lambs suckled from their mothers and were creep-fed a commercial starter concentrate

until they reached > 12 kg of BW (1 to 1.5 mo of age, approximately) at which they were weaned. Mortality rate from birth to weaning was 12.8%, on average. Weaned lambs (n = 220) were moved to straw-bedded fattening pens in groups of approximately 25, according to date of weaning, and intensively fed with a commercial growth-fattening concentrate, barley straw and water ad libitum. Mortality rate during fattening was 3.2%, on average. Fattened lambs (n = 213) were harvested at approximately 3 mo of age and < 25 kg BW as fattened light lambs for the Spanish market (so called 'Recental', < 13 kg carcass). Lambs were transported (5 km, the night before) in an adapted truck to be processed in groups of 8 to 12 in a medium size commercial slaughterhouse ('Escorxador Sabadell', Sabadell, Barcelona, Spain) equipped with a semi-automated slaughtering line working at ~200 lambs/h, on average. Lamb carcasses were weighed at the end of the slaughtering line, by hanging consecutively in groups of 8 in an on-line weighing scale, ink stamped (slaughterhouse code and week) and marked with a paper label stuck in the left Achilles tendon in which mandatory data was also recorded (slaughterhouse code, date, serial number, carcass weight). Data of lambs which died during the experiment were excluded.

6.4.1.2 Lamb identification

Visual Ear Tags. Newborn lambs were identified at birth recording (d 1 of age) with an official temporary ear tag (**V1**; 2 rectangular flags made of polyurethane with a tamper-proof male-female closing system; 2.8 g, 40 × 14.5 mm; Allflex-Azasa, Madrid, Spain) on the left ear of lambs intended for slaughter. The V1 were recorded with the unique Spanish code for the holding (12-digit code, according to the Spanish REGA national data base) and with a flock-book serial number (2 letters and 5 numbers). At weaning, approximately half of the lambs (n = 104; 47.2%) were also identified with official permanent ear tags for replacement lambs attached to the right ear (**V2**; 2 triangular flags made of polyurethane with a tamper-proof male-female closing system; 5.2 g, 38 × 39 mm; Azasa-Allflex), as secondary ID. The V2 were recorded with a unique Spanish individual code (country code, ES; individual code, 12 digits) registered in the Spanish animal identification data base (**RIIA**). Both types of ear tags (V1 and V2) agreed with the requirements laid down in the Spanish (Real Decreto 947/2005 and 1486/2009) and European (EC 21/2004 and EC 933/2008) legislations therein.

Electronic Mini-Boluses. All lambs identified with V2 at weaning were also identified at the same time with electronic mini-boluses (**MB**) accepted for official use in Spain

(Real Decreto 947/2005 and 1486/2009) and intended to be used as a secondary ID device for verifying lamb identity. Mini-boluses (n = 104) were cylindrical capsules made of high density ceramic material (19 g, 56.2 × 11.9 mm; Azasa-Allflex, Madrid, Spain), similar to those described by Ghirardi et al. (2007), which contained a standardized 32 × 3.8-mm half-duplex (**HDX**) transponder, recorded with a unique 16-digit code (country code, 0724; and same 12-digit serial code as recorded in the V2) that was also registered in the RIIA data base. Moreover, transponder code included the re-identification counter code (i.e., 0) and the sheep and goat species code (i.e., 04) in a separated partition of the information telegram, in agreement with current Spanish legislation (Real Decreto 947/2005 and 1486/2009) and with the updated ISO 11784 standard on animal electronic ID (ISO, 2009). The MB were administered by a trained operator using an adapted balling gun (Rumitag, Espluges de Llobregat, Barcelona, Spain) as indicated by Caja et al. (1999) and Ghirardi et al. (2007).

Injectable Transponders. A random sample of fattening lambs (n = 81; 38.0%) was also identified with glass-encapsulated electronic injects (injectable transponders, **IT**) of HDX technology (32 × 3.8-mm, Rumitag, Espluges de Llobregat, Barcelona, Spain) at approximately 60 d of age. They were used as a secondary ID system, in order to identify lamb carcasses and to trace the possible order changes that may have occurred during slaughtering. The IT code consisted of a 16-digit code in which the ICAR manufacturer code (0964 = Rumitag) was used in the place of the country code followed by a 12-digit serial number. Transponder codes ranged between 0964 000001035489 and 0964 000001161898. The IT were s.c. injected in the left armpit, without previous disinfection and following a caudal-cranial direction, according to the procedure described by Conill et al. (2002). One trained operator assisted by 1 restrainer performed the injections with the lambs standing up in the fattening pens. A multi-shot injector (Model Riinj-002A, Tiris, Almelo, the Netherlands) equipped with 60 × 4.8-mm open groove interchangeable needles (Model Ri-ndl-oo2a, Tiris) was used. Injection needles were disinfected between lambs using a povidone-iodine solution (Braunol, B. Braun Medical, Jaén, Spain).

Transponder Reading Procedures. Readings of MB and IT were taken on the farm and in the slaughterhouse using a standardized handheld transceiver (Smart Reader, Rumitag). On-farm MB readings were done before and after administration (at weaning, approximately 30 to 45 d of age) and the day before the lambs were harvested for slaughtering. The IT were also read on-farm immediately after injection (at approximately

60 d of age) and the V2 number and relevant animal data (gender and observations) typed and linked to the IT code in the transceiver memory. Moreover, IT were also read the day before the lambs left for slaughtering. At the slaughterhouse, both MB and IT were read at the start of the slaughtering line (end of bleeding), in the middle of the line (just before evisceration) and at the end of the slaughtering process (in the carcass) for MB and IT, respectively. Lamb order in the slaughter line was linked to the transponder code at the first reading in the start of the line and stored in the transceiver. Losses, breakages, and other possible incidences (e.g., infections or injuries) were checked at each reading and the absence of broken IT ensured by carefully palpating the injection area. An MB was deemed as lost (not retained) when the transceiver was unable to read the transponder in at least 4 successive scans. An electronic failure was assumed when an unreadable IT was deemed neither lost nor broken.

The MB were retrieved by palpation and recovered manually in the offal plant of the slaughterhouse by a trained operator. Location and recovery of the IT was performed at the end of the slaughtering line, before the hot carcasses were released to the cooling room. Total IT losses and breakages that occurred during the slaughtering process were also recorded.

On-farm and slaughterhouse data were afterwards transferred to a computerized database using specific software provided by the transceiver manufacturer (Rumitag) where the lamb order at the beginning of the slaughtering line and in carcasses was compared.

Retinal Imaging. A total of 98 fattened lambs identified with V1, V2 and MB were used for capturing the vascular pattern of the retinal image, also as a secondary ID system for verifying their identity, before leaving the farm for slaughter (at approximately 80 d of age). The retinal image of both eyes and in duplicate (196 images) were obtained using an Optireader equipment (Optibrand, Fort Collins, CO), a commercially available camera specially designed for retinal imaging of farm animals. Retinal images were obtained by a trained operator under natural daylight conditions inside the barn and following the procedure described by Rojas-Olivares et al. (2011a). In addition to retinal images, geositional coordinates, date, time, ear tag picture and capturing time (from targeting activation until a retinal image of enough quality was taken) were recorded. Captured images, and associated data, were stored on a compact flash memory card (SanDisk, Shoot & Store Card, Milpitas, CA) in the form of encrypted binary large object files (so called

“blob” files), and transferred to a central database on-line supported by using the Data Management software (v. 4.1.3) of Optibrand. Uploaded retinal images were viewed as “jpeg” files and used for subsequent matching trials of pairs of images. The software overlapped the images to compute a matching score which ranged between 0 and 100. The higher score the more likely that the images in the pair are from the same eye.

A second retinal image was obtained from the cut heads of the harvested lambs at the end of the slaughtering line. Lamb heads maintained their ears and ear tags after being detached from the carcasses. Procedure to capture the retinal images from the cut heads was similar as described for live animals. Heads were processed according to the slaughtering order. Given the low quality of the first images obtained, we decided to study the effect of head orientation in the time elapsed between head detachment and retinal imaging. The heads of a first group of lambs ($n = 67$) were processed after being left in the normal position (upwards), and the rest of the heads of lambs ($n = 31$) were reversed (downwards); in this last case, a slower bleeding was anticipated which might therefore have improved the retinal vascular pattern imaging. Retinal scans of each eye and in duplicate were obtained in all cut heads. Retinal images captured from the eyes of the live lambs were compared to the respective eyes in the cut heads of the slaughtered lambs. Matching score < 70 was used as exclusion criterion of lamb identity (0.989 sensitivity, i.e. probability of a correct match; and 0.995 specificity, i.e. probability of a correct non-match), as previously described by Gonzales-Barron et al. (2008) and Rojas-Olivares et al. (2011a).

6.4.2 Experiment 2: Traceability under large operation conditions

6.4.2.1 Animals and management

A total of 308 lambs of different Spanish local breeds (Rasa Aragonesa, Ojinegra de Teruel and Roya Bilbilitana) from the large classification and fattening unit of the “Grupo Cooperativo Pastores-Oviaragón S. C. Coop.” in Monegrillo (Zaragoza, Spain), were used. Lambs were included in the labeled meat program “Ternasco de Aragón”, recognized by the European Union as a protected geographical indication (PGI) meat by Regulation EC 1107/96 (amended by EC 392/2008).

Lambs were born on different farms associated to the Cooperative. They were weaned when they reached approximately 15 kg BW and moved to the fattening unit where they

were allocated in straw-bedded fattening pens in groups of 50 lambs. Lambs were fed with a commercial concentrate of the Cooperative (18.7% CP, DM basis; Pienso Ovirum TAE, Zaragoza, Spain), barley straw and fresh water ad libitum, until they reached the harvesting weight as intensively fattened light lambs (so called “Ternasco”, 8.5 to 12.5 kg carcass according to EC 392/2008). The lambs were transported (45 km, the afternoon before) in a truck from the transportation service of the cooperative that was specially adapted for lambs, and they were harvested as a group in a large size commercial slaughterhouse (Mercazaragoza, Zaragoza, Spain) with an automated slaughtering line working at approximately 550 lambs/h. Carcasses were automatically weighed, graded according to weight and processed in the annex packing plant of Pastores Grupo Cooperativo (Zaragoza, Spain).

6.4.2.2 Lamb identification

Visual Ear Tag. Lambs were identified at birth in the farms of origin with a visual “Tip-tag” ear tag (V3; 2 rectangular flags made of polyurethane with an opened female piece; 1.5 g, 35 × 10 mm; Azasa-Allflex, Madrid, Spain). The V3, used as primary ID, were recorded with the unique Spanish code for the holding (12-digit code, according to the Spanish REGA national data base) and an individual code according to the “Ternasco de Aragón” PGI requirements.

Injectable Transponders. All lambs were also identified at approximately 60 d of age with IT similar to those used in Exp. 1 (32 × 3.8-mm, Rumitag), as secondary ID for tracing their carcasses. Three teams of 2 operators (1 injector and 1 restrainer) injected the lambs on the same day; the injector also recorded the IT code (Gesreader 2S, Rumitag), typed the relevant lamb information (i.e., serial order, ear tag number and sex) onto the transceiver keyboard and saved the data in the transceiver memory. Transponder serial codes ranged between 0964 000001035489 and 0964 000006135674 in this case. Injections and on-farm and slaughterhouse reading and recovery were also carried out according to the procedures described previously in Exp. 1.

Carcass Labeling. Paper labels previously recorded with correlative serial numbers were used to trace the lamb carcasses order at weighing and grading. The labels were adhered to the carcass rump before the carcasses were automatically weighed and sorted

according to their weight to be graded as “Ternasco” (8.5 to 12.5 kg). Paper labels also served as a marker for IT recovery, being removed after the presence of IT was checked with the Gesreader 2S transceiver (Rumitag) and the IT retrieved.

Retinal Imaging. A sample of 153 fattened lambs, also identified with V3 and IT, were used for capturing the vascular pattern of the retinal image the day before leaving the farm to the slaughterhouse, also as a secondary ID system for verifying their identity. The retinal images of both eyes (306 images) were obtained using an Optireader camera (Optibrand) as described previously in Exp. 1 and according to the procedures reported by Rojas-Olivares et al. (2011a). A second retinal image of the both eyes was obtained from the cut heads of the harvested lambs. Lamb heads, identified by their ear tags, were processed as soon as possible after detaching from the carcass and according to the slaughtering order. Heads were maintained reversed (front down) until processing. Retinal images captured from the eyes of the live lambs were compared to the respective eyes in the cut heads of the slaughtered lambs and a matching score < 70 was used as exclusion criterion of lamb identity, as previously indicated (Gonzales-Barron et al., 2008; Rojas-Olivares et al., 2011a).

6.4.3 Statistical analyses

Results of losses, electronic failures, readability and traceability obtained with the ID devices, were analyzed using the CATMOD procedure of SAS (version 9.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC) on the basis of the categorical nature of these variables. Statistical analyses did not allow for comparisons with ID devices where readability was 100%. Matching score data of retinal images showed an excess of values equal to 100; for this reason, the one-inflated Beta distribution was used to analyze this kind of semicontinuous data, and a specific model was built for their treatment (Puig et al., 2009; Adell et al., 2010). Parameter estimation was done by maximizing the corresponding log-likelihood function using a program made in R free computing software as reported by Rojas-Olivares et al. (2011a). Signification was declared at $P < 0.05$, unless otherwise indicated.

6.5 RESULTS AND DISCUSSION

6.5.1 Experiment 1: Traceability under small operation conditions

6.5.1.1 On-farm performances of identification devices

Total number of ID devices used according to type and on-farm traceability results until harvesting, are shown in Table 6.1. No incidences or casualties were reported as a consequence of ear tagging, bolusing or injections, agreeing with the results of previous studies (Conill et al., 2002; Garín et al., 2005; Ghirardi et al., 2007). No differences in ID performances were found according to lamb breed ($P > 0.05$) and their values were pooled and the overall means calculated. Differences detected between ID devices were small and not significant ($P > 0.05$), all devices showing fewer than 2% of losses (> 98% on-farm traceability).

Retention rate obtained for V1 in our study (Table 6.1) was in the range of previous results reported for the same type of ear tags used in Spain for official temporary ID of lambs intended to slaughter, with similar breeds and under similar fattening conditions (Ghirardi et al., 2007; 100%; and, Rojas-Olivares et al., 2011ab; 97.2 and 97.1%, respectively). Nevertheless, in our study only V2 and MB showed a retention rate greater than 99%, as required by ICAR (2009) for official ID of livestock when the trials last less than 6 mo. With Rojas-Olivares et al. (2011ab), the V2 consistently showed 100% retention until the end of lamb fattening under intensive conditions.

With regard to the electronic ID devices, 1 MB was deemed lost (Table 6.1) and despite reaching the 99% required by ICAR (2009), resulting on-farm traceability was slightly lower than the 100% previously reported in lambs (Caja et al., 2007; Ghirardi et al., 2007) for MB of similar characteristics. On the other hand, traceability obtained with IT (Table 6.1) was higher than reported by Conill et al. (2002; 92.2 to 96.4%) and Hogewerf et al. (2009; 82.6%) in lambs injected in the same body site with transponders of similar length (32 mm), but applied at earlier ages (2 to 30 d of age) than in our study (approximately at 60 d of age). It should be pointed out that, in the case of Hogewerf et al. (2009), the IT were injected in a cranio-caudally direction which may have made the losses more likely. Our retention results were also greater than those obtained by Abecia et al. (2004; 91 to 98%) in “Ternasco” lambs injected in the metacarpus with small IT (12-mm) from suckling (1 to 28 d of age) to slaughter.

Table 6.1. On-farm and slaughterhouse traceability of fattening lambs according to the identification (ID) system used under the small operation conditions of Experiment 1

| Item | Visual ear tags ¹ | | Electronic devices ² | | Retinal images ³ |
|-----------------------------------|------------------------------|---------|---------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| | V1 | V2 | MB | IT | |
| On-farm | | | | | |
| Lambs identified, n | 241 | 104 | 104 | 81 | 98 |
| Mortality, n (%) | 28 (11.6) | 3 (2.9) | 3 (2.9) | 0 (0) | 0 (0) |
| ID devices | | | | | |
| Read at the start, n | 213 | 101 | 101 | 81 | 195 |
| Lost, n (%) | 1 (0.5) | 0 (0) | 1 (1.0) | 1 (1.2) | 0 (0) |
| Not readable, n (%) | 2 (0.9) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Read at the end, n | 210 | 101 | 100 | 80 | 195 |
| Traceability, % | 98.6 | 100.0 | 99.0 | 98.8 | 100.0 |
| Slaughterhouse | | | | | |
| Lambs, n ⁴ | 210 | 101 | 100 | 80 | 98 |
| ID devices | | | | | |
| Read at the start, n | 210 | 101 | 100 | 80 | 195 |
| Reading site | Ear | Ear | Rumen | Carcass | Eyes |
| Reading method | Visual | Visual | Reader ⁵ | Reader ⁵ | Camera |
| Lost, n (%) | – | – | 0 (0) | 16 (20.0) | 0 (0) |
| Not readable, n (%) | – | – | 0 (0) | 1 (1.2) ⁶ | 49 (25.0) |
| Read at the end, n | – | – | 100 ⁷ | 63 | 146 ⁸ |
| Traceability, % | – | – | 100.0 | 78.8 | 75.0 |
| Recovered devices, n (%) | – | – | 100 (100.0) | 70 (87.5) | – |
| Auditing | | | | | |
| Lamb auditing | No | Yes | Yes | Yes | Yes |
| Carcass auditing | No | No | No | Yes | No |
| Carcass order matching, % | – | – | – | 68.3 | – |
| Total traceability,% ⁹ | [67.3] | [68.3] | [67.6] | 77.9 | [51.2] |

¹Visual ear tags: V1 = official ear tag for lambs intended to slaughter consisting of 2 rectangular flags made of polyurethane and with a tamper-proof closing system (2.8 g, 40 × 14.5 mm; Azasa-Allflex, Madrid, Spain) attached to the left ear after birth; V2 = official ear tag for breeding stock consisting of 2 triangular flags made of polyurethane and with a tamper-proof closing system (5.2 g; 38 × 39 mm; Azasa-Allflex) attached to the right ear at weaning.

²Electronic identification devices: MB = mini-bolus (19 g, 56.2 × 11.9 mm; Azasa-Allflex) containing one standardized glass encapsulated half-duplex transponder (32 × 3.8 mm) applied orally at weaning; IT = injectable glass encapsulated half-duplex transponder (32 × 3.8 mm; Rumitag, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain) injected s.c. in the armpit at approximately 60 d of age.

³Images of each eye were collected separately and in duplicate at approximately 80 d of age and the day before leaving for the slaughterhouse.

⁴Only lambs effectively identified were taken into account.

⁵Handheld transceiver (Smart Reader, Rumitag, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain).

⁶Found broken by palpation after slaughter and removed from the carcasses.

⁷Read in the slaughtering line just before evisceration.

⁸ Images of each eye were collected separately and in duplicate from the cut heads at the end of the slaughtering line. Reported values refer only to lamb heads maintained downwards (front down) and retinal images with matching scores over the acceptance threshold (≥ 70).

⁹On-farm traceability × slaughterhouse traceability. The last term was replaced by carcass order matching when the tracing device was removed in the slaughtering line, and estimated values are indicated within square brackets.

6.5.1.2 Slaughterhouse performance of identification devices

All V1 and V2 retained on the farm were also readable at the start of the slaughtering line and, therefore, traceability was the same than that obtained under on-farm conditions without registering losses during transportation (Table 6.1). Nevertheless, visual tag reading is not an adequate practice for large groups of lambs at the slaughtering line and it is only performed to trace the farm of origin and to trace back the lamb ID when a problem arose. Moreover, ear tag ID was lost when the heads were detached from the slaughtered lamb bodies, traceability only being guaranteed from this moment by the carcass order in the slaughtering line.

Similarly, all MB were easily read with the handheld transceiver at the beginning of the slaughtering line (i.e., no losses during transportation) and in this case the MB code was automatically linked to the number of order in the slaughtering line. Lamb bodies still identified with MB until evisceration and all boluses were recovered from the reticulo-rumen in the offal plant of the slaughterhouse (Table 6.1). Traceability from farm to evisceration was 99%, which is a similar value to that obtained by Caja et al. (2007), who reported 99.9% traceability in lambs with MB of similar characteristics.

Regarding IT, all injects present in the harvested lambs were also easily read at the start of the slaughter line, and the number of order automatically linked to the IT code, but 21.2% of IT were lost during slaughtering (Table 6.1). This percentage of losses was greater than the values reported by Conill et al. (2002; 9.9 to 10.8%) and Hogewerf et al. (2009; 13.9%) with IT of similar characteristics and also s.c. injected in the armpit of the lambs. The difference between our results and those reported by the above indicated authors, may be related to the skinning procedure used, manually performed in Conill et al. (2002) and mechanically removed (i.e., semi-automatic screws and mechanical traction) in our study; we observed that screw application under the armpit skin caused breakage and some IT fell on the floor; 7 (8.8%) of them being recovered from the slaughterhouse floor or from the skins. As a result only 78.8% of lambs in our study were effectively traced by the IT from the start to the end of the slaughtering line (Table 6.1), which was lower percentage than previously reported by Conill et al. (2002; 89.2 to 91.3%) for lambs injected in the armpit at different ages before weaning. Additionally, although all carcasses were carefully checked to ensure that all IT were removed, only 87.4% of IT were retrieved in the slaughterhouse, the rest being lost in the skins and on

the slaughterhouse floor during the slaughtering process.

Verification of the carcass serial number, recorded on the paper label attached to the Achilles tendon at weighing, with the order of entrance in the slaughtering line, recorded on the handheld reader and linked to the IT code, only matched in 68.3% of cases (43 carcasses from the 63 which retained their IT). Direct observation in the slaughterhouse revealed that the carcass order was occasionally altered by the operator transferring the carcasses from the slaughtering line to the weighing rack of 8 carcasses, giving as a result the low traceability matching achieved.

6.5.1.3 Retinal imaging auditing

Values of matching score, capturing time, images rejected and percentage of retinal images over the acceptance threshold (≥ 70) according to lamb condition (alive or harvested) and position of the head after slaughter (upwards or downwards) are shown in Table 6.2. As previously reported by Rojas-Olivares et al. (2011a), no differences by breed or between left and right eyes were observed ($P > 0.05$) and, therefore, their values were considered independent, pooled and overall means calculated. Values in live lambs were similar to those reported by Rojas-Olivares et al. (2011ab) in 3 mo of age fattening lambs. No differences were observed in matching scores of the inter-duplicate retinal image comparisons of live and harvested lambs (Table 6.2; $P > 0.05$). Nevertheless, retinal images of harvested lambs had lower matching score values than live lambs, the difference being 15.6 units ($P < 0.001$), on average, as a consequence of the lower quality of the retinal images obtained (i.e., low contrast, frequent blurring, corneal opacity). This loss in matching score decreased the percentage of accepted images by 29.2%, on average, although capturing time and number of images rejected did not increase similarly (Table 6.2). On the contrary, both capturing time and rejected images values did not differ ($P > 0.05$) between live lambs and harvested lambs, indicating that the operator rapidly obtained the best image possible from the cut lamb head.

Interestingly, the simple operation of inverting the heads during the awaiting period, slightly increased the matching score of the live vs. harvested lambs comparison (+6.3, $P < 0.05$; Table 6.2) although it did not change the matching score between live and harvested lambs retinal image duplicates. This slight increase markedly raised (+33%, $P < 0.05$) the percentage of images over the acceptance criterion which reached 75.0%.

Table 6.2. Retinal image comparison in live and harvested lambs under small operation conditions (values are means \pm SE)

| Item | Retinal image comparison | | Lamb head orientation after cutting | | Overall |
|---|--|--|--|--|---|
| | Reference | Problem | Front up ¹ | Front down ² | |
| Lambs, n | Live Harvested | – – | 67 67 | 31 31 | 98 98 |
| Eyes, n | Live Harvested | – – | 133 ³ 134 | 62 61 ³ | 195 195 |
| Matching score | Live Harvested ⁴ Live | Live ⁴ Harvested ⁴ Harvested | 95.3 \pm 0.5 ^x 80.0 \pm 1.4 ^y 69.9 \pm 1.1 ^{az} | 96.9 \pm 0.7 ^x 80.7 \pm 1.9 ^y 76.2 \pm 1.7 ^{bz} | 95.8 \pm 0.4 ^x 80.2 \pm 1.1 ^y 71.8 \pm 1.0 ^z |
| Capturing time, s | Live Harvested | – – | 24.4 \pm 2.3 20.3 \pm 1.9 | 21.0 \pm 2.0 20.8 \pm 3.2 | 22.6 \pm 1.5 20.5 \pm 1.9 |
| Images rejected, n | Live Harvested | – – | 1.1 \pm 0.1 1.5 \pm 0.2 ^a | 0.8 \pm 0.1 0.5 \pm 0.1 ^b | 1.0 \pm 0.1 1.0 \pm 0.1 |
| Images over the acceptance Matching threshold (≥ 70), % | Live Harvested ⁴ Live | Live ⁴ Harvested ⁴ Harvested | 100 70.1 ^x 56.4 ^{ay} | 100 72.1 ^x 75.0 ^{bx} | 100 70.8 ^x 62.2 ^x |

¹Orientation in which the lamb head was left with the front upwards (natural position) after detaching it from the carcass.

²Orientation in which the lamb head was left with the front downwards (inverted) after detaching it from the carcass.

³One image was not recorded by and operator mistake.

⁴Comparison between duplicates.

^{a-b} Within a row, values with different superscript differ ($P < 0.05$).

^{x-z} Within a column, for the same variable, values with different superscript differ ($P < 0.05$).

In practice, that means that 3 of every 4 lambs can be efficiently audited after slaughter by retinal imaging of their heads if they are not detached from the body (e.g., halal and kosher slaughtering practices) or if ear tags or slaughtering order were maintained. Moreover, percentage of accepted images with the heads reversed increased to 83.3% when the retinal image acceptance threshold was reduced to ≥ 65 (62.4% for the heads placed in the normal position), which slightly decreased the specificity of the live to harvested comparison. Development of adapted software for eyes of animals recently slaughtered will require further research.

6.5.2 Experiment 2: Traceability under large operation conditions

6.5.2.1 On-Farm performance of identification devices

The retention of the V3 used in the lambs under large fattening unit conditions (Table 6.3) was lower than those obtained with V1 and V2 official ear tags in the experimental farm in Exp. 1. Moreover, losses were greater than those reported for similar “Tip-tag” ear tags by Conill et al. (2002; 6.3%), Garín et al. (2005; 2.1 to 3.2%) and Ghirardi et al. (2006; 1.9%) in suckling and fattening lambs of the same breeds, which may be a consequence of the large operation management conditions used in our case (i.e., transportation from the farm of birth, classification management and large fattening groups). Obtained results indicate the inadequacy of using simple and non tamper-proof ear tags to guarantee high traceability values in lambs. Our results also give farmers a reason for using the currently proposed official ear tag models in Spain, they are a little more expensive, but largely more retainable under commercial farm conditions in fattening lambs as shown in Exp. 1. Traceability obtained with V3 (Table 6.3) was lower than that reported by Caja et al. (2007; 96.8%) for the same type of ear tags used in fattening lambs, as well as that previously reported with V1 and V2 in Exp. 1 (Table 6.1).

Regarding IT, reading of devices the day before lambs were sent to the slaughterhouse (approximately 1 mo after injection) showed a moderate rate of IT losses (4.9%; Table 6.3). Two lambs died during the fattening period for reasons not related to the injection procedure. No injuries or apparent infections were detected in the fattened lambs. On-farm traceability obtained with IT was 95.1% as a consequence (Table 6.3), which falls within the range of values reported for the same type of IT in fattening lambs (Hogewerf et al.,

2009; 82.6%; Conill et al., 2002; 96.4%) and the on-farm value obtained in Exp. 1 (98.8%; Table 6.1), but was lower than the 99% required for official devices by ICAR (2009) in the short term (< 6 mo).

Table 6.3. On-farm and slaughterhouse traceability of fattening lambs according to the identification (ID) system used under the large operation conditions of Experiment 2

| Item | Visual ear tags ¹ | Injectable transponders ² | Retinal Images ³ | Carcass labels ⁴ |
|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| On-farm | | | | |
| Lambs identified, n | 308 | 308 | 153 | 306 |
| Mortality, n (%) | 2 (0.6) | 2 (0.6) | – | – |
| ID devices | | | | |
| Read at the start, n ⁵ | 305 ⁶ | 306 | – | – |
| Lost, n (%) | 38 (12.5) | 15 (4.9) | – | – |
| Not readable, n (%) | 0 (0) | 0 (0) | – | – |
| Read at the end, n | 267 | 291 | 306 | – |
| Traceability, % | 87.5 ^b | 95.1 ^a | – | – |
| Slaughterhouse | | | | |
| ID devices | | | | |
| Read at the start, n | 267 | 287 ⁷ | 306 | 306 |
| Reading site | Ear | Carcass | Eye | Rump |
| Reading method | Visual | Reader | Camera | Visual |
| Lost, n (%) | – | 103 (35.9) | 0 (0) | 0 (0) |
| Not readable, n (%) | – | 0 (0) | 92 (30.0) | 0 (0) |
| Read at the end, n | – | 184 | 214 ⁸ | 306 |
| Traceability, % | – | 64.1 ^b | 70.0 ^a | 100.0 |
| Recovered devices, n (%) | – | 205 (71.4) ⁹ | – | 306 (100.0) |
| Auditing | | | | |
| Lamb auditing | No | Yes | Yes | No |
| Carcass auditing | No | Yes | No | Yes |
| Carcass order matching, % | – | 100.0 | – | 100.0 |
| Total traceability, % ¹⁰ | [87.5] | 63.2 | [70.0] | – |

¹Tip-tag ear tags for lambs intended to slaughter consisting of 2 rectangular flags made of polyurethane (2.8 g, 40 × 14.5 mm; Azasa-Allflex, Madrid, Spain).

²Injectable glass encapsulated full-duplex transponder (32 × 3.8 mm; RumiTag, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain) injected s.c. in the armpit approximately 30 d before slaughter.

³Single retinal images of both eyes of each lamb were collected the day before slaughtering.

⁴Paper labels recorded with a serial number and adhered to the left rear leg of the carcass.

⁵Only live lambs effectively identified were taken into account.

⁶One lamb did not wear official ear tags and their ears were observed as intact.

⁷Four transponders were not read at the start of the line and were considered as transportation losses (1.4%).

⁸Single retinal images of both eyes were collected from the cut heads maintained downwards (front down) during slaughtering. Reported values refer only to retinal images with matching scores over the acceptance threshold (≥ 70).

⁹Twenty-one injectable transponders were retrieved from lamb skins and 1 was found broken in the breast at carcass cutting before packing.

¹⁰On-farm traceability × slaughterhouse traceability. The last term was replaced by carcass order matching when the tracing device was removed in the slaughtering line, and estimated values are indicated within square brackets.

^{a-b} Values within a row followed with different superscript letters are different ($P < 0.05$).

6.5.2.2 Slaughterhouse performance of identification devices

No V3 losses occurred during transportation and all ear tags were readable at the start of the slaughtering line. As previously indicated in Exp. 1, carcasses lose their ID when the heads were detached from the lamb body and final traceability fully depended on the ability to maintain the carcass order.

With this regard, the IT retained under on-farm conditions were used to assess on the carcass order in the slaughtering line by electronically reading and automatic recording their codes and order by the Smart Reader transceiver. Despite being read the day before, only 287 IT (98.6%) were read at the beginning of the slaughtering line. Lacking IT (n = 4) were not found during slaughtering and were considered as losses that occurred during transportation (1.4%; Table 6.3).

Losses of IT during slaughtering (35.9%) were greater than those obtained in Exp. 1 (21.2%; Table 6.1), and those reported by Conill et al. (2002; 10.8%) and Hogewerf et al. (2009; 13.9%). The high rate of losses obtained in this experiment may be related to the automated skinning machine operating in the slaughtering line and to the high carcass throughput of the slaughtering line. Some of the recovered IT were directly picked up by the staff of the slaughterhouse because they saw them loose on the carcass surface.

Consequently, final traceability was 63.2%, which was lower than that obtained in Exp. 1 (77.8%) and that reported by Conill et al. (2002; 89.2%). Nevertheless, maintained IT at the end of the line and paper labels attached to the rump of the carcasses allowed us to confirm that no order changes occurred during the slaughtering process (Table 6.3). So, despite its high carcass throughput, an efficient individual traceability system was possible in the slaughterhouse if an automatic reading system (e.g., radiofrequency transceiver) were installed in the beginning of the line, and the lambs identified with high retention rate ID devices (e.g., official electronic ear tags or boluses).

6.5.2.3 Retinal imaging auditing

Results of using retinal imaging for auditing the lamb ID after slaughter are shown in Table 6.3. Values of percentage of images above the acceptance criteria under the operating conditions used (single images, head maintained downward) was 70.0%. The remainder were retinal images that were unaccepted by the Optibrand software because,

despite belonging to the same lamb (live vs. harvested), their quality was not enough to produce $MS \geq 70$. Percentage of accepted images increased to 80.0% when matching score acceptance criteria was settled at ≥ 65 .

The use of retinal imaging as the auditing system for verifying lamb identity in the slaughtering line, according to the procedure used, allowed us to verify the identity of 306 eyes (153 heads) in a total of 2.21 h (26 s/eye) and under large operation conditions. In practice, given that the average throughput of the slaughtering line was ~ 550 lambs/h (~ 6 s/lamb), the proposed methodology should make possible the on-line auditing of the identity of approximately one fifth of the lambs ($20\% \times 0.70 = 14\%$ lambs effectively verified) which surpasses the most exigent sampling criteria for meat chain traceability auditing (e.g., 2 to 10% samples).

6.6 CONCLUSIONS

Obtained results of on-farm traceability in fattening lambs under small operation conditions were adequately efficient ($> 98\%$; ICAR, 2009), despite the ID systems used (i.e., official ear tags, mini-boluses, injectable transponders and retinal images). Nevertheless, slaughterhouse traceability was dramatically impaired by occasional change of carcass order at weighing and transferring the carcasses to the racks in which they were released for refrigeration. Automatic on-line weighing or adoption of a system impeding changing carcass order at the end of the slaughtering line should be implemented in this type of operations to avoid mislaying lamb carcasses in the meat chain. Moreover, the secondary ID devices used (i.e., second official ear tag, electronic bolus, injectable transponders) were efficient for auditing live lambs, but not carcasses; in this last case a secondary ID system also for carcasses (e.g., ink stamps, paper or electronic labels) was required. The use of retinal images was a valid tool for auditing the identity of live lambs and, in most of them, also after harvesting. The system will be especially useful for auditing ethnic lamb carcasses (e.g., halal and kosher lambs).

On the other hand, results of on-farm traceability under large operation conditions were dramatically affected by the ID system used (i.e., non official ear tags, injectable transponders and retinal images). The use of non-official ear tags without a tamper-proof closing system (e.g. “Tip-tag” ear tags) is not advised as it is the main cause of losing the traceability in the lamb meat-chain. On the contrary, the use of a high throughput

automated slaughtering line was compatible with maintaining the carcass order and traceability during slaughtering. As a result, implementation of individual traceability system for the full process (from farm to carcass) may be possible under large operation conditions if the lambs were tagged with electronic devices (e.g., radiofrequency ear tags and boluses) and if an automatic reader were installed at the start of the slaughtering line. Use of retinal imaging may also be of interest for rapidly verifying the identity of the slaughtered lambs when random sampling and auditing on-line during the slaughtering process is needed.

We do not recommend the use of injectable transponders for the ID and traceability of lambs in practice, agreeing with previous research, though we confirm that their use as a tool for tracing lamb carcasses may be beneficial when their identity from farm to the end of the slaughtering line might be compromised.

CAPITULO 7

Conclusiones

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en las distintas experiencias llevadas a cabo en la presente Tesis Doctoral corresponden a las siguientes:

7.1. Puesta a punto de la tecnología de imagen retinal en ganado ovino

- La utilización de la imagen retinal resultó una metodología de sencilla y rápida realización para verificar la identidad de corderos de 3 a 12 meses de edad en condiciones de granja. Un operador puede ser entrenado en un plazo de aproximadamente una semana (6 sesiones) para capturar imágenes de calidad en menos de 30 s por animal.
- Se recomienda utilizar un valor umbral de índice de coincidencia (“matching score”) para aceptar o rechazar la identidad de un animal de 70, con la finalidad de minimizar la tasa de falsos positivos y de falsos negativos. La especificidad y sensibilidad obtenida para este valor fueron del 99,5 y 98,9%, respectivamente.
- Se detectó que entre un 2 al 7% de los duplicados de las imágenes comparadas, pese a presentar calidad suficiente, fueron consideradas como diferentes (falsos negativos) por el software utilizado para determinar el “matching score”. Por esta razón, se recomienda la verificación visual de los pares de imágenes rechazados.
- En las condiciones de este trabajo, el uso de imágenes retinales permitió verificar el 100% de las identidades de corderos marcados mediante crotales oficiales y mini-bolos electrónicos que fueron trazados hasta la edad de 1 año.

7.2. Determinación de la edad óptima para capturar la imagen retinal de referencia en corderos de distintas edades

- La comparación de imágenes obtenidas en corderos desde su nacimiento permitió confirmar que la captura de imágenes retinales de referencia en corderos es posible desde el primer día y que el patrón de vascularización no cambia con la edad.

- Pese a que para la toma de las imágenes retinales es suficiente con una inmovilización manual de los corderos, se recomienda su sujeción mediante el uso de un cornadizo adaptado a la edad de los animales, para así lograr el menor tiempo de captura de imágenes de calidad.
- Los valores de “matching score” obtenidos variaron de acuerdo a la edad de los corderos, siendo más bajos en las comparaciones hechas con imágenes tomadas en animales jóvenes como consecuencia de su menor calidad (i.e., imágenes desenfocadas o poco contrastadas) por lo que no se recomienda tomar imágenes de referencia antes de la semana de edad.
- A los efectos de trazabilidad, se recomienda utilizar imágenes retinales capturadas entre los 30 y los 80 días de edad, como referencia para comparaciones a edades posteriores.
- No se observaron cambios apreciables en el patrón vascular desde 1 día hasta 1 año de edad, lo que confirma su invariabilidad durante el desarrollo de los ovinos.

7.3. Evaluación del uso de la imagen retinal para la auditoría de un sistema de trazabilidad de corderos basado en dispositivos visuales y electrónicos, en condiciones de granja y matadero

- El uso de crotales oficiales, mini-bolos y transpondedores inyectables como métodos de identificación primario y secundario resultó suficientemente eficiente para trazar corderos vivos en condiciones de trabajo a pequeña y gran escala, pero no para sus canales.
- La captura de imágenes retinales en corderos en condiciones de matadero, aunque fue factible, se vio notablemente reducida debido a la pérdida de calidad de las imágenes por la disminución de la presión de los vasos sanguíneos retinales y de la transparencia de la córnea.
- La inversión de la cabeza durante el tiempo transcurrido desde su corte hasta la toma de la imagen retinal, mejoró notablemente los valores de “matching score”, así como el porcentaje de pares de imágenes sobre el valor umbral de aceptación, permitiendo confirmar la identidad del 75% de los corderos en matadero.

- El análisis de los resultados de la trazabilidad actualmente conseguida en la cadena de la carne de cordero española, a pequeña y gran escala, indican que resultaría posible implementar un sistema automático de trazabilidad individual en granja y matadero si se utilizaran dispositivos electrónicos y se asegurara el orden de las canales en las líneas de sacrificio, lo que podría representar un importante valor añadido en la industria ovina nacional.

Se concluye finalmente que la metodología de las imágenes retinales resultó de especial interés en la verificación de la identidad de los corderos en esquemas de trazabilidad en los que las canales conservan la cabeza después del sacrificio, como es el caso de corderos destinados a carnes de consumo étnico (p.e., halal y kosher).

CAPITULO 8

Bibliografía

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

- Abecia, J. A., J. A. Valares, F. Forcada, I. Palacín, and L. García. 2004. Utilización de unidades electrónicas subcutáneas para la identificación del ganado ovino. *Pequeños Rumiantes* 5:10-14.
- Adell, N., P. Puig, M. A. Rojas-Olivares, G. Caja, S. Carné, and A. A. K. Salama. 2011. A bivariate model for retinal image identification. *Biometrics* (submitted 27-11-2010).
- AECOC. 2010. Guía de Trazabilidad de Productos Envasados. Manual de Implantación de los estándares GS1. 22 p. Disponible en: <http://www.aecoc.es>. Acceso: Noviembre 8, 2010.
- Allen, A., B. Golden, M. Taylor, D. Patterson, D. Henriksen, and R. Skuce. 2008. Evaluation of retinal imaging technology for the biometric identification of bovine animals in Northern Ireland. *Livest. Sci.* 116:42-52.
- Ammendrup, S., and L. O. Barcos. 2006. The implementation of traceability systems. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. Off. Int. Epiz.* 25:763-773.
- Arana, A., B. Soret, I. Lasa, and L. Alfonso. 2002. Meat traceability using DNA markers: Application to the beef industry. *Meat Sci.* 61:367-373.
- Babot, D., M. Hernández-Jover, G. Caja, C. Santamarina, and J. J. Ghirardi. 2006. Comparisons of conventional and electronic identification devices in pigs: On-farm performances. *J. Anim. Sci.* 84:2575-2581.
- Bambauer, R. 2007. Strategic approach to the development of animal identification and movement control (traceability) systems. The linkage to veterinary surveillance and other agriculture and livestock databases. *ICAR Tech. Series* 12:11-27.
- Barry, B., U. Gonzales-Barron, K. Mc Donnell, F. Butler, and S. Ward. 2007. Using muzzle pattern recognition as a biometric approach for cattle identification. *Trans. Am. Soc. Agric. Biol. Eng.* 50:1073-1080.
- Barry, B., G. Corkery, U. Gonzales-Barron, K. Mc Donnell, F. Butler, and S. Ward. 2008. A longitudinal study of the effect of time on the matching performance of a retinal recognition system for lambs. *Comp. Elec. Agric.* 64:202-211.
- Bellhorn, R. W. 1997. Retinal nutritive systems in vertebrates. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.* 6:108-218.

- Blancou, J. 2001. A history of the traceability of animals and animal products. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:420-425.
- Burghardt, T., and N. Campbell. 2007. Individual animal identification using visual biometrics on deformable coat-patterns. in *Proceedings of the 5th International Conference on Computer Vision Systems*. Disponible en: <http://www.cs.bris.ac.uk/Publications/Papers/2000684.pdf>. Acceso: Noviembre 9, 2010.
- Caja, G., R. Nehring, and C. Conill. 1998a. Identificación electrónica de animales de producción. *Albeitar*, 13:1-4.
- Caja, G., O. Ribó, and R. Nehring. 1998b. Evaluation of migratory distance of passive transponders injected in different body sites of adult sheep for electronic identification. *Livest. Prod. Sci.* 55:279-289.
- Caja, G., O. Ribó, R. Nehring, C. Conill, S. Peris, D. Solanes, J. L. Montardit, M. J. Milán, B. Farriol, J. Vilaseca, J. M. Álvarez, A. Díez, and O. Aguilar. 1998c. Coupling active and passive telemetric (CAPT) data collection for monitoring, control and management of animal production at farm and sensorial level. Contract AIR 3 PL 93 2304, Research Project, Final Report.
- Caja, G., C. Conill, R. Nehring, and O. Ribó. 1999. Development of a ceramic bolus for the permanent electronic identification of sheep, goat and cattle. *Comp. Elec. Agric.* 24:45-63.
- Caja, G., M. Hernández-Jover, J. Ghirardi, D. Garín, and J. Mocket. 2002. Aplicación de la identificación electrónica a la trazabilidad del ganado y de la carne. in *II Seminario Internacional Fundisa.. J. Lizaso, A. Antón (Ed.). Fundisa, Madrid.* pp. 147-167.
- Caja, G., J. J. Ghirardi, M. Hernández-Jover, and D. Garín. 2004. Diversity of animal identification techniques: From “fire age” to “electronic age”. *ICAR Tech. Series 9*: 21-41.
- Caja, G., M. Hernandez-Jover, C. Conill, D. Garín, X. Alabern, B. Farriol, and J. J. Ghirardi. 2005. Use of ear tags and injectable transponders for the identification and traceability of pigs from birth to the end of the slaughter line. *J. Anim. Sci.* 83:2215-2224.
- Caja, G., F. Haque, J. W. Oltjen, L. J. Butler, J. L. Evans, and V. J. Velez. 2007a. Estimation of no-return costs for different cattle identification systems in California. *J. Anim. Sci.* 85 Suppl. 1:334 (Abstr.).

- Caja, G., J. J. Ghirardi, M. Hernández-Jover, and A. Sánchez. 2007b. A dual system based on the use of electronic identification and molecular markers to ensure lamb traceability. *J. Anim. Sci.* 85 Suppl. 1: 30 (Abstr.).
- Caporale, V., A. Giovannini, C. Di Francesco, and P. Calistri. 2001. Importance of the traceability of animals and animal products in epidemiology. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:372-378.
- Capote, J., D. Martín, N. Castro, E. Muñoz, J. Lozano, S. Carné, J. J. Ghirardi, and G. Caja. 2005. Retención de bolos ruminales para identificación electrónica en distintas razas de cabras españolas. *ITEA 26 (Vol. Extra):297-299.*
- Carné, S., G. Caja, J. J. Ghirardi, and A. A. K. Salama. 2009. Long-term performance of visual and electronic identification devices in dairy goats. *J. Dairy. Sci.* 92:1500-1511.
- Carné, S., G. Caja, M. A. Rojas-Olivares, and A. A. K. Salama. 2010. Readability of visual and electronic leg tags versus rumen boluses and electronic ear tags for the permanent identification of dairy goats. *J. Dairy Sci.* 93:5157-5166.
- Carné, S., G. Caja, J. J. Ghirardi, and A. A. K. Salama. 2011. Modeling the retention of rumen boluses for the electronic identification of goats. *J. Dairy Sci.* (in press).
- Castro, N., D. Martín, A. Castro-Alonso, A. Argüello, J. Capote, and G. Caja. 2010. Suitability of electronic mini-boluses for the early identification of goat kids and effects on growth performance and development of the reticulorumen. *J. Anim. Sci.* 88:3464-3469
- Conill, C. 1999. Utilización de transpondedores inyectables y de bolos ruminales para la identificación electrónica por radio frecuencia de ganado bovino y ovino. Ph.D. Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Conill, C., G. Caja, R. Nehring, and O. Ribó. 2002. The use of passive injectable transponders in fattening lambs from birth to slaughter: Effects of injection position age and breed. *J. Anim. Sci.* 80:919-925.
- Cook, D. O., R. Kieschnick, and B. D. McCullough. 2008. Regression analysis of proportions in finance with self selection. *J. Empirical Finance* 15:860-867.
- Cox, D. R. 1970. *The Analysis of Binary Data.* Chapman & Hall, London, UK.
- Cunningham, E. P., and C. M. Meghen, 2001. Biological identification systems: genetic markers. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:491-499.

- De Schaepdrijver, L., L. P. Simoens, H. Lauwers, and J. P. de Geest. 1989. Retinal vascular patterns in domestic animals. *Res. Vet. Sci.* 47:34–42.
- Dagg, P. J., R. J. Butler., J. G. Murray., and R. R. Biddle. 2006. Meeting the requirements of importing countries: practice and policy for on-farm approaches to food safety. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 25:685-700.
- Dalvit, C., M. de Marchi, and M. Cassandro. 2007. Genetic traceability of livestock products : A review. *Meat Sci.* 77:437-449.
- Directiva No 76/749/CEE de 27 de julio de 1976, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L262 27.9.1976.*
- Directiva No 89/396/CEE de 14 de junio de 1989 relativa a las menciones o marcas que permitan identificar el lote al que pertenece un producto alimenticio. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L186 30.6.1989.*
- Directiva No 92/102/CEE de de 27 de noviembre de 1992, relativa a la identificación y al registro de animales. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 355 5.12.1992.*
- Duran, H. 2001. Identificación no es trazabilidad. *Revista Plan Agropecuario*. Disponible en: http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R98/R98_28.htm. Acceso: Noviembre 9, 2010.
- Dziuk, P. 2003. Positive, accurate animal identification. *Anim. Reprod. Sci.* 79:319-323.
- EAN International. 2002. Traceability of beef. Application of EAN•UCC standards in implementing regulations (EC) 1760/2000. 3ª edition. 24 p.
- Edwards, D. S., A. M. Johnston, and D. U. Pfeiffer. 2001. A comparison of commonly used ear tags on the ear damage of sheep. *Anim. Welf.* 10:141–151.
- Ehrenhofer, M. C. A., C. A. Deeg, S. Reese, H-G. Liebich, M. Stangassinger, and B. Kaspers. 2002. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Veterinary Ophthalmology.* 5:39-47.
- FAO/OMS. 2006. Codex Alimentarius. CAC/GL 60. Principios para la Rastreabilidad/Rastreo de Productos como herramienta en el contexto de la inspección y certificación de alimentos. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.net>. Acceso: Octubre 23, 2010.

- Felmer, R., R. Chávez, A. Catrileo, and C. Rojas. 2006. Tecnologías actuales y emergentes para la identificación animal y su aplicación en la trazabilidad animal. *Arch. Med. Vet.* 38:197-206.
- Ferrari, S. L. P., and F. Cribari-Neto. 2004. Beta regression for modelling rates and proportions. *J. Appl. Stat.* 31:799-815.
- Flores, C., G. Caja, R. Casals, E. Albanell, and X. Such. 2008. Performance of dairy ewes fed diets with a fibrolytic enzyme product included in the concentrate during the suckling period. *Animal* 2:962–968.
- Flower, R. W., D. S. McLeod, G. A. Luty, B. Goldberg, and S. D. Wajer. 1985. Postnatal retinal vascular development of the puppy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26:957–968.
- Galán, A., E. M. Martín-Suárez, and J. M. Molleda. 2006. Ophthalmoscopic characteristics in sheep and goats: Comparative study. *J. Vet. Med. A.* 53:205–208.
- Garín, D. 2002. Desarrollo de bolos ruminales para la identificación electrónica de corderos y efectos de su utilización. Ph.D. Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Garín, D., G. Caja, and, C. Conill. 2003. Effects of small ruminal boluses used for electronic identification of lambs on the growth and development of the reticulorumen. *J. Anim. Sci.* 81:879-874.
- Garín, D., G. Caja, and C. Conill. 2005. Performance and effects of small ruminal boluses for the electronic identification of fattening lambs. *Livest. Prod. Sci.* 92:47-58.
- Ghirardi, J. J., G. Caja, C. Conill and M. Hernández-Jover. 2005. Comparison of conventional and electronic identification methods in beef cows under rangeland and long term conditions. in 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production (EAAP), Uppsala, Book of Abstracts N°12. Wageningen Academic Publishers, Wageningen. p. 6
- Ghirardi, J. J. 2006. Aspectos claves de la utilización de bolos ruminales en identificación electrónica y trazabilidad de bovinos y ovinos. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Ghirardi, J. J., G. Caja, D. Garín, J. Casellas, and M. Hernández-Jover. 2006a. Evaluation of the retention of electronic identification boluses in the forestomachs of cattle. *J. Anim. Sci.* 84:2260-2268.

- Ghirardi, J. J., G. Caja, D. Garín, M. Hernández-Jover, O. Ribó, and J. Casellas. 2006b. Retention of different sizes of electronic identification boluses in the forestomachs of sheep. *J. Anim. Sci.* 84:2865-2872.
- Ghirardi, J. J., G. Caja, C. Flores, D. Garín, M. Hernández-Jover, and F. Bocquier. 2007. Suitability of electronic mini-boluses for the early identification of lambs. *J. Anim. Sci.* 85:248-257.
- Golden, B. L., B. E. Rollin, R. V. Switzer, and C. R. Comstock. 2004. Retinal vasculature image acquisition apparatus and method. Colorado State University Research Foundation. Patent No 6766041.
- Gonzales-Barron, U., and S. Ward. 2005. Review of biometric and electronic systems of livestock identification, The Biotrack Project. Biosystems Engineering, University College Dublin. 64 p.
- Gonzales-Barron, U., G. Corkery, B. Barry, F. Butler, K. McDonnell, and S. Ward. 2008. Assessment of retinal recognition technology as a biometric method for sheep identification. *Comp. Elec. Agric.* 60:156-166.
- Green, R., and M. Hy. 2002. La traçabilité: Un instrument de la sécurité alimentaire. *Agroalim.* 15:19-28.
- GS1.2010. The value and benefits of the GS system of standards. 32 p. Disponible en: http://www.gs1.org/sites/default/files/docs/GS1_System_of_Standards.pdf. Acceso: Noviembre 8, 2010.
- Hellström, A., B. Carlsson, A. Niklasson, K. Segnestam, M. Boguszewski, L. de Lacerda, M. Savage, J. E. Svensson, L. Smith, D. Weinberger, K. A. Wikland, and Z. Laron. 2002. IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. *Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 3413–3416
- Hernández-Jover, M. 2006. Application of the electronic identification for swine traceability. Ph.D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Hogewerf, P. H., A. H. Ipema, G. P. Binnendijk, E. Lambooi, and H. J. Schuiling. 2009. Using injectable transponders for sheep identification. in *Precision Livestock Farming '09*. C. Lokhorst and P. W. G. Groot Koerkamp, ed. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. p. 251-258.
- ICAR (International Committee for Animal Recording). 2009. International Agreement of Recording Practices. Guidelines approved by the General Assembly held in Niagara Falls, USA. June 2008, International Committee for Animal Recording. Rome, Italy.

- INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Editions Quæ. Versailles, France.
- ISO (International Organization for Standardization). 1996. Radio-frequency identification of animals-Technical concept. ISO 11785:1996 (E). 2nd ed. Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). 2006. Code for the representation names of countries and their subdivisions. Part 1: Country codes. ISO 3166-1:2006 2009-10-15, Geneva, Switzerland, 69 pp.
- ISO (International Organization for Standardization). 2009. Radio-frequency Identification of Animals-Code structure. Draft Amendment ISO 11784:1996/D Amd 2 (E). Geneva, Switzerland.
- Jain, A. K., A. Ross, and S. Prabhakar. 2004. An introduction to biometric recognition. In: IEEE Transactions on Circuits and Systems for Video Technology, Special Issue on Image- and Video-based Biometrics, 14:4-20.
- Lambooij, E., N. G. Langeveld, G. H. Lammers, and J. H. Huiskes. 1995. Electronic identification with injectable transponders in pig production: Results of a field trial on commercial farms and slaughterhouses concerning injectability and retrievability. *Vet. Q.* 17:118-123.
- Landais, E. 2001. The marking of livestock in traditional pastoral societies. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:463-479.
- López, M., P. Mallorquín, M. Vega. 2003. Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Informe de vigilancia tecnológica. Fundación Española para el desarrollo de la investigación en genómica y proteómica/Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid. 79 p.
- Marie, C., F. Barillet, X. Such, F. Bocquier, and G. Caja. 2002. Efficacité alimentaire selon le potentiel laitier des brebis. *Opt. Mediterr. Ser. B* 42:57-71.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). 2007. Guías de prácticas correctas de higiene: Ovino de carne. MAPA e INTEROVIC, 2nd ed. Disponible en: <http://www.mapa.es/ganaderia/pags/practicas/INTEROVIC.pdf> Acceso: Noviembre 15, 2010.
- Masek, L. 2003. Recognition of human iris patterns for biometric identification. Report for Bachelor Engineering degree. University of Western Australia.
- Masters, B.R., 2004. Fractal analysis of the vascular tree in the human retina. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 6:427-452.

- McGrann, J., and H. Wiseman. 2001. Animal traceability across national frontiers in the European Union. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:406-412.
- McKean, J. D. 2001. The importance of traceability for public health and consumer protection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:363-371.
- Michaelson, I. C. 1980. *Textbook of the fundus of the eye*. Third Edition. Churchill Livingstone. Edinburgh. 910 p.
- Minagawa, H., T. Fujimura, M. Ichiyanagi, and K. Tanaka. 2002. Identification of beef cattle by analyzing images of their muzzle patterns lifted on paper. *Publications of the Japanese Society of Agricultural Informatics.* 8:596-600.
- Moreira, R., and P. Gecele. 2005. Trazabilidad (rastreadabilidad) en animales y su importancia en las exportaciones pecuarias. Área de Recursos Naturales. Universidad Santo Tomás, Santiago de Chile. Disponible en: <http://www.ust.cl/medios/Biblioteca2/Publicaciones/Informes/informernaturales4.pdf>. Acceso: Noviembre 8, 2010.
- Musgrave, C., and J. L. Cambier. 2002. System and method of animal identification and animal transaction authorization using iris pattern. Patent No 6424727.
- Olkin, I., and R. Liu. 2003. A bivariate beta distribution. *Stat. Probability Lett.* 62:407-412.
- OMC (Organización Mundial del Comercio). 2005. Serie de los acuerdos de la OMC. Medidas Sanitarias y Fitosanitarias. 62 p. Disponible en: www.wto.org/spanish/res_s/booksp_s/agrmtseries4_sps_08_s.pdf. Acceso: Noviembre 8, 2010.
- Opara, L. U. 2003. Traceability in agriculture and food supply chain: A review of basic concepts, technological implications, and future prospects. *Food, Agriculture and Environment.* 1:101-106.
- Pedernera-Romano, C., J. L. Ruiz de la Torre, Ll. Badiella, and X. Manteca. 2010. Associations between open field behaviour and stress-induced hyperthermia in two breeds of sheep. *Anim. Welf.* (in press).
- Peterson, M.A., 2001. *Mathematical Meristems: The Singularities of Laplacian Growth*. in: *Branching in nature: dynamics and morphogenesis of branching structures, from cell to river networks*. Les Houches School, October 11–15, 1999/Eds, V. Fleury, Gouyet, J.F., Leonetti, M. Berlin; New York: Springer; Les Ulis:EDP Sciences, c2001.

- Pettitt, R. G. 2001. Traceability in the food animal industry and supermarket chains. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:584-597.
- Puig, P., N. Adell, M. A. Rojas-Olivares, G. Caja, S. Carné, and A. A. K. Salama. 2009. Statistical models for retinal image matching. in *Proc. 24th Int. Workshop on Statistical Modelling*. Ithaca, NY. pp. 295-299.
- Real Decreto 947/2005 de 29 de julio 2005 por el que se establece un sistema de identificación y registro de los animales de las especies ovina y caprina. *Boletín Oficial del Estado*. N° 181 de 30.7.2005.
- Real Decreto 1486/2009 de 26 de septiembre 2009, por el que se modifica el Real Decreto 947/2005, de 29 de julio, por el que se establece un sistema de identificación y registro de los animales de las especies ovina y caprina. *Boletín Oficial del Estado*. N° 256 de 23.10.2009.
- Reglamento (CE) No 1107/96 de 12 de junio 1996 relativo al registro de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen con arreglo al procedimiento establecido en el artículo 17 del Reglamento (CE) No 2081/92. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 148* 21.6.1996.
- Reglamento (CE) No 820/97 de 21 de abril 1997 por el que se establece un sistema de identificación y registro de los animales de la especie bovina y relativo al etiquetado de la carne de vacuno y de los productos a base de carne de vacuno. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 117* 7.5.1997.
- Reglamento (CE) No 1760/2000 de 17 Julio 2000 que establece un sistema de identificación y registro de los animales de la especie bovina y relativo al etiquetado de la carne de vacuno y de los productos a base de carne de vacuno y por el que se deroga el Reglamento (CE) No 820/97. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 204/1* 11.8.2000.
- Reglamento (CE) No 178/2002 de 28 Enero 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 31/1* 1.2.2002.
- Reglamento (CE) No 21/2004 de 17 de diciembre de 2003 por el que se establece un sistema de identificación y registro de los animales de las especies ovina y caprina y se modifica el Reglamento (CE) No 1782/2003 y las Directivas 92/102/CEE y 64/432/CEE. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 5/8* 9.1.2004.

- Reglamento (CE) No 911/2004 de 29 de abril de 2004 por el que se aplica el Reglamento (CE) No 1760/2000 en lo que respecta a las marcas auriculares, los pasaportes y los registros de las explotaciones. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 163/65 30.4.2004.
- Reglamento (CE) No 392/2008 de 30 de abril de 2008 por el que se aprueban modificaciones de carácter menor del pliego de condiciones de una denominación incluida en el registro de denominaciones de origen protegidas y de indicaciones geográficas protegidas [Ternasco de Aragón (IGP)]. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 117/16 1.5.2008.
- Reglamento (CE) No 933/2008 de 23 de septiembre de 2008 por el que se modifica el anexo del Reglamento (CE) No 21/2004 en lo que respecta a los medios de identificación de los animales y al contenido de los documentos de traslado. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 256/5 24.9.2008.
- Reglamento (CE) No 759/2009 de 19 de agosto de 2009 por el que se modifica el anexo del Reglamento (CE) No 21/2004 por el que se establece un sistema de identificación y registro de los animales de las especies ovina y caprina. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 215/3 20.8.2009.
- Rojas-Olivares, M. A., G. Caja, S. Carné, A. A. K. Salama, N. Adell, and P. Puig. 2011a. Retinal image recognition for verifying the identity of fattening and replacement lambs. *J. Anim. Sci.* (submitted R2: 18-12-2010).
- Rojas-Olivares, M. A., G. Caja, S. Carné, A. A. K. Salama, N. Adell, and P. Puig. 2011b. Determining the optimal age for recording the retinal vascular pattern image of lambs. *J. Anim. Sci.* (submitted 01-11-2010).
- Rusk, C. P. 2002. Electronic identification of 4-H Livestock Projects. *Journal of Extension*. 40(6).
- Rusk, C. P., C. R. Blomeke, M. A. Balschweid, S. J. Elliot, and D. Baker. 2006. An evaluation of retinal imaging technology for 4-H beef and sheep identification. *J. Extension* 44. <http://www.joe.org/joe/2006october/a7.shtml> Acceso Noviembre 10, 2010.
- Saa, C., M. J. Milán, G. Caja, and J. J. Ghirardi. 2005. Cost evaluation of the use of conventional and electronic identification and registration systems for the national sheep and goat populations in Spain. *J. Anim. Sci.* 83:1215-1225.

- Sánchez, A. 2002. Trazabilidad genética por DNA. in Seguridad alimentaria de la carne y los productos cárnicos. J. Lizaso, A. Antón (Ed.). Fundisa, Madrid. P. 169-180.
- San Miguel, O., G. Caja, R. Nehring, F. Miranda, J. A. Merino, V. Almansa, and M. J. Lueso. 2005. Results of the IDEA Project on cattle, sheep and goats in Spain. in Performance recording of Farm Animals: State of the Art. M. Guellouz, A. Dimitriadou and C. Mosconi, ed. EAAP Publication No 113. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. pp. 357-359
- Santamarina, C., M. Hernández-Jover, D. Babot, and G. Caja. 2007. Comparison of visual and electronic identification devices in pigs: Slaughterhouse performances. *J. Anim. Sci.* 85:497-502.
- Schwägele, F. 2005. Traceability from a European perspective. *Meat Sci.* 71:164-173.
- Shanahan, C., B. Kernan, G. Ayalew, K. McDonnell, F. Butler, and S. Ward. 2009. A framework for beef traceability from farm to slaughter using global standards: An Irish perspective. *Comp. Elec. Agric.* 66:62-69.
- Standford, K., J. Stitt, J. A. Kellar, and T. A. McAllister. 2001. Traceability in cattle and small ruminants in Canada. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:510-522.
- Sprenger, K. U. 2007. Legislative requirements for the identification and registration of bovine, porcine, ovine and caprine animals within the European Union. *ICAR Tech. Series* 12:47-56
- Wardrope, D. D. 1995. Problems with the use of ear tags in cattle. *Vet. Rec.* 140:675.
- Wilson, D. W., and P. T. Beers. 2001. Global trade requirements and compliance with world trade organization agreements: The role of tracing animals and animal products. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:379-384.
- Whittier, J. C., J. Doubet, D. Henrickson, J. Cobb, J. Shaddock, and B. L. Golden. 2003. Biological considerations pertaining to use of the retinal vascular pattern for permanent identification of livestock. in *Proc. Western Section, Am. Soc. Anim. Sci.* 54. <http://www.asas.org/western03/data/1000936.pdf> Acceso: Noviembre 10, 2010.
- Yordanov, D., and G. Angelova. 2006. Identification and traceability of meat and meat products. *Biotechnol. and Biotechnol.Eq.* 20:2-8.
- Young, R. W. 1978. Visual cells, daily rhythms, and vision research. *Vision Research.* 18:573-578.