



Medida no invasiva del estrés en heces. El test de ACTH.

La medida de la concentración de glucocorticoides está siendo usada cada vez más a menudo en estudios de conservación y ecología como índices del bienestar animal (Sheriff et al., 2011). Los análisis hormonales no invasivos en heces ofrecen múltiples ventajas y están siendo ampliamente usados. Permiten obtener información fácilmente, no es necesario perturbar a los animales, la toma de muestras no es estresante para el animal y por tanto no afecta a la medida, ya que no requiere captura o sujeción (Cook, 2012).

Pero para poder usar este método es necesaria una completa validación en la que se demuestre eficacia y fiabilidad. Los detalles técnicos del método analítico como la preservación de la muestra, su estabilidad, el procedimiento de extracción y el tipo de inmunoensayo utilizados deben ser validados para ambos sexos de cada nueva especie en la que se apliquen (Touma y Palme, 2005; Möstl et al., 2005).

Una parte de la validación consiste en comprobar que la técnica usada puede detectar variaciones de relevancia biológica en el estatus endocrino del animal. Para ello se realiza el test de

estimulación con la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que evidencia la relación entre lo que es medido en la muestra, la actividad adrenocortical y la experiencia de estrés en el animal (Cook, 2012). Este test consiste en la inducción farmacológica (mediante una única inyección intramuscular) de una elevación puntual en los niveles de glucocorticoides en sangre, con la finalidad de comprobar si dicho cambio se ve reflejado en la concentración de metabolitos fecales de glucocorticoides (FGM).

Primero habrá que obtener el valor basal de FGM en cada animal y para ello se recogen heces durante varios días previos a la inyección de ACTH. Tras la inyección también se recogen heces unos días y se comprueba si el método analítico detecta un pico en los FGM, que debería aparecer tras el tiempo de acción de la ACTH más el tiempo de tránsito intestinal. Estudios previos que han usado esta técnica informan de una gran variabilidad en la respuesta individual (Sheriff et al., 2011; Cook, 2012), por lo que para aplicarla correctamente necesitaremos individuos de ambos sexos y que cada individuo actúe como su propio control.

Protocolo del test de ACTH.

-Idealmente es necesario aplicarlo en al menos 2 machos y 2 hembras de cada especie con la que trabajemos.

-Recogida de heces durante 7 días previos a la inyección de ACTH, para establecer el valor basal, y durante 7 días posteriores a la inyección para detectar la evolución de los niveles de FGM. La recogida se realiza cuando se entre a limpiar la instalación, deben ser heces completas y habrá que diferenciar las de los animales que conviven juntos, para lo cual se pueden añadir colorantes en la comida o semillas como arroz, maíz, etc.

-El séptimo día tras comenzar la recogida de heces se procede a la inyección de ACTH (Synacthen®) en dosis única intramuscular de 10-20 UI/kg (0,0125-0,025 ml/kg). Esta será la única manipulación de los animales que requiere la prueba. Numerosos estudios en diversas especies han aplicado este test. En felinos se ha empleado en ocelote (Antunes Dias et

al., 2008), guepardo (Young et al., 2004; Wasser et al., 2000; Ludwig et al., 2013), pantera nebulosa (Young et al., 2004; Wasser et al., 2000; Wielebnowski et al., 2002) y lince canadiense (Fanson et al., 2012).

La inyección se realizará siempre con el método que los responsables del centro recomiendan, ya sea con cerbatana, inmovilización del animal en las jaulas de contención o incluso podría aprovecharse algún tratamiento en los animales que requiera anestesiarlos o retenerlos.

Los animales seleccionados para el test no pueden estar tomando preparados hormonales o corticoides durante el tiempo que dure la prueba. La administración de Synacthen® está contraindicada en caso de úlcera péptica, síndrome de Cushing, infección vírica, administración simultánea de vacunas virales vivas, insuficiencia cardiaca refractaria e insuficiencia adrenal.

En resumen, la única manipulación que se llevaría a cabo con los animales consistiría en una única inyección intramuscular que induciría una elevación puntual de sus niveles de glucocorticoides. El resto de la prueba sería no invasiva y no requiere perturbar a los felinos.

→Para planificar las actuaciones en los distintos centros necesitamos confirmar en el formulario adjunto los ejemplares de cada zoo que podrían usarse para esta prueba y qué método es preferido para la administración de la inyección IM de ACTH.

Referencias

- Antunes Dias, E., Nichi, M. y Guimaraes, M.A.B.V. (2008). Comparison of two commercial kits and two extraction methods for fecal glucocorticoid analysis in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to ACTH challenge. *Pesq. Vet. Bras.* 28(7):329-334.
- Cook, N.J. (2012). Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Can. J. Anim. Sci.* 92:227-259.
- Fanson, K.V., Wielebnowski, N.C., Shenk, T.M. y Lucas, J.R. (2012). Comparative patterns of adrenal activity in captive and wild Canada lynx (*Lynx canadensis*). *J. Comp. Physiol. B.* 182:157-165.
- Ludwig, C., Wachter, B., Silinski-Mehr, S., Ganswindt, A., Berstchinger, H., Hofer, H. y Dehnhard, M. (2013). Characterisation and validation of an enzyme-immunoassay for the non-invasive assessment of faecal glucocorticoid metabolites in cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 180:15-23.
- Möstl, E., Rettenbacher, S. y Palme, R. (2005). Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046:17-34.
- Sheriff, M.J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R. y Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*. 166:869-887.
- Touma, C. y Palme, R. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1046:54-74.
- Wasser, S.K., Hunt, K.E., Brown, J.L., Cooper, K., Crockett, C.M., Bechert, U., Millspaugh, J.J., Larson, S. y Monfort, S.L. (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120:260-275.
- Wielebnowski, N.C., Fitchall, N., Carlstead, K., Busso, J.M. y Brown, J.L. (2002). Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American Clouded Leopard population. *Zoo Biol.* 21:77-98.
- Young, K.M., Walker, S.L., Lanthier, C., Waddell, W.T., Monfort, S.L. y Brown, J.L. (2004). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137:148-165.