

Efecto del orden de toma de muestras sobre el nivel de cortisol en saliva de cerdos alojados en grupo

Alba Peláez¹, Aranzazu Mateos², Emilio Gómez³, Eduardo de Mercado³, Ismael Ovejero².

¹ Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid. España. albapela@ucm.es.

² Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Avda. Puerta de Hierro, 2-4. 28040 Madrid. España. a.mateos@upm.es; ismael.ovejero.rubio@upm.es.

³ Centro de Pruebas de Porcino. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Ctra. Riaza-Toro, s/n. 40353 Hontalbilla, Segovia. España. gomizqem@itacyl.es; ita-merpened@itacyl.es.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar, en la fase final del cebo de animales habituados al contacto con las personas, la influencia del orden de toma de muestra de saliva de cerdos alojados en grupo y la de la toma reiterada de muestras a un animal concreto, también alojado en grupo, sobre el nivel de cortisol en saliva de cerdos de cebo. Para ello, por una parte, se tomaron por la mañana y por la tarde muestras de saliva a 144 cerdos de 100 kg de peso vivo, 72 machos enteros y 72 hembras, alojados en boxes (seis cerdos/box; 1,2 m²/cerdo), controlando el orden de toma de las mismas (primera a sexta) dentro de cada box; por otra parte, por la mañana, se tomaron muestras de saliva a 24 cerdos de 100 kg de peso vivo, machos enteros y hembras, alojados en cuatro boxes (seis cerdos/box; 1,2 m²/cerdo), en el minuto 0, en el minuto 10 y en el minuto 30, siempre en el mismo orden.

La concentración de cortisol en saliva no se vio afectada por el orden de toma de las muestras dentro de cada corral por la mañana ($p = 0,7089$) ni por la tarde ($p = 0,2292$). Por otra parte, no hubo diferencias significativas entre los niveles de cortisol en saliva en los minutos 0 y 10 ($p = 0,4856$), ni entre los niveles en los minutos 0 y 30 ($p = 0,3838$) ni entre los de los minutos 10 y 30 ($p = 0,1447$). En las condiciones de nuestro trabajo, ni el orden de toma de muestra de saliva de cerdos alojados en grupo ni la toma reiterada de muestras a un animal concreto, también alojado en grupo, influyeron sobre el nivel de cortisol en saliva de cerdos de cebo. Estos resultados apoyan la idea de que la toma de muestras de saliva no resulta estresante para los cerdos.

Palabras clave: bienestar, cortisol, cebo, porcino.

Effect of sampling order on the salivary cortisol level of group-housed pigs

Abstract

The aim of this work were to study, in the final stage of fattening of animals accustomed to contact with people, the influence of the saliva sampling order of group-housed pigs and that of the multiple saliva sampling to a particular animal, also group-housed, on the level of cortisol in saliva of fattening pigs. For this, on the one hand, samples of saliva were taken in the morning and in the afternoon to 144 pigs weighing 100 kg, 72 entire males and 72 females, housed in single sex pens (six pigs/pen, 1.2 m²/pig), controlling the sampling order (first to sixth) within each pen; on the other hand, in the morning, saliva samples were collected from 24 pigs weighing 100 kg, entire males and females, housed in four single-sex pens (six pigs/pen; 1.2 m²/pig), in three different moments, in the same order at all times: minute 0, minute 10 and minute 30.

The concentration of salivary cortisol was not affected by the sampling order in each pen, both in the morning ($p = 0.7089$) and in the afternoon ($p = 0.2292$). On the other hand, there were no significant differences between cortisol levels in saliva at minutes 0 and 10 ($p = 0.4856$) nor between levels at minutes 0 and 30 ($p = 0.3838$) or between levels at minutes 10 and 30 ($p = 0.1447$). In the conditions of our study, neither the order of sampling of saliva to group-housed pigs nor multiple saliva sampling to a particular animal, also housed in a group, influenced the level of salivary cortisol of fattening pigs. These results support the idea that saliva collection is not stressful for pigs.

Keywords: welfare, cortisol, fattening period, pig.

1. Introducción

Una de las principales respuestas fisiológicas de los cerdos a las situaciones estresantes es el incremento de la concentración de cortisol en sangre por el aumento de la actividad corticoadrenal. Como la toma de muestras de sangre es en sí misma estresante para los animales (Nyberg et al., 1988) y, por otro lado, los niveles de cortisol en la saliva y en el plasma sanguíneo están bien correlacionados (Cook et al., 1996), cada vez es más utilizada la determinación del cortisol en saliva para la investigación de la respuesta al estrés de los cerdos. Cook et al. (1996) indican, incluso, que el cortisol en saliva, que refleja la fracción libre (la activa biológicamente) del cortisol sanguíneo, puede ser un mejor indicador de estrés que el cortisol total en sangre.

Sin embargo, aunque se considera que la toma de muestras de saliva es un método no invasivo y, por ello, no estresante para los animales, existe cierta controversia sobre si la toma reiterada de muestras a un animal concreto puede influir sobre sus niveles de cortisol o si, cuando los cerdos están alojados en grupo, la recolección de saliva de uno de ellos puede alterar el estatus hormonal de sus compañeros de modo que las mediciones de cortisol de estos últimos se vean afectadas (Hayne et al., 2009; Cook et al., 2013).

Por ello, los objetivos de este trabajo han sido estudiar, en la fase final del cebo de animales habituados al contacto con las personas, la influencia del orden de toma de muestra de saliva de cerdos alojados en grupo y la de la toma reiterada de muestras a un animal concreto, también alojado en grupo, sobre el nivel de cortisol en saliva de cerdos de cebo.

2. Materiales y Métodos

2.1. Instalaciones

Este trabajo ha sido desarrollado en el Laboratorio de Bienestar Porcino (LBP) de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid. El LBP cuenta con un pasillo general de acceso y 4 salas totalmente independientes. Cada sala se compone de seis corrales o boxes con el suelo parcialmente enrejillado (60% de suelo continuo y 40% de suelo enrejillado). Dos de las salas tienen el suelo continuo de hormigón y enrejillado de hormigón (barra 8 cm, abertura 2 cm) y las otras dos, el suelo continuo cubierto de resina epoxídica y enrejillado metálico (barra 1 cm, abertura 1 cm). En cada sala, los corrales se numeran desde la puerta (corral 1) hacia el final de la sala (corral 6) (Figura 1).

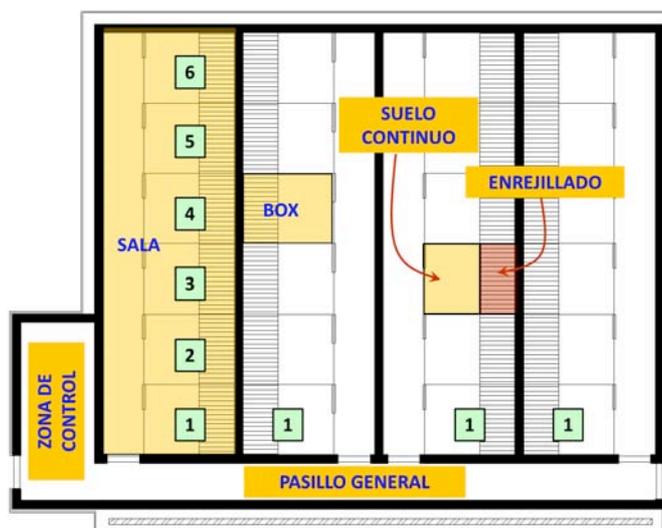


Figura 1. Esquema del alojamiento para cerdos de cebo del Laboratorio de Bienestar Porcino.

2.2. Animales y dietas

En el Laboratorio de Bienestar Porcino (LBP) se alojaron 144 cerdos (72 machos enteros y 72 hembras) de un cruce Piétrain x (Large White x Landrace) con un peso vivo medio inicial de 19,2 kg. En cada sala, los animales fueron distribuidos por sexos (3 corrales de machos y 3 de hembras), a razón de 6 cerdos/box (1,2 m²/cerdo).

La toma de muestras de saliva para este trabajo se realizó cuando los animales tenían 5,0 meses de edad y un peso vivo medio de 100,8 ± 8,2 kg. Previamente, a lo largo del cebo, se les tomó muestras de saliva a los 2,5 y 3,6 meses de edad.

Todos los animales fueron alimentados *ad libitum* con piensos comerciales y tuvieron acceso libre al agua en todo momento.

La rutina diaria de manejo fue la misma para todos los corrales durante el cebo: los trabajos diarios en el interior del alojamiento y, en muchas ocasiones, en el interior de los corrales permitieron que los animales estuvieran habituados a la presencia de personas.

La temperatura media diaria durante el cebo fue de 24,9 ± 1,3 °C. La temperatura media del día de toma de muestras fue de 25,2 °C.

2.3. Toma de muestras y análisis de laboratorio

Para el estudio relativo al orden de toma de muestra de saliva de cerdos alojados en grupo, por la mañana (10.30-12.00 h) y por la tarde (16.30-18.00 h) del día de muestreo se tomaron muestras de saliva de los animales de cada sala, empezando con el corral 1 y terminando con el 6; dentro de cada corral, se anotó el orden de toma de la muestra de cada cerdo (1 a 6).

Para el estudio correspondiente a la toma reiterada de muestras a un animal concreto, también alojado en grupo, con los cerdos de los corrales 1 de cada sala se siguió el procedimiento siguiente: además de la toma de muestras indicada por la mañana (minuto 0, M0), se hicieron otros dos muestreos tras 10 y 30 minutos (M10 y M30, respectivamente), manteniendo, en cada toma de saliva, el orden de toma de muestras de los animales de esos corrales.

En general, el muestreo se efectuó desde el pasillo de cada corral, pero en algunas ocasiones fue precisó entrar a los corrales (Figura 2). Para la obtención de las muestras de saliva, se utilizaron torundas de algodón. Cada torunda fue exclusiva para cada animal. Se les dejó chuparlas y masticarlas durante unos 20 segundos y, una vez extraídas de las bocas de los cerdos, se introdujeron en viales con doble fondo perforado (Salivette[®]cortisol, SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania) y se centrifugaron en una centrífuga portátil (5 min; 2500 rpm; EBA20 Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemania), para capturar la saliva en el fondo del vial (Figura 3).

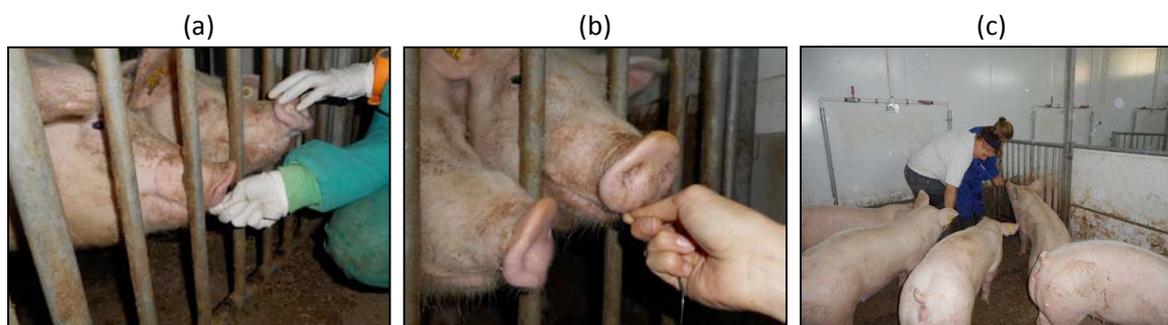


Figura 2. Toma de muestras de saliva desde los pasillos de las salas (a,b) o desde el interior de los corrales (c).

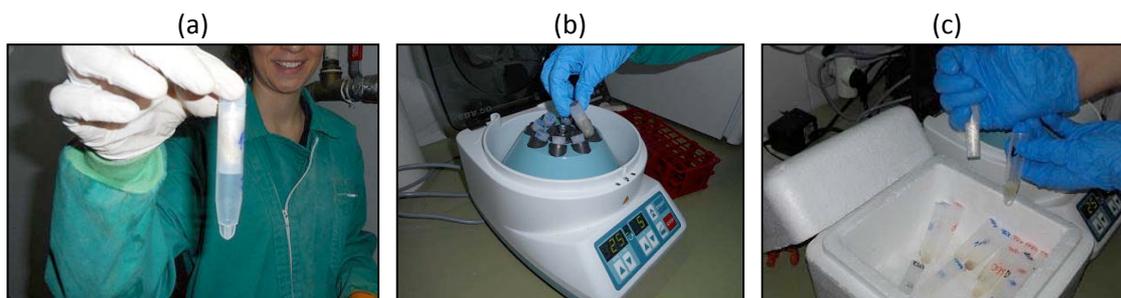


Figura 3. Toma de muestras de saliva: a) algodón recién impregnado de saliva en el vial; b) centrifugado de los viales; c) muestras tras el centrifugado e introducidas en el hielo seco.

Las muestras así obtenidas se congelaron inmediatamente en hielo seco y, posteriormente, se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis, que se llevó a cabo en el laboratorio del Centro de Pruebas de Porcino del ITACyL (Hontalbilla, Segovia). Para el análisis del cortisol se utilizó un Kit ELISA de competición (Cortisol free in Saliva ELISA[®] DES6611, DEMEDITEC Diagnostics GmbH, Kiel-Wellsee, Alemania). La lectura de la absorbancia de los pocillos de las placas se llevó a cabo con un espectrofotómetro (Bio Tek ELx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, Estados Unidos) a 450 nm (Figura 4).

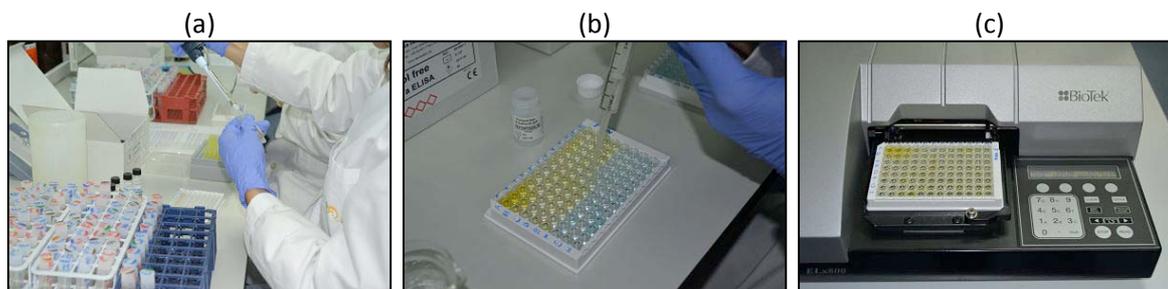


Figura 4. Análisis de cortisol en el laboratorio: a) extracción de la muestra del vial; b) preparación de la placa ELISA; c) lectura de la misma en el espectrofotómetro.

2.4. Análisis estadísticos

El ensayo correspondiente al orden de toma de muestra de saliva de cerdos alojados en grupo fue diseñado como un experimento factorial en bloques al azar (bloque 1, suelo continuo de hormigón y enrejillado de hormigón; bloque 2, suelo continuo cubierto de resina epoxídica y enrejillado metálico). Los datos de concentración de cortisol en saliva de las muestras tomadas mañana y tarde se sometieron a análisis de varianza según el modelo que incluía el 'sexo' y el 'orden de toma de muestra de saliva' como factores fijos, utilizando el procedimiento GLM del programa SAS (SAS Institute, 2002).

En cuanto al ensayo correspondiente a la toma reiterada de muestras a un animal concreto, se realizaron tres pruebas *t* de medidas apareadas: una, con las concentraciones de cortisol en saliva de los muestreos M0 y M10; otra, con las de los muestreos M0 y M30, y la tercera, con las de los muestreos M10 y M30, utilizando el procedimiento UNIVARIATE del programa SAS (SAS Institute, 2002).

3. Resultados y Discusión

En esta comunicación se presentan los resultados correspondientes al factor 'orden de toma de muestra de saliva'. La interacción 'sexo' x 'orden de toma de muestra de saliva' no resultó significativa para la concentración de cortisol en saliva por la mañana ni para la de por la tarde.

En la Tablas 1 y 2, aparecen las medias de las concentraciones de cortisol en saliva por la mañana y por la tarde, respectivamente, correspondientes al ensayo relativo al orden de toma de muestra de saliva de cerdos alojados en grupo.

Tanto por la mañana como por la tarde, el orden de muestreo dentro de cada corral no tuvo efecto significativo sobre la concentración de cortisol en saliva de los animales. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cook et al., (2013), quienes trabajaron con machos castrados y hembras alojados en corrales de cinco animales/corral. Por otra parte, si nos fijamos en las medias aunque no haya diferencias significativas entre ellas, observamos que, por la mañana, partiendo de la posición 1, al aumentar el orden de toma de muestra disminuye el cortisol en saliva hasta la posición 3, aumenta en la 4, disminuye en la 5 y aumenta de nuevo en la posición 6; por la tarde, al aumentar el orden de toma de muestra disminuye la concentración de cortisol salival, salvo para la posición 4. No parece, pues, que haya un patrón bien definido para relacionar la posición que ocupa un cerdo en el orden de muestreo dentro de su corral con su concentración de cortisol en saliva, pero sí parece claro que el acto de obtener una muestra de saliva de un animal alojado en grupo no afecta al estatus corticoadrenal de sus compañeros de corral, puesto que no provoca un aumento del cortisol salival de estos últimos.

Tabla 1. Efecto del orden de toma de muestra de saliva a los cerdos, dentro de cada corral, sobre la concentración de cortisol en saliva (medias) por la mañana.

Orden de toma de muestra	N ¹	Cortisol en saliva (ng·mL ⁻¹)
1	21	8,74
2	23	8,21
3	24	7,98
4	23	8,44
5	23	8,22
6	22	8,88
EEM		0,455
<i>p</i>		0,7089

¹N: número de observaciones: si son menos de 24, es consecuencia del rechazo de algunos cerdos.

Tabla 2. Efecto del orden de toma de muestra de saliva a los cerdos, dentro de cada corral, sobre la concentración de cortisol en saliva (medias) por la tarde.

Orden de toma de muestra	N ¹	Cortisol en saliva (ng·mL ⁻¹)
1	23	9,50
2	23	9,33
3	23	8,95
4	22	9,33
5	22	8,38
6	23	7,95
EEM		0,540
<i>p</i>		0,2292

¹N: número de observaciones: son menos de 24 como consecuencia del rechazo de algunos cerdos.

En la Tabla 3, se indican los resultados de las pruebas *t* de medidas apareadas correspondientes al ensayo relativo a la toma reiterada de muestras a un animal concreto.

Tabla 3. Resultados de las pruebas *t* de medidas apareadas realizadas con las concentraciones de cortisol en saliva de los muestreos en los minutos 0 y 10 (M0 vs M10), con las de los muestreos en los minutos 0 y 30 (M0 vs M30) y con las de los muestreos en los minutos 10 y 30 (M10 vs M30).

Prueba <i>t</i>	N ¹	<i>p</i> ²
M0 vs M10	23	0,4856
M0 vs M30	23	0,3838
M10 vs M30	23	0,1447

¹N: número de observaciones: son 23 por el rechazo de un cerdo.

²*p*: probabilidad (prueba *t*).

No hubo diferencias significativas entre los niveles de cortisol en saliva de cada cerdo en el minuto 0 y en el minuto 10; tampoco entre los correspondientes al minuto 0 y el minuto 30, ni entre los del minuto 10 y los del minuto 30. Las medias de las concentraciones de cortisol en saliva fueron $8,23 \pm 1,54$ ng·mL⁻¹ para el muestreo M0; $7,87 \pm 2,09$ ng·mL⁻¹ para el muestreo M10, y $8,62 \pm 2,08$ ng·mL⁻¹ para el muestreo M30. De modo similar a lo apuntado para el orden de toma de muestra a los cerdos dentro de un corral, no se aprecia un patrón de respuesta que permita señalar que la toma reiterada de muestras de saliva a un animal concreto sea estresante para dicho animal. Nuestros resultados van en la misma línea que los obtenidos por Cook et al., (2013), quienes hicieron muestreos cada 30 minutos a lo largo de tres horas.

4. Conclusiones

En cerdos de cebo alojados en grupo y habituados al contacto con las personas, la toma de muestra de saliva a un animal no resulta estresante para sus compañeros de corral; asimismo, la toma reiterada de muestras de saliva a un animal concreto no es estresante para dicho animal. Esto apoya la idea de que la toma de muestras de saliva no es una causa de estrés para los cerdos.

Agradecimientos

Este estudio ha sido posible gracias al proyecto INIA con código RTA2013-00090-C02-02.

Bibliografía

- Cook, N.J., Schaefer, A.L., Lepage, P. and Morgan Jones, S. 1996. Salivary vs serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Canadian Journal of Animal Science* 76: 329-335.
- Cook, N. J., Hayne, S. M., Rioja-Lang, F. C., Schaefer, A. L. and Gonyou, H. W, 2013. The collection of multiple saliva samples from pigs and the effect on adrenocortical activity. *Canadian Journal of Animal Science* 93: 329-333.
- Hayne, S.M, Cook, N.J. and Gonyou, H.W. 2009. Validation of saliva sampling techniques in swine in order to assess stress responses. *Advances in Pork Production* 20, Abstract #19.
- Nyberg, L., Lundstrom, K., Edfors-Lilja, I. and Rundren, M. 1988. Effects of transport stress on concentrations of cortisol, corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid receptors in pigs with different halothane genotypes. *Journal of Animal Science* 66: 1201-1211.
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT® User's Guide, version 9. SAS Institute Inc. Cary, NC.