

Laboratory Animals

THE INTERNATIONAL JOURNAL OF
LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND WELFARE

Recolección experimental de orina en animales: Revisión

Biji T. Kurien¹, Nancy E. Everds² & R. Hal Scofield^{1,3,4}

¹Arthritis and Immunology Program, Oklahoma Medical Research Foundation, ³Department Of Medicine, University of Oklahoma Health Sciences Center, ⁴Department of Veterans Affairs Medical Center, Oklahoma City, Oklahoma, OK 73104 y ²Haskell Laboratory for Health and Environmental Sciences, Newark, DE 19714-0050, EE.UU.

Este artículo ha sido traducido por: D^a Clara Martínez Nistal

Revisado por: Dr. José Luís Martín Barrasa

Coordinador: D. Jesús Martínez Palacio

Editado por:



Publicación patrocinada por:



Nuestro agradecimiento al Consejo de Dirección de *Laboratory Animals Ltd.* por el patrocinio y colaboración en esta traducción.

Recolección experimental de orina en animales: Revisión

Biji T. Kurien¹, Nancy E. Everds² & R. Hal Scofield^{1,3,4}

¹Arthritis and Immunology Program, Oklahoma Medical Research Foundation, ³Department of Medicine, University of Oklahoma Health Sciences Center, ⁴Department of Veterans Affairs Medical Center, Oklahoma City, Oklahoma, OK 73104 y ²Haskell Laboratory for Health and Environmental Sciences, Newark, DE 19714-0050, EE.UU.

Dirección para correspondencia: Biji T. Kurien, OMRF, MS # 24, 825 NE 13th Street, Oklahoma City, OK 73104, EE.UU.

Correo electrónico: biji-kurien@omrf.ouhsc.edu

Resumen

La recolección de orina representa una parte esencial tanto de la práctica veterinaria, para comprobar la salud de los animales, como de las investigaciones científicas, para evaluar los resultados de procedimientos experimentales. La recolección de orina no contaminada en animales representa un reto, en especial con los roedores pequeños, y resulta una tarea prácticamente imposible bajo condiciones de microgravedad. Los aspectos fundamentales de la recolección de orina son: (1) facilidad de recolección, (2) calidad de la muestra, (3) prevención de la contaminación, (4) rigor de los procedimientos empleados, (5) grado de dolor causado al animal, y (6) mejora de los métodos para reducir el estrés, el dolor y el sufrimiento. Este estudio se centra en la recolección de orina con fines cualitativos y cuantitativos en roedores, conejos, felinos, canes, especies aviarias, equinos, porcinos, ungulados y algunos primates no humanos, teniendo en mente el bienestar animal. Se ha prestado especial atención a los roedores, canes y primates no humanos, ya que son los animales preferidos para la investigación. Se han estudiado la micción voluntaria, métodos con escasa intervención, métodos quirúrgicos, limitaciones modificadas, y métodos y jaulas para requerimientos especiales. Es necesario esforzarse en criar a los animales de forma adecuada y en un entorno lo más natural posible, ya que los resultados experimentales que se obtengan dependerán, en gran medida, de su bienestar. La forma más eficiente de proceder consistirá en una continua mejora de los procedimientos de recolección de orina para obtener muestras puras que lleven a datos de investigación fiables.

Palabras clave Orina animal; roedores; no roedores; jaulas metabólicas; bienestar animal

La recolección de orina de animales de experimentación es un requerimiento básico dentro de los estudios bioquímicos, nutricionales, urológicos, metabólicos, toxicológicos, fisiológicos y de comportamiento general. Las características esenciales de la recolección experimental de orina son: (1) obtención de orina pura sin contaminación por heces o alimento, (2) recolección de orina sin ninguna intervención directa, (3) facilidad y comodidad de la recolección, (4) eficiencia de la recolección y (5) rapidez en la

recolección (para recolecciones simples de una muestra de orina puntual).

La orina animal se recoge tanto para usos en análisis cualitativos (normalmente con un fin clínico veterinario) como cuantitativos (en su mayoría con un fin científico-experimental). De entre los test de laboratorio de los que disponen los veterinarios, el análisis de orina es uno de los que más información aporta y que se realiza con mayor normalidad. La orina recogida con fines veterinarios es útil para evaluar la salud general y el estatus fisiológico de un animal, y ayuda a hacer un diagnóstico adecuado. Una pequeña cantidad de orina bastará para un análisis cualitativo, que abarca la medición del pH urinario, ni-

veles de proteínas, glucosa, bilirrubina, hemoglobina, cetona, urobilinógenos y nivel de creatinina. Los análisis de excreción cuantitativa con fines científicos requieren la recogida de muestras de orina en diferentes intervalos de tiempo (por ejemplo muestras de 24h) y resultan útiles para evaluar el resultado de cualquier manipulación experimental a la que haya sido sometido el animal, cuando la recogida de orina se ha estandarizado con respecto al tiempo/consumo de agua y todos los demás aspectos del proceso. Esto se hace generalmente con los siguientes fines: (a) investigación de la función renal, (b) estudio de enfermedades renales, (c) evaluación de anomalías metabólicas y/o endocrinológicas, (d) evaluación de requerimientos nutricionales y metabólicos, y (e) evaluación de la excreción de un xenobiótico y sus metabolitos.

Hemos realizado este estudio con la intención de proporcionar una amplia información sobre los procedimientos generales de los que se dispone para recolectar la orina de varias especies animales y evaluar de forma crítica el mejor método para cada especie. Las características principales de la recolección de orina experimental son: (a) obtención de orina pura sin contaminación de heces o alimento, (b) recolección de orina sin ningún tipo de coacción, y (c) facilidad y comodidad. Este estudio se referirá a la recolección de orina utilizando los siguientes criterios de acción: (1) facilidad de la recogida, (2) grado de invasividad o severidad de los procedimientos utilizados, (3) calidad de la muestra, (4) prevención contra la contaminación, y (5) diferentes grados de dolor o sufrimiento provocados al animal. La mejora se ha definido como la reducción al mínimo del sufrimiento animal durante un experimento, y también como el aumento del bienestar animal a través de procedimientos de cría y manipulación mejorados (Morton 2002).

Muchos de los métodos aquí analizados podrían recogerse bajo la categoría de fines “veterinarios”, y se han subdividido en recolección de orina sin intervención/con intervención moderada (para estos métodos se han empleado de forma indistinta los términos “muestra libre”, “micción voluntaria” y “micción”). Sin embargo, se han incluido varios métodos que emplean jaulas metabólicas u otros equipos especializados

para recoger orina durante periodos establecidos (como periodos de 24h), a partir de los que se pueden obtener datos científicos para monitorizar intervenciones específicas.

Este estudio hará referencia a la recolección de orina con fines cualitativos y cuantitativos en roedores (Tabla 1), conejos, felinos, canes, especies aviarias, equinos, porcinos, ungulados y algunos primates no humanos (Tabla 2), teniendo presente el bienestar animal.

Recolección de orina en roedores

Ratones y ratas son dos de las especies de mamíferos que más se utilizan en la evaluación de toxicidad crónica y aguda, metabólica, biodisponibilidad y metabolismo en la evaluación preclínica de fármacos. Se ha probado su utilidad en base a su linaje genético definido, bajo coste, vida relativamente corta y mínimo espacio requerido para su alojamiento. Los ratones representan la mayoría de todos los mamíferos de entre todos los animales utilizados para la investigación, docencia y ensayos. Los ratones son fáciles de manipular, baratos de mantener, genéticamente similares a los humanos, con una corta vida y altos índices reproductivos, por lo que se han convertido en el modelo experimental más frecuentemente elegido en investigación. Otro uso primario de los ratones es el de la producción de reactivos biológicos, tales como los anticuerpos monoclonales y vacunas. Los ratones y ratas se utilizan para probar la seguridad de nuevos procedimientos y fármacos, tal y como exigen una serie de regulaciones federales. La siguiente descripción incluye algunos de los métodos que se utilizan para recolectar orina de ratones, ratas y otros roedores (Tabla 1).

Recolección de orina sin intervención (ratón) *Recolección de orina de ratón utilizando film de plástico transparente*

Kurien y Scofield (1999) describieron dos métodos diferentes para la recolección de orina para análisis cualitativo. El método del único animal (Fig. 1) consiste en permitir que un único ratón orine en film transparente Glad®, dispuesto sobre hojas de papel blanco, fuera de la jaula del animal. El método de múltiples animales (Fig. 2) consiste en la separación de siete ratones en siete

Tabla 1 Resumen de los métodos publicados en la literatura para la recolección de orina de roedores, que muestra las especies utilizadas, los costes, el volumen de orina obtenida, el tiempo empleado y los criterios utilizados

Método	Especie	Coste	Intervención	Tiempo de la recolección		Volumen	Criterio 1: Calidad		Criterio 2: Dolor/incomodidad	Criterio 3: Facilidad de la recolección	
Micción (Watts 1971)	Ratón	?	+	*		30-100µl	X		?		F
Vaso de poliestireno (Khosho <i>et al.</i> 1985)	Rata	?	+	*, **		ND	XX		?		MD
Plástico transparente (Kurien & Scofield 1999)	Ratón	?	-	*		10-250µl	X		?		F
Tubo capilar (Hayashi & Sakaguchi 1975)	Ratón	?	+	**		ND	X		?		MD
Quirúrgico (White 1971)	Rata	?	+++	**		6-10cc/h	X		??		D
Embudo de polietileno (Perline 1973)	Ratón	?	+	**		ND	X		?		MD
Embudo de aluminio (Jones <i>et al.</i> 1973)	Ratón	?	+	**		ND	X		?		MD
Tubo de propileno (Smith <i>et al.</i> 1981)	Ratón	?	+	24 horas		0,2-2ml	X		?		MD
Cubeta de cristal (West <i>et al.</i> 1978)	Ratón	?	+	**		ND	X		?		MD
Papel de aluminio (Black & Claxton 1979)	Ratón	?	+	4 horas		1ml	X		?		MD
Aparato de recolección de orina (Jackson & Sutherland 1984)	Rata	?	+	48 horas		0-7ml	X		?		MD
Tubo de plexiglas (Toon & Rowland 1981)	Rata	?	+	**		ND	X		?		D
Recolección a baja temperatura (Denekla 1966, 1969)	Rata	?	+	16 horas		1,2-1,4ml	X		?		D
Recolección a baja temperatura (Lartigue 1978)	Rata	??	+	24 horas		Hasta 10ml	X		?		D

ND = no determinado o no reflejado en el manuscrito; - = ninguna; + = mínima; ++ = moderada; +++ = considerable; ? = bajo; ? = medio; ?? = alto; * = rápido; ** = lento; X = bueno; XX = aceptable; F = fácil; MD = moderadamente difícil; D = difícil

compartimentos provisionales (dos estructuras en forma de X fabricadas con cartón) situados sobre el film transparente y permitiéndoles orinar. La orina excretada era, en cada caso, aspirada en tubos para microcentrifugación utilizando una pipeta por desplazamiento de aire regulable. Se pudo obtener orina pura en un tiempo mínimo de 12s, sin ningún tipo de coacción. Se obtuvieron



Fig. 1 Método de recolección de orina de un único animal utilizando film plástico transparente.

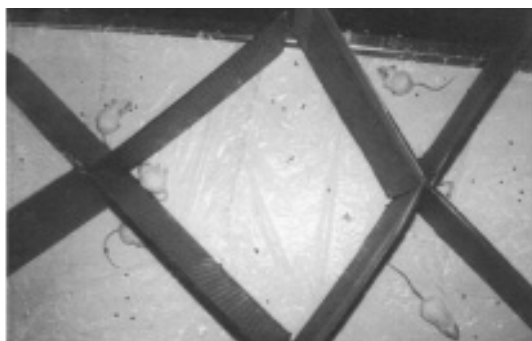


Fig. 2 Método de recolección de orina de varios animales utilizando film plástico transparente.

volúmenes de 10-250µl. Para hacer la estructura en forma de X se emplearon dos piezas rectangulares de cartón, cada una de aproximadamente 61 cm. de largo y 22,9 cm. de ancho. Se hizo un corte de 5,1 cm. en la mitad superior de una de las piezas y un corte de 17,8 cm. en la mitad inferior de la otra pieza de cartón. Ambas piezas de cartón estaban unidas una a la otra por la mitad en los cortes, de forma que encajaban cómodamente y daban la apariencia de una estructura en forma de X. Dos estructuras en forma de X daban una estructura en forma de XX (Fig. 2). Los animales fueron ubicados en estos compartimentos, de donde fueron retirados tan pronto como hubieron orinado, aspirándose la orina (Fig. 2)

Recolección de orina con intervención moderada (ratón y rata)

Micción de ratón o rata sobre una placa de Petri

Para llevar a cabo este procedimiento, hay que sostener al ratón o rata sobre una placa de Petri o un recipiente desechable de plástico e inducirle a miccionar (Watts 1971). Pueden obtenerse muestras limpias y recientes para el análisis del tracto urinario al completo haciendo presión sobre la vejiga de forma manual en un recipiente o en la superficie de una mesa aplicando una leve presión transabdominal sobre la vejiga para superar la presión normal de la uretra. La micción de un ratón demostró producir aproximadamente de 30 a 100µl de orina, que se recogió en una placa de Petri desechable de plástico, y se conservó en una cámara húmeda para reducir la evaporación. Las placas de Petri o depósitos son impermeables, por lo que la orina recogida en ellas puede verse en un tubo de ensayo y taparse de forma inmediata. Por lo general, la recolección espontánea de orina se lleva a cabo de forma más satisfactoria inmediatamente después de entrar en la habitación en la que se encuentran los animales.

Recolección puntual de una muestra de orina utilizando un vaso de precipitados (rata)

En ocasiones es importante recoger orina de un gran número de animales para análisis cualitativos, por ejemplo para detectar la presencia o au-

sencia de glucosuria. Para tal fin resulta tedioso y caro el uso de jaulas metabólicas, por lo que se concibió un método para recoger muestras de orina puntuales en ratas (Khosho *et al.* 1985) que resultaba simple, fiable y eficiente.

Un vaso de precipitados de poliestireno de 5 ml (diSPo Beaker Polystyrene, American Scientific Products, McGaw Park, Illinois, EE.UU.) se unía a la pared perineal utilizando cinta adhesiva por las dos caras (Fig. 3). Esto permitía que el vaso pudiera pegarse y despegarse con facilidad. Tras adherirse el vaso, se sostenía a la rata por la cola y se estimulaba de forma táctil la espalda del animal utilizando los dedos de la otra mano. Se descubrió que el 80% de los animales excretaban entre 0,1 y 0,8 ml. de orina en unos segundos, mientras que al 20% restante le llevaba unos 5-10 minutos. Se estimó necesario afeitar y lavar la zona periuretral en el caso de que fuera esencial la recolección de orina limpia, libre de impurezas. Se descubrió que sostener el vaso manualmente era más rápido que adherirlo con cinta, pero este procedimiento se encontró susceptible al derramamiento de orina y a su contaminación con heces.

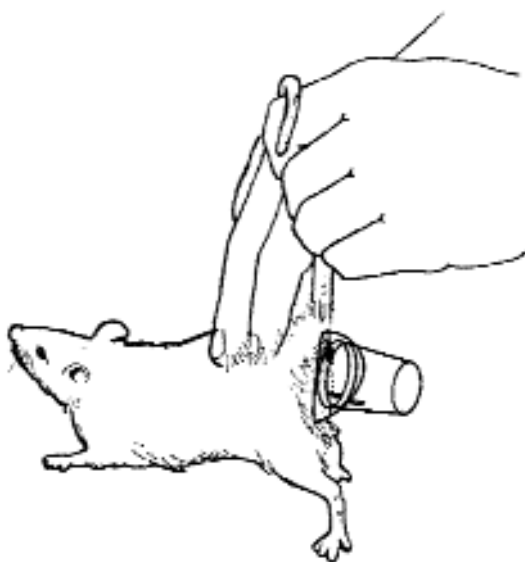


Fig. 3 Ilustración de un método para recoger orina de rata. Se presiona la espalda del animal y la orina se recoge en un vaso de precipitados de poliestireno.

Método de recolección de orina por tubo capilar (ratas)

Hayashi y Sakaguchi (1975) demostraron que podían utilizarse tubos capilares para recoger orina de ratas Sprague-Dawley macho. La rata se sujetaba con una mano y se presionaba con el pulgar y el tercer dedo de la otra mano la parte baja del abdomen, en torno a la vejiga, para provocar la excreción urinaria. La orina excretada era recogida de forma directa e inmediata en dos tubos capilares sujetos entre el índice y el dedo corazón. El método se encontró adecuado para análisis de orina rutinarios en ratones y ratas. Sin embargo, no era directamente posible estimar el volumen de orina recogida mediante este procedimiento.

Contención modificada utilizada para la recolección de orina de 24 horas

Método del embudo de polietileno

Perline (1971) diseñó un dispositivo muy económico (Fig. 4) para recoger orina de ratón utilizando un embudo de polietileno (22,5 cm. de diámetro). Se insertó un tamiz de nylon cóncavo en el embudo (14 mesh cortado con un diámetro de 12,5 cm.), y se colocó un tamiz de acero inoxidable sobre los bordes del tamiz de nylon que quedaron hacia arriba (4 mesh/2,5 cm. cortado con un diámetro de 11,25 cm.). Ambos tamices se sujetaron al embudo haciendo seis pares de agujeros alrededor de su perímetro y asegurándolos con alambre. Por último se recortó el sobrante de tamiz de nylon. Después de colocar un ratón en el embudo, se puso una tapa de plástico

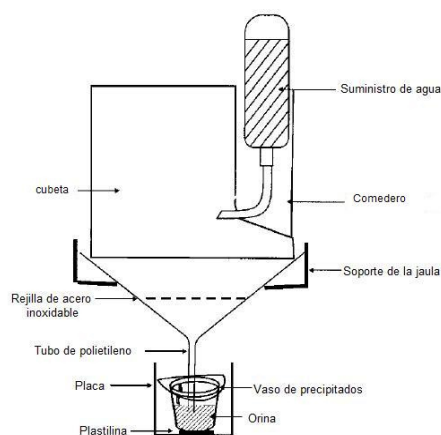


Fig. 4 Sistema sencillo y económico para la recolección de orina de ratón

Tabla 2 Resumen de los métodos publicados en la literatura para la recolección de orina de no roedores, que muestra las especies utilizadas, los costes, el volumen de orina obtenida, el tiempo empleado y los criterios utilizados

Método	Especie	Coste	Riesgo de contaminación	Tiempo de la recolección	Volumen	Criterio 1: Calidad	Criterio 2: Dolor/incomodidad	Criterio 3: Facilidad de la recolección
Micción libre (Garvey & Aalseth 1971)	Conejo	?	-	*	Hasta 5 ml	X	?	MD
Cistocentesis (Kruger <i>et al.</i> 1996)	Gato	?	-	*	ND	X	??	D
Jaula (Matandos & Franz 1980)	Gato	?	-	24 horas	ND	XX	?	MD
Cistocentesis (Morrisey & Ramer 1999)	Hurón	?	-	*	ND	X	??	MD
Quirúrgico (Colvin 1966)	Gallo joven	?	-	**	ND	X	??	D
Quirúrgico (Milroy 1903)	Pollo	?	-	24 horas	500-1500 ml	X	??	D
Establo metabólico (Aschbacher 1970)	vaca, oveja, cerdo	?	++	ND	ND	X	?	MD
Pañal (López-Anaya <i>et al.</i> 1990)	Cría de macaco	?	-	ND	ND	XX	?	MD
Aparato para la recolección de orina (Van der Berg 1996)	Caballo	?	-	ND	ND	XX	?	MD
Micción libre (Van Metre & Angelos 1999)	Cerdo vietnamita	?	-	ND	ND	X	?	MD

ND = no descrito; - = ninguna; + = mínima; ++ = moderada; +++ = considerable; ? = bajo; ? = medio; ?? = alto; * = rápido; ** = lento; X = bueno; XX = aceptable; F = fácil; MD = moderadamente difícil; D = difícil

con agujeros para la ventilación sobre la parte superior para contener al ratón. Se dispuso el dispositivo en un soporte adecuado y se colocó un vaso de precipitados debajo del mismo. Se estima que su coste de fabricación fue inferior a 2 dólares estadounidenses.

Dispositivo desechable para la recolección de orina de un único ratón

Smith *et al.* (1981) construyeron un dispositivo desechable y barato, de precio inferior a 1 dólar estadounidense, para recoger la orina individual de un ratón utilizando un tubo para centrifugación cónico desechable de polipropileno de 250 ml. y tela metálica. Este procedimiento podría resultar útil en el caso de que deban administrarse a los ratones sustancias altamente tóxicas o agentes carcinogénicos. Mediante el aporte externo de agua y alimento, se evitó el riesgo de que las muestras de orina se diluyan con el agua del bebedero o se contaminasen con el alimento.

El extremo cónico del cilindro se cortó para hacer una abertura de un centímetro en la base del cono. Una malla metálica galvanizada horizontal 4 mesh (cuadrados de 0,625 cm.) de 5x6 cm. se colocó a través de unas rendijas en la pared lateral de la porción cilíndrica del tubo (9,5 cm. desde la parte superior), sobre el que se situó al ratón durante el periodo de la recolección de orina. Se insertó otra rejilla de alambre (malla de alambre de acero cromado resistente a la corrosión: 16 mesh, 1/6 cuadrado) a través de rendijas en la parte baja del tubo para retener las heces, permitiendo a la orina fluir a través de la porción cónica del tubo. Se practicaron dos aberturas, cubiertas con malla metálica galvanizada 4 mesh, para permitir el acceso de la comida y el agua. La orina excretada fluía hasta un tubo que se mantenía en un contenedor lleno de hielo para que se mantuviese a 4°C. Los volúmenes de orina iban desde 0,5 hasta 2 ml. cada 24 horas por un ratón de 25g.

Dispositivo para la recolección de orina de 24 horas en ratones

Jones *et al.* (1973) construyeron un dispositivo para recoger la orina de ratones individuales. Es similar al de Perline (1971), pero presenta ciertas ventajas, como una limpieza más fácil, reducción de la superficie de tensión y mayor libertad de

movimiento para el ratón con un menor nivel de estrés. Se componía de una jaula para animales Gridweld (17,5x17,5x15 cm.), un embudo de aluminio calibre 24 de 20 cm² con un orificio de 0,94 cm. de diámetro en el vértice y un tubo de polietileno (12,5 cm. de largo y 0,78 cm. de diámetro). La jaula se mantiene dentro del embudo, y debajo de ella se coloca una rejilla de acero inoxidable 6 mesh/2,5 cm. El embudo y la rejilla se bañan en silicona para reducir la superficie de tensión y facilitar el paso de la orina. El tubo de polietileno permanece en el recipiente de recolección y sobresale por el embudo, evitando de esta forma el paso de las heces al recipiente, pero sin impedir el paso de la orina. La plastilina evita que se mueva el recipiente de recolección. El ratón se coloca en el dispositivo, y se le permite aclimatarse durante 24 horas antes de comenzar la recolección de orina. Una rutina que los autores han encontrado efectiva consistía en recoger la orina durante 16 horas y posteriormente proporcionar alimento durante 8 horas. El embudo y demás dispositivos se retiraban durante el periodo de alimentación para evitar la contaminación con partículas de comida. (Tabla 1).

Métodos con jaulas metabólicas comerciales para la recolección de orina de 24 horas

Existen numerosas jaulas metabólicas comerciales para contener animales de experimentación con el objetivo de recoger su orina (Harvard Apparatus, MA, EE.UU.; Braintree Scientific, MA, EE.UU.; Techniplast, NJ, EE.UU.). Estas jaulas están meticulosamente construidas para separar de forma efectiva las heces y la orina en tubos externos a la jaula. La separación es inmediata y completa, sin contaminación de la orina y sin ninguna posibilidad de que la orina entre en el tubo de las heces, proporcionando muestras puras y fiables. Una jaula metabólica comercial típica se construye de la siguiente manera. El animal se mantiene en un habitáculo de policarbonato transparente y resistente a las mordeduras con respiraderos de quita y pon. Dispone de un habitáculo para la comida fuera de la jaula que contiene un cajón con alimento el cual puede abrirse por fuera, facilitando su llenado con papi-las, líquidos o polvos, sin molestar al animal. Esta disposición evita que la orina se contamine

con el alimento. Las pequeñas dimensiones del habitáculo externo disuaden al animal de hacer su nido o dormir en él. Las jaulas tienen una botella de agua y un tubo para la recolección de derrames, diseñado para evitar que el agua entre en la jaula y contamine la orina. Este tubo está calibrado, lo que permite al investigador medir la cantidad real de agua que consume el animal. Los tubos para la recolección de orina y heces están hechos de polimetilpenteno impermeable, y permiten a las heces y la orina fluir dentro de tubos de recolección diferenciados. Las jaulas están construidas de tal forma que la orina nunca entra en el tubo de las heces. Cada deshecho puede retirarse sin la menor molestia para el animal, lo que permite que las pruebas puedan llevarse a cabo durante un periodo de tiempo prolongado sin interrupciones causadas por el periodo de aclimatación del animal. Además, todos los componentes de la jaula se pueden esterilizar. La jaula de metabolismo requiere una única jaula de apoyo, que puede ser una jaula tanto de grandes como de pequeños roedores.

A pesar de que se han descrito varios modelos de jaulas metabólicas para la recolección de orina de animales de experimentación, no se ha mostrado con claridad que los procedimientos de recogida no sean estresantes para los animales, lo que es especialmente cierto en animales que se alojan en jaulas de dimensiones mucho menores de las recomendadas para contener animales de laboratorio para experimentación (Merkenschlager & Wilk 1979). Además, las jaulas metabólicas están construidas con mallas de alambre como base, lo que puede conllevar incomodidad para el animal o incluso daños en los tejidos de las patas, probablemente como resultado de úlceras por presión (Ewbank 1984, Lawlor 2002).

La importancia del bienestar animal para la obtención de buenos resultados experimentales ha recibido mucha atención recientemente como resultado de varios estudios científicos (Anderson *et al.* 1972, Hughes & Black 1976, Miller *et al.* 1986, Jezierski & Konecka 1996, Lensink *et al.* 2000, Rochlitz 2000, Russell 2002) y por la Directiva del Consejo Económico Europeo en los años 80 (Comunidad Económica Europea 1986), y más recientemente por la American Association for Laboratory Animal Science (AALAS 2001). Se ha resaltado una y otra vez que “los

animales estresados no resultan útiles para la investigación” (American Medical Association 1992, citado por Reinhardt y Reinhardt 2000).

Tradicionalmente se ha tendido a mantener a los roedores en los laboratorios en habitáculos pequeños, inhóspitos y monótonos (condiciones altamente estandarizadas) con el fin de reducir la variabilidad de los datos y las respuestas en las investigaciones. Recientes pruebas sugieren que mantener a los animales en estas condiciones les afecta de una forma tan decisiva que incluso están empezando a cuestionarse los resultados de investigaciones realizadas en estas condiciones (Wurzel 2001, Sherwin 2002). El énfasis en las condiciones de alojamiento animal se ha puesto en cambiar de un enfoque de “ingeniería” (especificar las dimensiones y características de las jaulas) a uno de “rendimiento” (proporcionar condiciones de alojamiento que ayuden a los animales a alcanzar ciertos estándares de rendimiento) (National Research Council 1996). Otros estudios han demostrado que el bienestar de las ratas puede aumentar cambiando el suelo enrejado de las jaulas por un suelo sólido (Manser *et al.* 1995, Manser *et al.* 1996). También se ha demostrado que un entorno más complejo, comparado con la simple jaula, reduce las respuestas de ansiedad a estresores potenciales (Levine 1985). Las ratas que tienen acceso a un refugio adecuado han demostrado ser más exploradoras y menos tímidas que aquellas que se encuentran en jaulas normales (Townsend 1997). Manser *et al.* (1998) han descubierto que las cajas nido de materiales opacos o semi-opacos constituyen refugios especialmente adecuados. El sistema actual de alojamiento no satisface los requerimientos del comportamiento del animal más allá de recibir alimento y agua. Los ratones de laboratorio han demostrado tener un variado repertorio de comportamientos (Jennings *et al.* 1998), que se ve frustrado cuando se les mantiene bajo condiciones convencionales de laboratorio. En consecuencia, estos ratones a menudo muestran comportamientos anómalos que indican que experimentan frustración crónica cuando se les mantiene en jaulas convencionales. Además, las capacidades sensitivas de los ratones rara vez se han considerado en el diseño de alojamientos y métodos de cría, lo

que se ha comparado con la cría de animales en condiciones de privación o interferencia sensorial (Sherwin 2002).

Alternativas a las jaulas metabólicas comerciales para fines experimentales

Recolección de orina de un único ratón y sistema de monitorización de pH

Las jaulas metabólicas para ratones disponibles en el mercado cuentan con grandes zonas de recolección que provocan una escasa eficacia en la recogida de orina de ratón y la contaminación con alimento y heces. West *et al.* (1978) diseñaron una cubeta de cristal con una superficie mínima para albergar ratones para la recolección de orina de 24 horas, destinada a utilizarse junto con un electrodo de pH y un baño refrigerante para monitorizar el pH urinario y tomar muestras.

El dispositivo consistía en una cubeta cilíndrica de cristal de 13 cm. de altura y 5,8 cm. de diámetro, con un fondo en forma de embudo equipado con dos filtros de acero inoxidable (superior: tela metálica de 8 mesh, 5,7 cm. de diámetro; inferior: 12 mesh, 5,7 cm. de diámetro) para sostener al animal y evitar que las heces se depositaran en la superficie de recolección de orina (Fig. 5). Los filtros estaban separados por un aro de acero inoxidable de un centímetro de alto y 5 cm. de diámetro. Se practicaron tres agujeros en las paredes de cristal de la cubeta: uno permitía el acceso a la comida, el segundo estaba unido a un tubo por el que llegaba el agua, mientras que el tercero, situado junto al filtro superior, servía a los ratones para deshacerse de las heces que se adherían al filtro superior. Para

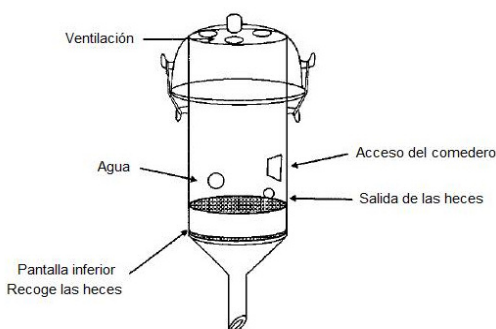


Fig. 5 Cubeta para la recolección de orina de un único ratón

ventilar, se utilizó una cubierta en forma de tapa de 8 cm. de diámetro y 3 cm. de altura, con agujeros de 0,8 cm.

Un experimento realizado con un compuesto radiomarcado excretado en la orina reveló una eficiencia de recuperación del 74,2%, mientras que el 25,8% del material radiactivo se encontró adherido a la superficie de la jaula. Un electrodo de pH, unido a la jaula mediante un tubo de látex de 1,5 cm. de largo y un diámetro interior de 2 mm., junto con un pH-metro digital y un registrador de procesos, proporcionaban un registro continuo de pH respecto al registro de tiempo de excreción.

Método del papel de aluminio

Black y Claxton (1979) inventaron un método para recolectar orina de ratas alojadas en jaulas colgantes, utilizando papel de aluminio unido al fondo de las mismas, desde aproximadamente 10 cm. desde la parte delantera, dejando un espacio entre la jaula y el papel de aluminio de entre 1,5 y 2,5 cm. (Fig. 6). Las arrugas en el papel permitían que la orina se acumulara en pequeños espacios, librándola así de las heces. Se encontró que la recolección de muestras de orina (aproximadamente un mililitro) era completa en 4 horas. Este método no era aplicable para la recolección durante la noche, ya que los investigadores descubrieron que las ratas tendían a morder el papel de aluminio si lograban hacer contacto con él. Además, se descubrió que la orina se evaporaba, y las heces se acumulaban en una cantidad que hacía imposible la obtención de orina no contaminada.

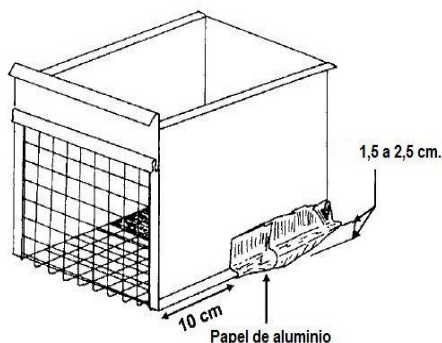


Fig. 6 Jaula colgante para rata con papel de aluminio en la base para la recolección de muestras de orina

Fenske (1989) inventó un modo de recoger orina de 24 horas de los animales pequeños para experimentación, tales como los gerbos mongoles, ratas, cobayas y musarañas arborícolas, manteniéndolos en jaulas de tamaño idéntico al de sus jaulas habituales durante el periodo de recolección. Fenske colocó hojas de papel de aluminio bajo jaulas equipadas con suelos de malla de acero inoxidable, y recogió orina de 24 horas de forma cualitativa. A pesar de que en algunas zonas la orina se secaba, se descubrió que la orina seca podía separarse de las hojas de aluminio humedeciéndola (porcentaje de recuperación: 84-100%).

Método de la separación del cien por cien

Jackson y Sutherland (1984) fabricaron un nuevo aparato para la recolección cuantitativa de orina que (a) proporcionaba una separación del 100% entre las heces y la orina, (b) daba una recolección cuantitativa de pequeñas muestras de orina (0-7 ml.), (c) estaba desprovisto de metal en su diseño y (d) era resistente a disolventes orgánicos. El dispositivo tiene un soporte (hecho de resina acetálica o resina acetálica recubierta de polimetil-metacrilato) con un embudo en el que se introduce el pene de la rata (o región de la uretra en el caso de las hembras). Este soporte se adhiere a la piel de la pelvis mediante un adhesivo de metilcianoacrilato de secado rápido. El embudo y el recolector de orina son partes separadas que se unen con tornillos dispuestos en torno a un anillo cilíndrico situado a la entrada del embudo. Este anillo se atornilla a una abertura a través de la pared superior del contenedor, que es simplemente una cámara abierta por arriba. Se utiliza un sumidero en la parte de abajo para vaciar el contenedor. Las muestras de orina pueden recogerse utilizando una jeringa o separando el contenedor del embudo.

Recolección de orina para estudios metabólicos y de farmacocinética

Toon y Rowland (1981) fabricaron un dispositivo de Plexiglas para contener a ratas canuladas y recoger orina libre de heces durante estudios de farmacocinética crónica y estudios metabólicos de fármacos. La parte principal del aparato es un tubo transparente de Plexiglas (de 35 cm. de largo con un diámetro interno y externo de 6,3 y

7,6 cm. respectivamente) con una rendija de 0,4 cm. de ancho en la parte superior para acomodar las cánulas que salen al exterior, lo que permite la toma de muestras y la administración de fármacos. El suelo del tubo era una malla de aluminio en forma de diamante (4,5x35, tamaño de los agujeros: 0,3 cm.) situada a un centímetro de altura sobre la parte baja del tubo. El suelo es de quita y pon para facilitar su limpieza, y durante su uso se sujeta mediante tres ganchos de acero inoxidable. Estos ganchos sobresalen del fondo del tubo y se enganchan en unos agujeros practicados en tres tiras de Plexiglas (4x0,6x0,6 cm.), que a su vez están sujetas mediante tornillos al suelo de malla. Cada tira de Plexiglas se sitúa a 2 cm. de cada extremo del suelo mediante una tercera tira que se coloca bajo la mitad del suelo. Para evitar la pérdida de orina, se bloquean los extremos abiertos del tubo bajo el suelo de malla utilizando un segmento de Plexiglas de un centímetro de grosor. Se coloca un tubo de acero inoxidable (1 cm. de diámetro, 3 cm. de longitud) a través de la base del tubo en uno de los extremos, que actúa como sumidero para la recolección de orina.

Requerimientos especiales para la determinación cuantitativa de compuestos inestables

Recolección de orina a baja temperatura

Las muestras de orina deben congelarse rápidamente tras su recolección para la determinación cuantitativa de compuestos inestables presentes en ella, con el fin de que la degradación oxidativa, enzimática y bacterial sea mínima. Denckla (1966, 1969) desarrolló un método para recoger orina reciente en ratas mediante caída libre a través de un suelo de malla de alambre en una placa refrigerada a -55°C o en heptano congelado. En el dispositivo que diseñó en 1969, la orina y las heces caían en heptano en hielo seco (Fig. 7). El contenedor principal es una nevera de picnic que tiene una funda de polietileno lineal sobre una parte de espuma de estireno expandido. En los lados y en el fondo del dispositivo se utiliza un aislante adicional de fibra de vidrio de 5,1 cm. El recipiente recolector de orina es un molde de Teflon® de un tamaño adecuado para caber dentro de la nevera. Este recipiente tiene atadas unas cuerdas que facilitan su manipulación. Un cola-

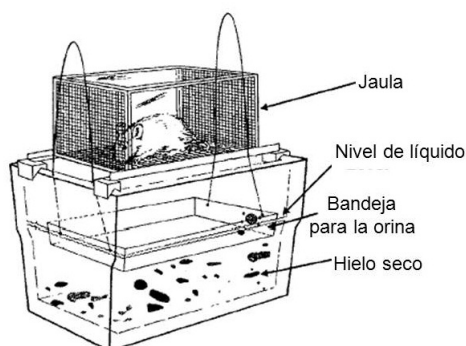


Fig. 7 Dispositivo de baja temperatura para la recolección de orina. Se utiliza un recipiente que contiene heptano refrigerado con hielo seco para recoger la orina

dor de acero inoxidable está unido a una de ellas para desaguar el heptano, y se practica un agujero de 2,5 cm. en el fondo del recipiente para la recolección de orina, en el que se coloca un tapón de neopreno. La jaula de la rata se suspende aproximadamente 3,75 cm. por encima del borde de la nevera, en un soporte sencillo de aluminio con patas de madera que se apoya en el borde de la nevera. Se descubrió que aproximadamente 4 kg. de hielo seco servían para unas 16 horas. A medida que el hielo se sublima, el recipiente se hunde lentamente y por lo tanto siempre contiene heptano, aproximadamente 2,5 cm. La orina forma porciones esféricas que no se ad-

hieren a las heces. Las heces pueden eliminarse con facilidad con fórceps antes de recoger la orina.

Lartigue *et al.* (1978) fabricaron un aparato modular más complicado para la recolección de orina de roedor a baja temperatura (-19°C) (Fig. 8). El dispositivo consistía en un recipiente de metal cubierto y aislado en el que se enfriaba propilenglicol mediante una sonda de temperatura estándar y removida con un agitador de baja velocidad. El recipiente (70x70x9cm.) estaba hecho de acero inoxidable. Un tubo de metal estaba soldado en el centro de una de las paredes, cerca del fondo, lo que servía para introducir un tubo aislante (Armaflex, Armstrong Cork Co, Lancaster, PA), diseñado para ajustarse cómodamente en torno al manguito flexible de una sonda de temperatura (Cryocool, CC-60F, Neslab Instruments, Portsmouth, NH). La unión interna de los tubos se aseguraba con silicona, y la unión externa con el manguito flexible mediante una abrazadera circular. El recipiente se llenaba con polietilenglicol para sumergir completamente la sonda de temperatura. Para su aislamiento, el exterior del recipiente se cubría con hojas de poliestireno de 2,5 cm. de espesor. El borde del recipiente sobresalía un centímetro por encima del aislamiento de 8 cm. de altura. Una hoja de poliestireno de 75x75 cm. que se hundía a una profundidad de un centímetro en la parte inferior, a una distancia de 2,5 cm. de los 4 extremos, formaba una cubierta que se ajustaba cómodamente.

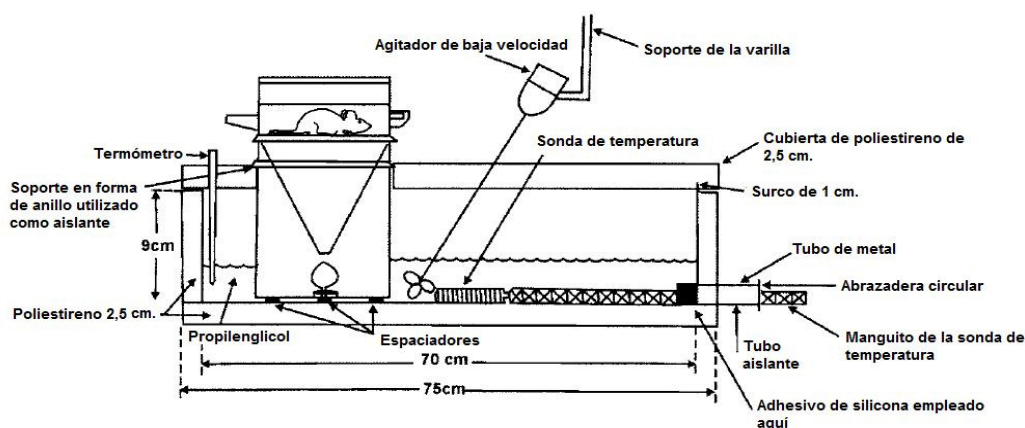


Fig. 8 Sección transversal del dispositivo para la recolección de orina de ratón a baja temperatura en la que se muestran los detalles de construcción

Se practicaron agujeros de 21 cm. de diámetro en la cubierta para acomodar cinco jaulas metabólicas de roedores. Los agujeros se espaciaron de tal forma que no interfiriesen con la sonda de temperatura. Se practicó un agujero oblicuo cerca de la sonda para introducir una varilla agitadora. El motor del agitador se montó 35 cm. por encima de la tapa en un soporte horizontal. Esta distancia era necesaria para cambiar las jaulas. Para mejorar la circulación del polietilenglicol bajo las jaulas, se colocaron tres separadores de 0,5 cm. de altura en el suelo del recipiente bajo cada agujero. Las jaulas se insertaron utilizando un soporte para agua y alimento en forma de anillo para cubrir el pequeño espacio entre el lateral de cada jaula y el agujero. Se practicó un agujero a través de la pared superior, cerca de uno de los laterales del recipiente, para introducir un termómetro.

Una campana de plástico suspendida desde la parte baja del embudo desviaba las heces al fondo de la jaula, y permitía a la orina fluir por su superficie hasta un recipiente de recolección en la parte inferior. Este método permitía la recolección de volúmenes de orina de 50 ml. por periodo de recolección y proporcionaba una buena separación de heces y orina. Sin embargo, la extensa superficie de malla de la jaula no evitaba totalmente la coprofagia (ingesta de deposiciones). Se utilizaron dispositivos para la recolección de heces (Frape *et al.* 1970) en el caso de ser necesaria la recolección total de las mismas o la eliminación de la coprofagia.

Recolección de orina de ratón o rata en la microgravedad del espacio

La gravedad nos mantiene en el suelo, mantiene a la luna en órbita en torno a la Tierra, y a la Tierra en órbita en torno al sol. Es una fuerza que gobierna el movimiento en todo el universo. Es sabido, no obstante, que no hay gravedad sobre la atmósfera terrestre, por ejemplo, en el "espacio", y en consecuencia parece que no haya gravedad a bordo de naves espaciales en órbita. Normalmente, la altura a la que se sitúan los vuelos espaciales varía entre los 190 y los 580 km. sobre la superficie terrestre. En estas regiones, el campo gravitacional es aún bastante fuerte, ya que sólo es el 1,8% de la distancia a la luna. El campo gravitacional de la Tierra a unos 400 km.

sobre la superficie mantiene el 88,8% de su fuerza en la superficie. Por lo tanto, la estación espacial o el satélite espacial se mantienen en órbita en torno a la Tierra por gravedad.

Isaac Newton describió la naturaleza de la gravedad por primera vez hace más de 300 años. Es la atracción entre dos masas cualquiera, lo que es más aparente cuando una de las dos es de gran tamaño (como la Tierra). La gravedad normal, o 1 g, es la aceleración de un objeto hacia el suelo causado únicamente por la gravedad, cerca de la superficie terrestre, y es igual a $9,8 \text{ m/s}^2$ (32.2 ft/s^2)

Si una manzana se deja caer en la Tierra, cae a 1g. La manzana que un astronauta deja caer en la estación espacial también cae, pero simplemente no parece que esté cayendo. Esto se debe a que están cayendo a la vez la manzana, el astronauta y la estación. Sin embargo, la diferencia es que no están cayendo hacia la Tierra, sino en torno a ella. No obstante, ya que están cayendo al mismo tiempo, los objetos que hay dentro de la estación parecen flotar en un estado que se llama gravedad cero (0g) o, más específicamente, microgravedad ($1 \times 10^{-6} \text{ g}$) (National Aeronautics and Space Administration, EE.UU.)

Se dispone de varios modelos de vuelo espacial, para ser utilizados en investigación en la Tierra, que imitan los cambios fisiológicos que se aprecian en la rata bajo las condiciones de microgravedad (Musacchia *et al.* 1980, Wronski & Morey-Holton 1987). Sin embargo, la información sobre la nutrición o la función gastrointestinal o renal en el modelo de vuelo espacial descrito por Wronski & Morey-Holton, el modelo animal más empleado, se ha visto limitado por la dificultad de obtener muestras de orina no contaminadas para análisis (Harper *et al.* 1994). En el sistema Holton, se sostiene la cola con un arnés de tracción, y los cuartos traseros de la rata se elevan uniendo el arnés a un sistema de poleas. Los miembros que normalmente mantienen el peso no están cargados, y se produce un fluido movimiento hacia delante. Las ratas sostenidas por la cola son capaces de moverse libremente en sus jaulas con las patas delanteras y toleran este procedimiento con un mínimo estrés. En este sistema, no obstante, la orina, heces y comida derramada caen a través del suelo en papel absorbente bajo la jaula y no pueden separarse y

recuperarse de forma cuantitativa para análisis en estudios de equilibrio metabólico.

Harper *et al.* (1994) han descrito un sistema modificado donde han añadido un sistema de separación para recoger muestras de orina y heces para estudios metabólicos y nutricionales en el modelo de suspensión por la cola. El diseño básico para la parte superior de la jaula y el aparato de suspensión seguía siendo el mismo que el del modelo de Holton. Sin embargo, en este nuevo modelo, el comedero pasaba de estar en un rincón interior de la jaula a ampliar la parte frontal de la misma mediante un túnel de 3,8 cm. de largo por 5,1 de diámetro exterior con un suelo de rejilla. El animal puede avanzar por el túnel para obtener la comida, y el alimento derramado cae a través de los agujeros del tubo de plástico a una pequeña bandeja bajo el suelo. Este alimento puede volver a incorporarse al comedero antes de pesar al animal para determinar su consumo. Un embudo en la base de la jaula tiene una lengüeta en la parte estrecha, al que está unido el separador de heces y orina. El separador recoge la orina y las heces mediante un difusor lineal en un tubo con rosca, para centrifugación de 30 mm. de diámetro con una capacidad de 30 ó 50 ml. La orina fluye por el embudo en el difusor lineal, donde unos estrechos canales la conducen a la abertura del tubo colector. Las heces caen por el embudo y sobre estos canales a un segundo tubo. Los datos específicos sobre ingeniería y materiales los proporciona un memorándum técnico de la NASA (Evans *et al.* 1994). Este aparato se ha utilizado sucesivamente para recoger muestras de orina posteriores a los vuelos de la lanzadera espacial Spacelab Life Sciences-2.

Las gotas de agua pueden flotar bajo condiciones de microgravedad en el espacio, creando una amenaza potencial para los equipos eléctricos. El sistema de lanzadera espacial se ha diseñado para incorporar presión atmosférica y flujo de aire (para reemplazar la gravedad) para la recolección neumática y transporte de residuos humanos en equipos de procesamiento de residuos. La recolección de orina de ratón o rata no es práctica en la microgravedad espacial en la actualidad, y Kurien y Scofield (1999) han sugerido un modo hipotético de obtener pequeños volúmenes de orina

colocando a los animales en bolsas ziploc (o bolsas transparentes similares) con tubos para proporcionarles oxígeno y para aspirar la orina.

Métodos quirúrgicos

Recolección de orina de ratas macho anestesiadas

La recolección de orina de ratas se ha llevado a cabo mayoritariamente mediante jaulas metabólicas (Sunderman 1944, Harned *et al.* 1949, Peacock & Harris 1950), o mediante cistostomía. White (1971) desarrolló un método para recoger orina de ratas anestesiadas utilizando un catéter de drenaje externo. Tras la anestesia con uretano subcutáneo, una rata macho de 200-400g. se coloca en posición supina y se inmoviliza. La compresión digital a lo largo de la base del prepucio fuerza que el pene sobresalga. Se coloca entonces un catéter intramédico modificado Luer-end de polietileno en la punta del pene. Después, se utiliza un hemostato para colocar el prepucio sobre el catéter del pene para fijarlo mediante una ligadura de seda. El catéter se retrae entonces desde la punta del pene hasta donde la ligadura del prepucio es distal al final del catéter, lo que evita la obstrucción de la uretra, que tiene lugar cuando el catéter se fija con mucha fuerza al pene. Cuando se extraen los fluidos mediante un tubo orogástrico, se obtiene un flujo de 6-10 cc de orina por hora. La orina recogida utilizando este método ha demostrado estar libre de células y ser comparable a orina excretada normalmente.

Recolección de orina de otros pequeños animales

La medicina de mascotas exóticas es un campo en constante cambio. Cada año entran al mercado un gran número de especies diferentes, provenientes de diferentes lugares del mundo. Los cuidados veterinarios se convierten en algo esencial, ya que los dueños de estas mascotas ignoran los cuidados básicos y necesidades nutricionales y médicas de muchos de estos animales. Los análisis de orina son una importante fuente de diagnóstico para determinar las funciones renales y las infecciones del tracto urinario en ellos (Ness 1999).

Ness (1999) menciona diferentes modos de recoger orina de pequeños animales exóticos, como la chinchilla (un roedor nativo del clima frío y seco de los Andes), el perro de las praderas (un roedor de aproximadamente el tamaño y la forma de un conejillo de indias), el erizo y el felangérido de azúcar (un pequeño marsupial arbóreo nocturno). La orina puede extraerse del suelo de la jaula fácilmente siempre que la muestra esté libre de contaminación fecal, lo que es básico para la correcta interpretación de los resultados. La cateterización uretral no suele ser práctica para recolectar orina en pequeños animales. En este caso podría emplearse la cistocentesis (descrita anteriormente).

Recolección de orina de conejos

Recolección de orina con intervención moderada
Garvey y Aalseth (1971) demostraron que las muestras de orina podían tomarse fácilmente de conejos recién nacidos (de edades entre 12 horas y 10 días). Se sostiene al conejo sobre su espalda con la cabeza hacia la muñeca de la mano izquierda del operario, cuyo pulgar presiona la pata izquierda trasera. El conejo es inmovilizado firmemente y se le impide moverse. Con el pulgar de la mano derecha se presiona levemente y con suavidad el abdomen del conejo. La presión debería comenzar a la altura del estómago y terminar justo debajo de la vejiga, región en la que la presión debería ser mayor. Se debe mantener la presión hasta que se expela la orina, lo que sólo sucede cuando los músculos están relajados. Después de 10 días, deberá modificarse la limitación impuesta al conejo. Los dedos pulgar y meñique del operario deberán sostener al animal por el cuello y la caja torácica, dejando libres las patas traseras. La presión que se ejerce sobre el animal es igual a la descrita anteriormente; sin embargo, deberá ejercerse durante un periodo más largo antes de que la orina sea liberada debido al aumento de control muscular. En este punto la función de la vejiga ya no se estimula, por lo que es necesario aislar al conejo durante varias horas para permitir que la vejiga se llene antes de la recolección. El experimentador tiene que recordar que la presión o limitación excesiva puede generar incomodidad, daños internos o asfixia. Además, cada conejo requiere un tiempo

diferente para relajarse, por lo que puede que sea necesario ejercer presión durante varios minutos. Utilizando este método se han recolectado hasta 5 ml. de orina.

Recolección de orina mediante cistocentesis

La cistocentesis es un procedimiento mediante el que puede obtenerse orina estéril directamente de la vejiga insertando una pequeña aguja, sin contaminación potencial por la uretra distal o el tracto genital. La cistocentesis en conejos se lleva a cabo igual que en los gatos (descrita en la próxima sección). La vejiga se localiza en el abdomen caudoventral, y puede localizarse cuando está llena. Se atraviesa la pared abdominal con una jeringa estéril hasta llegar a la vejiga para recoger la muestra de orina directamente en ella. Es la forma “más limpia” de recoger una muestra de orina, ya que se obtiene directamente de la vejiga y estará libre de la microbiota habitual de la uretra (Tabla 2).

Recolección de orina utilizando jaulas metabólicas

Se ha llevado a cabo con éxito la recolección de muestras de orina en conejos con fines cuantitativos utilizando jaulas metabólicas (recolección de orina de 24 horas) (Benson & Paul-Murphy 1999). Normalmente una jaula para conejos debería permitir el enriquecimiento social o ambiental mediante comportamientos normales tales como sentarse sobre las patas traseras, saltar, hacer agujeros o esconderse. En el pasado, los conejos de laboratorio se mantenían en jaulas pequeñas, lo que ha demostrado tener efectos perjudiciales (Boers *et al.* 2002). Se ha descubierto que es muy importante proporcionar un espacio adecuado (que permita cambios de postura normales con libertad de movimiento), camas de paja, palos de madera y ramas de árbol (para roer), y cajas de cartón y plástico (para servir como sustituto de las madrigueras y lugares “seguros” en los que refugiarse). Parte del heno debería colocarse encima de la jaula para que el animal pueda pasar algo más de tiempo recuperándolo a través de los barrotes de la jaula. Debe evitarse que un animal esté separado visualmente de otros conejos (ya que a los conejos les encanta vivir en grupos). El espacio en el que se ubicaría un único animal debería tener, al menos,

una superficie de 75 x 80 cm. El suelo de las jaulas no debería tener rejilla o alambre, ya que esto daría lugar a pododermatitis ulcerativa. La recolección de orina en conejos debería ser lo menos estresante posible.

Recolección de orina de felinos

La mejor forma de obtener orina estéril de un gato es mediante cistocentesis. El segundo mejor método es la "micción libre", en la que la orina se recoge en un contenedor estéril o limpio cuando sale del cuerpo. El tercer método, pero el menos deseable, es recoger la orina de un contenedor o del suelo después de que haya sido excretada. La obtención de orina mediante micción libre o por el tercer método resulta menos estresante y doloroso para el animal que la cistocentesis. Para fines cualitativos, como medida del pH y otros metabolitos como la glucosa, proteínas, etc., puede ser suficiente recoger la orina mediante el método de la "micción libre".

Cistocentesis

La cistocentesis puede practicarse en especies más pequeñas utilizando una aguja calibre 25 G o inferior. También se puede practicar la cistocentesis sobre la vejiga expuesta después de la anestesia, e inmediatamente antes de la necropsia.

La importancia de la cistocentesis ha sido reconocida durante más de 80 años, como instrumento tanto de diagnóstico como terapéutico. El diagnóstico mediante cistocentesis sortea muchos de los problemas potenciales asociados con la recolección de muestras de orina mediante la micción normal, compresión manual de la vejiga urinaria o cateterización (Kruger *et al.* 1996) en los pacientes felinos con enfermedades no obstructivas del tracto urinario inferior (LUTD: "lower urinary tract diseases") o en felinos sin alteraciones urinarias.

La cistocentesis puede practicarse de varias maneras. Puede realizarse con el animal tumbado de espaldas con los miembros hacia arriba (recumbencia dorsal), en recumbencia lateral, de pie o de pie sobre las patas traseras, sujetos elevando sus cuartos traseros. La cistocentesis se practica normalmente con una aguja de calibre 25-22 G. Se rasura la piel en el área de inyección

y se limpia con una solución antiséptica. En primer lugar se palpa e inmoviliza la vejiga. Debe tomarse la precaución de no apretar demasiado la vejiga durante la punción, ya que esto puede provocar que la orina pase del lugar de la inyección a la cavidad abdominal. La aguja se inserta con un ángulo de 45°, a escasa distancia de la unión de la vejiga con la uretra. La aguja debe insertarse en la vejiga a la vez que se tira del émbolo para crear una presión negativa. Sin embargo, si no se obtiene orina, la aguja no debe volver a insertarse, para evitar el riesgo de penetrar un asa intestinal y posteriormente insertar la aguja contaminada en la vejiga. La aguja debe cambiarse antes de volver a insertarse en la vejiga. Si después de tres intentos no se obtiene orina, puede deberse a que la vejiga sea pequeña y esté situada en el canal pélvico. Tras obtener la muestra de orina, se suelta el émbolo y se extrae la aguja del abdomen (Dhein 2002).

Aparte de inducir ligera hematuria microscópica transitoria (que podría ser indiscernible de la hematuria patológica asociada a muchas enfermedades de etiología diversa del tracto urinario inferior en felinos), no se ha demostrado que la cistocentesis esté asociada con efectos secundarios significativos.

Métodos con jaulas para fines cuantitativos

Recolección en jaulas

Cuando se necesitaban muestras diarias y limpias de orina de gatos, y cuando no se disponía de jaulas metabólicas, Matandos y Franz (1980) inventaron un método para recoger orina de gatos de laboratorio enjaulados. Utilizaron este método para recoger orina de 34 gatos confinados en jaulas individuales de fibra de vidrio equipadas con suelos de acero inoxidable perforados, 8 cm. por encima del suelo de fibra de vidrio. Se sujetó una pequeña pieza (3x2x35cm.) al fondo de un recipiente redondo de goma (37 cm. de diámetro x 13 cm. de profundidad), de forma que el recipiente estaba inclinado 6° (para desagüe). Se practicó un agujero (8 mm. de diámetro) en el recipiente en el punto más bajo de la circunferencia exterior de su base. Se cortó transversalmente el tubo de una jeringa desechable de 3 ml. por la marca de 0,25 ml., y se introdujo por el agujero practicado al recipiente empujando desde el inte-

rior. Para asegurar el completo desagüe del recipiente, los agarres para los dedos de la jeringa se cortaron manualmente con un pequeño aparato eléctrico. El tubo de la jeringa se sujetó utilizando pegamento líquido epoxy cuando se hubo colocado en la posición deseada. Para una mejor adhesión, las superficies tanto del recipiente como de la jeringa se frotaron con papel de lija antes de la aplicación del pegamento. El recipiente se colocó en el rincón trasero de la jaula con el agujero para desagüe lejos de la esquina. La jeringa desagüe, que sobresalía por debajo del suelo, tenía un vaso de precipitados desechable de 100 ml. bajo el suelo elevado de la jaula. Los autores han empleado esta técnica con más de 200 gatos, y han obtenido un éxito de recolección del 82%. Los gatos que orinaron fuera del recipiente o que no orinaron constituían el 9% de los fracasos, mientras que el 3% restante se debió a contaminación por heces, heces bloqueando el agujero de desagüe o el desplazamiento del recipiente lejos del vaso de precipitados.

Jaulas con suelo sólido

Los gatos son normalmente confinados en pequeñas jaulas metabólicas con bases de rejilla metálica, lo que es muy incómodo para los animales, en especial si se les retiene en ellas demasiado tiempo. Estas jaulas con suelos de rejilla impiden a los gatos enterrar sus heces, cosa que los gatos enjaulados han demostrado preferir (Bateson & Turner 1988). La supresión de este comportamiento podría interferir con el bienestar del gato, por lo que Pastoor *et al.* (1990) han desarrollado un método alternativo para recoger orina de gatos utilizando jaulas metabólicas con suelos sólidos, equipadas con cajones de arena modificados para separar la orina y las heces y que permiten a los gatos enterrar sus heces.

Los gatos suelen responder a las malas condiciones de alojamiento inhibiendo comportamientos normales (alimentación, acicalado, exploración y juego) o volviéndose inactivos debido a que no disponen de un repertorio amplio (expresión facial, postura corporal) para la comunicación visual, como tienen los perros, muy sociables y acostumbrados a vivir en grupo (Rochlitz 2002). Por lo tanto, alojar a

los gatos en un entorno adecuado hará más fácil la recolección de orina (u otras investigaciones científicas) además de asegurar el bienestar animal (Poole 1997). Las jaulas en las que se alojen a los gatos deberán tener suficiente espacio para que expresen un amplio rango de posturas y comportamientos normales, tales como estirarse, explorar y jugar, y para permitir al investigador llevar a cabo fácilmente procedimientos rutinarios como la recolección de orina. Es la calidad del espacio de la jaula más que su tamaño lo que es importante para los gatos, una vez que se han alcanzado unas dimensiones mínimas (Rochlitz 2000) (Tabla 2).

Recolección de orina de hurones

El método elegido para obtener orina de estos animales es la cistocentesis, cuando la vejiga urinaria es palpable (Morrissey & Ramer 1999). Se puede acceder a la vejiga urinaria a través de la pared lateral del cuerpo, como en los gatos, con una jeringa de 3 ml. y una aguja de 25 G. Una adecuada inmovilización es esencial para este procedimiento, y se ha demostrado útil distraer al animal con una sustancia dulce. La cateterización uretral resulta difícil en estos animales.

Recolección de orina de canes

Se han recogido muestras de orina de perros para cultivo bacteriológico y análisis de orina utilizando tres métodos, que son la micción voluntaria, la cistocentesis y la cateterización.

Micción voluntaria con intervención moderada

Mediante la compresión digital de la vejiga, Carter *et al.* (1978) recogieron muestras excretadas voluntariamente, lo más limpias posible, en vasos estériles. Ocasionalmente, sin embargo, descubrieron que los vasos entraban en contacto con pelo en la zona de la vulva en las hembras

o con el prepucio en los machos. Sólo en algunas ocasiones pudo recogerse toda la orina excretada, y en la mayoría de los casos las muestras se recogieron a la mitad. Sin em-

bargo, algunos estudios han demostrado que las muestras recolectadas a la mitad pueden estar contaminadas con bacterias con origen en la uretra o en las inmediaciones del orificio uretral. En un estudio en el que participaron 32 perros (no se dan datos de la distribución de sexos), las muestras recogidas de 25 perros evidenciaban presencia de bacterias (Klausner *et al.* 1975, Finco & Kern 1977, Carter *et al.* 1978). Esto da lugar a diagnósticos incorrectos de infecciones del tracto urinario (ITU). En un segundo estudio, 15 de 25 perros que no presentaban signos de ITU, mostraban contaminación por bacterias en la orina recolectada a la mitad (Finco & Kern 1977). En otro estudio que incluía 50 perros clínicamente normales (25 machos y 25 hembras), el 85% de las muestras de orina excretadas voluntariamente presentaba contaminación bacteriana (Comer & Ling 1981). La orina de las hembras mostraba un porcentaje mayor de contaminación por bacterias (91%).

Cistocentesis

Se ha utilizado la cistocentesis (Carter *et al.* 1978) para recolectar orina de perros. Primero se sedó a los perros con acepromacina (Ayerst Laboratories, New York, NY, EE.UU.) Se eliminó el pelo en un área entre la línea media y el flanco y se esterilizó con alcohol, jabón y solución yodada. Primero se inmovilizó la vejiga mediante palpación digital, y después se tomó una muestra de 5 ml. utilizando una jeringa con una aguja de 3,25 cm. y calibre 22G. Durante la ovariectomía, las muestras se aspiraron de la vejiga mediante exposición por laparotomía.

Se demostró que las muestras de orina de perro obtenidas mediante cistocentesis eran bacteriológicamente estériles (Klausner *et al.* 1975, Finco & Kern 1977, Carter *et al.* 1978). En un estudio en el que participaban 50 perros clínicamente normales (25 machos y 25 hembras), las muestras de orina obtenidas resultaron bacteriológicamente estériles.

Cateterización

Varios grupos han utilizado la cateterización para recoger orina de perros (Carter *et al.* 1978, Mulcahy *et al.* 1978, Russel *et al.* 1987).

Se han utilizado catéteres de plástico estériles y lubricados con gel (Lubafax, Burroughs Wellcome Co. Research Triangle Park, NC, EE.UU.) para recolectar muestras de orina de perros. El final del pene en los machos o la región perivulvar en las hembras se limpió con una gasa impregnada con solución yodada orgánica y posteriormente se secó la zona. Se desecharon los primeros 5 ml. de orina extraídos a través del catéter, tanto en machos como en hembras, y se utilizó una nueva jeringa para extraer muestras para cultivo bacteriológico.

Mulcahy *et al.* (1978) implantaron una cánula de cistostomía permanente en la vejiga urinaria para recolectar orina durante periodos de tiempo prolongados en perros conscientes. La implantación de la cánula se llevó a cabo mediante simple cistostomía en las hembras, lo que no era posible en los machos, ya que el pene está localizado en el lugar de la cistostomía. Se demostró que al principio los perros intentaban retirar la cánula con los dientes y las patas. Sin embargo, como los enganches de la cánula están cubiertos con tapas sujetas con tornillos de acero inoxidable, pronto se dan cuenta de que son imposibles de quitar. Toda la orina gravita directamente hacia la cánula, con el animal en posición erecta, y sale de la vejiga de forma inmediata. La irrigación de la vejiga para retirar toda la orina es por tanto innecesaria, lo que es muy útil cuando deben obtenerse volúmenes exactos de orina para determinar la osmolalidad.

Se ha descrito un procedimiento que permite cateterizaciones múltiples utilizando una abertura intestinal (Finkle *et al.* 1961) para perros que han sido sometidos a ureterosigmoidostomía. Es un procedimiento por el que se implanta el uréter en el colon sigmoide, lo que resulta en la desviación de la orina al intestino. Se lleva a cabo como consecuencia de una enfermedad en la vejiga o cistocentesis. La recolección de orina de estos animales presenta un serio problema, ya que la orina estará contaminada con heces. Se fabricó un "ventanal intestinal" (DuPont) para evitar este problema (Finkle *et al.* 1961). El ventanal se instalaba quirúrgicamente en el colon sigmoide. Tras varios procedimientos quirúrgicos, se colocó un catéter uretral de seda de 4 French en el uré-

ter, hasta que apareció orina limpia. En torno al ventanal tuvieron lugar pequeñas fugas ocasionales, y se encontró infección de bajo grado. Estas cateterizaciones a menudo originaban pielonefritis. A pesar de estos problemas, los investigadores han comprobado que muchos de sus animales de experimentación sobrevivieron más de 100 días después de la operación, después de numerosas cateterizaciones ureterales.

Los catéteres internos urinarios permanentes han demostrado causar ITUs en gatos y perros (Barsanti *et al.* 1985) y se demostró que el riesgo de infección aumentaba con la duración de la cateterización. Esta infección asociada al catéter tiene lugar incluso bajo terapia con antibióticos.

La cateterización en sí misma no es un procedimiento aséptico, a pesar de que el orificio se limpie a conciencia antes de la inserción del catéter. Las uretras de los perros macho y hembra tienen poblaciones de bacterias, muchas de las cuales son potencialmente patógenas. La contaminación con estas bacterias podría llevar a resultados erróneos. Además, la cateterización de la vejiga en humanos se ha relacionado con ITU. En estudios separados se ha descubierto que las muestras de orina obtenidas por cateterización eran positivas en los cultivos bacterianos (Klausner *et al.* 1975, Finko & Kern 1977, Carter *et al.* 1978, Biertuempfel *et al.* 1981, Comer & Ling 1981). Se ha demostrado que la cateterización de la vejiga en humanos causa ITU por la contaminación y consecuente colonización de la mucosa de la vejiga con bacterias procedentes de la uretra (Biertuempfel *et al.* 1981).

El perro se ha asociado con el hombre durante mucho tiempo, y es uno de los animales domésticos más antiguos. Tiene un estatus especial entre las personas y a menudo es considerado como un miembro más de la familia. Por lo tanto, cuando se utiliza a un perro para experimentación, recibe protección especial en varios países. En el Reino Unido, por ejemplo, debe darse una justificación especial antes de que los perros puedan participar en un estudio que implique dolor, estrés o sufrimiento. Los perros son animales inquisitivos y reaccionarán mal a entornos inhóspitos o sensorialmente

restringidos. Está firmemente establecido que los alojamientos que no satisfacen las necesidades físicas o sociales de un animal llevan a alteraciones en la fisiología y el comportamiento, lo que termina por influir en los datos de la investigación. Por lo tanto el diseño de un alojamiento para perros debe (a) mantener al animal en un buen estado de salud mental y física, (b) permitir el fácil manejo del perro por parte del personal, (c) ser lo suficientemente amplio como para permitir el alojamiento de grupos o perros compatibles, (d) ser flexible, para poder combinar corrales y obtener espacios más amplios, (e) permitir la elección del emplazamiento y proporcionar intereses dentro del redil, (f) proporcionar algún tipo de refugio respecto de otros perros mediante el uso de barreras visuales y (g) minimizar la emisión de ruidos mediante sistemas de insonorización. (Hubrecht 2002).

Recolección de orina en aves

La recolección de orina en aves es útil para la identificación de microorganismos como parásitos, bacterias, hongos o virus. También es valiosa para la identificación de metabolitos de fármacos, esteroides sexuales, procesos patológicos (hematuria, hematoquecia) y toxinas (Greiner & Ritchie 1994, Arnold & Holt 1996, Hagedorn *et al.* 1997).

La recolección de orina en aves de corral presenta un problema peculiar, ya que la orina pasa de los uréteres a la cloaca, donde se mezcla con las heces. Se han utilizado una serie de métodos diferentes para separar la orina de las heces. Cuando se obtiene una deposición sobre una superficie limpia y no porosa, la orina puede separarse cuidadosamente de las heces. Se ha utilizado la acción capilar de un tubo de microhematocrito o la aspiración con una aguja y jeringa para recoger la orina, dejando atrás las heces (Murray 1997, Styles & Phalen 1998).

Se han empleado métodos no quirúrgicos de recolección de orina mediante la inserción de un embudo en el urodeo (Davis 1927, Coulson & Hughes 1930), y Hester *et al.* (1940) han empleado la canulación de los uréteres. Las técnicas del catéter (embudo) y la cánula facilitan la recolección de orina sólo durante

periodos de tiempo limitados. Hart y Essex (1942) y más tarde Ainsworth (1965) han descrito la exteriorización de las aberturas ureterales, lo que requiere incisiones y suturas. También requiere que el pájaro lleve un arnés para facilitar la recolección de orina y/o heces. Hart y Essex (1942) describían la construcción de un ano externo, que podía utilizarse sólo durante 2 ó 3 semanas.

La cantidad y la calidad de la orina excretada por pájaros ha sido vital para trabajar en otros problemas relacionados con la fisiología renal de las aves. Los estudios en estos pájaros no han sido muy sistemáticos. Hester *et al.* (1940) estudiaron la excreción en el pollo para llegar a un conocimiento exhaustivo del volumen diario y el carácter de la orina secretada por los pájaros, bajo una serie de condiciones. Llevaron a cabo tres series de experimentos: (a) canulaban los uréteres bajo anestesia local y observaban el efecto de ciertos diuréticos y otros fármacos; (b) la orina, libre de material fecal, se recogía mediante la inserción de un pequeño embudo con diámetro suficiente como para incluir los dos orificios ureterales del urodeo y (c) la exteriorización de los orificios ureterales mediante una operación permitió la recolección de orina bajo condiciones casi normales.

Los siguientes son dos métodos quirúrgicos clásicos utilizados para recoger orina de aves de corral.

(a) Separación de orina y heces en gallos jóvenes

Colvin *et al.* (1966) describieron un método quirúrgico que sorteaba muchas de las desventajas de métodos anteriores. Gallos jóvenes White-Leghorn (9 semanas de edad) permanecieron en ayunas durante 8 horas para asegurar que todas las heces fueran eliminadas de la parte inferior del intestino. Tras la anestesia, se eliminaron las plumas en torno al orificio de la cloaca. Se practicó una incisión perpendicular a la línea media y aproximadamente un centímetro por delante del orificio anal. La porción distal del recto se extrajo por la abertura de la incisión, y se cerró la cloaca mediante una sutura de seda tan cerca del esfínter rectal como fue posible. El recto fue entonces

amputado proximal a la sutura. En ese momento se espolvorearon unos miligramos de sulfatiazol en polvo en la cavidad a través de la incisión. Se cortó un cuentagotas flexible de goma con una longitud de aproximadamente 2,5 cm., y el extremo cortado se insertó 1,5 cm. en el recto. El tubo se suturó entonces al recto mediante seis puntos de sutura cerca del final del extremo insertado. La mucosa se unió a la superficie de la piel en torno a la incisión mediante suturas de seda y se espolvoreó con sulfatiazol. Un tubo como el descrito con anterioridad se insertó en la cloaca unos 0,75 cm., para no bloquear los orificios ureterales. El tubo se unió entonces a los labios dorsal y ventral de la cloaca mediante seis puntos de seda.

Para recoger muestras de orina o heces, se ataron con tiras de nylon globos de un tamaño adecuado en torno al extremo de los cuentagotas que sobresalía del orificio de la cloaca y del ano artificial. Los pájaros tratados quirúrgicamente no requirieron casi atención postoperatoria y podían moverse libremente en 1-2 horas, y recibir agua y alimento de forma inmediata. Los autores descubrieron que era necesario esperar unos 3 días antes de poner a los pájaros en tratamiento experimental para asegurar que la diuresis observada por Hester *et al.* (1940) y Hart y Essex (1942) se había superado y que las suturas mantenían a los tubos en su lugar. Los autores observaron obstrucción recurrente de los tubos en aproximadamente el 10% de los pájaros, porcentaje de los mismos que fue descartado. Utilizando tubos de extrusión plásticos, los globos de recolección podían colocarse y retirarse fácilmente, sin la incomodidad del arnés para el pájaro, evitándose además la contaminación de la orina por las heces.

(b) Recolección de orina de pollos

Como se ha dicho anteriormente, la recolección en aves de muestras de orina no contaminada es difícil porque la orina de los pájaros fluye desde el uréter hasta la cloaca, donde puede mezclarse libremente con la materia fecal. Varios investigadores inventaron en el pasado una serie de métodos para obtener orina aviar libre de impurezas. Minowski (1886) evitó la contaminación fecal en la orina

de oca ligando el recto por encima de la cloaca. Milroy (1903) sugiere que este método no funciona correctamente, e intentó obtener orina no contaminada utilizando un tubo especialmente diseñado para desviar las heces de la porción del aparato que excreta la orina. Ya que de este modo no podía evitarse la contaminación fecal, separó la cloaca y el recto mediante una operación. Construyó un ano artificial en la pared abdominal exterior y la orina se recogió en una bolsa adecuada unida por debajo del orificio anal durante un periodo de hasta 24 horas (el volumen durante este tiempo variaba entre 500 y 1500 ml.). Paton (1910) hizo un ano artificial como el que desarrolló Milroy, pero en lugar de recolectar la orina en una bolsa, lo hizo en una jaula metabólica. Paton afirma en su trabajo que la cantidad de orina de 24 horas no podía medirse de forma exacta, ya que los pájaros vertían parte del agua de beber en ella. Sharpe (1912) anestesió gallinas con uretano o éter y obtuvo una producción de orina de 0,69 ml/min. de una media de siete experimentos. Davis (1927) recogió orina mediante un catéter insertado en el urodeo de forma que la orina salía al exterior tan pronto como era excretada por los orificios ureterales. En ocasiones insertó tapones de algodón en el recto para evitar la contaminación fecal. Descubrió que podía obtener más orina bajo anestesia ya que, sin anestesia, la orina estaba tan concentrada que los sólidos precipitaban y obstruían el catéter.

Recolección de orina de "mini-pigs"

Las razas de cerdos enanos, así como variedades de granja, se han utilizado mucho en laboratorios. Los cerdos enanos vietnamitas también se han convertido en mascotas comunes tanto en hogares urbanos como rurales, y como consecuencia la necesidad de proporcionar cuidados a estos animales se ha visto en aumento.

Como mascotas, los cerdos enanos están muy bien domesticados, por lo que hay que llevarlos al exterior para obtener una muestra de orina mediante micción voluntaria (Van Metre & Angelos 1999). Ya que estos animales son muy veloces y ágiles, pueden ser difíciles

de atrapar si huyen, por lo que es esencial ponerles un arnés y una correa. Las muestras de orina son más fáciles de obtener de las hembras que de los machos. El abdomen abombado de estos cerdos hace que sea difícil recoger orina de los machos. Se ha recogido orina de estos animales utilizando la tapa de una funda de jeringuilla de 60 ml. atada a una percha estirada como dispositivo para recoger orina. La tapa se deslizó bajo el abdomen del cerdo cuando comenzó la micción para obtener una muestra.

Ha resultado difícil cateterizar la vejiga de los cerdos enanos macho debido a la presencia del hueco uretral (un pequeño hueco en el lumen uretral localizado en el aspecto dorsal del segmento pélvico de la uretra, a la altura del isquion). A medida que el catéter avanza por la uretra tiende a alojarse en el hueco. El veterinario ha sido capaz, no obstante, de dirigir el catéter a la vejiga introduciendo un dedo en el recto del cerdo y empujando suavemente el catéter ventral y cranealmente (Van Metre & Angelos 1999).

Los cerdos deben mantenerse adecuadamente y ser manipulados con cuidado para obtener datos de investigación fiables, ya que son animales notablemente sensibles. Hay que asegurarse de proporcionar a los cerdos fibra en forma de cascarillas de avena y paja, para que puedan llevar a cabo sus actividades de forrajeo y llenar su intestino. Un suelo de hormigón puede producir irritación e inflamación de las patas y articulaciones, por lo que los animales deben mantenerse en suelos de paja. Los cerdos son de naturaleza sociable, por lo que deben alojarse con parejas compatibles, así como recibir un trato humano positivo en sus rediles de forma habitual. Poner una radio con variedad de música y voces ha demostrado ser útil para que los cerdos se acostumbren a los humanos. Cuando se aísla a un cerdo para obtener muestras o se le utiliza para un procedimiento experimental, debe llevarse con él a otro cerdo que le resulte familiar, lo que evitará que se sientan angustiados o agitados cuando se les separe de sus compañeros de piara (Grandin 2002).

Recolección de orina de animales de mayor tamaño

Existen establos metabólicos para alojar a ganado, ovejas, cabras y cerdos y recoger muestras de orina y heces separadamente. Los hay que utilizan rejillas, pantallas y embudos para separar heces y orina, y son eficientes para muchos usos, además de fáciles de usar. Sin embargo, en estos establos existe contaminación cruzada de diferente nivel. Para minimizar o eliminar la contaminación cruzada se han desarrollado otros sistemas, como catéteres internos y aparatos unidos a los animales mediante arneses. No obstante, estos métodos a veces causan incomodidad o infecciones de orina a los animales, o el aparato no permanece en su sitio para recolectar orina durante un periodo de tiempo amplio (Aschbacher 1970).

Recolección de orina en machos de oveja, cabra, vaca y cerdo.

Paulson y Cottrell (1984) construyeron un sencillo aparato para recolectar orina de estos animales que evitaba todos estos problemas. Estaba hecho de tela elástica e impermeable, velcro y una bolsa impermeable. Era ligero, se ajustaba fácilmente al animal y no le causaba incomodidad aparente, y servía para periodos de recolección prolongados.

Recolección en hembras de ungulados

Para determinar las respuestas fisiológicas de los animales frente a cambios en una serie de estímulos ambientales, tales como la temperatura ambiente, niveles de energía y nutrientes y disponibilidad de agua, son importantes los estudios metabólicos con rumiantes. Estos estudios normalmente requieren la medición del alimento disponible, y la separación y cuantificación de orina y heces producidos por cada individuo. La recolección total de orina y heces resulta difícil en las vacas hembras y los bisontes debido a la proximidad del meato urinario y la región isquiorrectal, que causa la contaminación cruzada de las muestras. En consecuencia, los estudios metabólicos a menudo utilizan machos por la evidente facilidad que supone separar y recoger la orina y las heces. En el caso de

que sea necesaria la recolección del total de la orina de rumiantes hembras, la técnica más utilizada es la cateterización de la vejiga. Sin embargo, los catéteres presentan problemas especiales como la dificultad de su inserción, infecciones secundarias de vejiga y a menudo pérdidas sustanciales de orina. Deliberto y Urness (1995) desarrollaron un aparato para la recogida de orina que tomaba como modelo el alerón deflector de orina creado por Kartchner y Rittenhouse (1979) para las bolsas de recolección fecal. Este método también fue diseñado para recoger orina sin el alerón deflector (Tabla 2).

Recolección de orina de equinos

La recolección de orina de caballo está limitada a la micción libre y a la cateterización. La cistocentesis no es práctica debido al tamaño del caballo y a la posición intrapélvica de la vejiga equina.

La recolección de orina en equinos a menudo forma una parte integral en los estudios sobre el balance del agua (Groenendyk *et al.* 1988) y la función renal (Rawlings & Bisgard 1975, Lane & Merritt 1983, Kohn & Strasser 1986) en muchos centros de investigación. Los estudios sobre la homeostasis del agua en equinos se llevan a cabo normalmente en establos metabólicos equipados con recipientes en el suelo para simplificar la recolección de muestras de orina libres. Se han descrito varios modelos de un aparato para recoger orina de caballos macho, suspendido bajo el pene mediante un arnés (Van der Noot *et al.* 1965, Tasker 1966, Harris 1988). Sólo uno de ellos (Harris 1988) describe un aparato de recolección no invasivo que puede utilizarse con yeguas. En estudios que conciernen a la eliminación renal de electrolitos (Rawlings & Bisgard 1975, Lane & Merritt 1983, Gronwall & Price 1985, Glade 1986, Kohn & Strasser 1986) se ha recolectado orina de yeguas utilizando catéteres internos de vejiga. Estas investigaciones consisten en introducir un catéter de Foley (28 ó 32 French) de forma aséptica en la vejiga y mantenerlo en su lugar inflando el globo con 30 ml. de aire o agua. La orina fluía bien de forma continua desde la vejiga hasta un

recipiente recolector, o bien de forma intermitente cada dos horas a través del catéter (Kohn & Strasser 1986). Este método presenta el inconveniente de la infección bacteriana, ya que un estudio demostraba que 3 de cada 13 caballos presentaban infección al final del periodo de prueba de 12 horas (Rawlings & Bisgard 1975).

Otro método (Van den Berg 1996) para recolectar orina de yeguas utilizaba un dispositivo hecho de goma en forma de falda. El dispositivo se curvaba en forma de tobogán mediante metal maleable dispuesto por fuera de la goma. Utilizando tiras de cuero, se ataba el aparato a un arnés de forma que el extremo proximal del tobogán tocara la zona de la mitad de la vulva. El extremo libre del tobogán se conectaba entonces a un embudo recolector, entre las patas traseras, suspendido delante de las mismas. Este dispositivo se utilizaba para recoger orina de yeguas de forma rutinaria, segura y fácil.

Recolección de orina de primates no humanos

Algunos de los primates no humanos utilizados en la investigación son los lémures naranjas (*Microcebus murinus*), mono nocturno (*Aotus trivirgatus*), mono tití (*Callithrix jacchus*), mono ardilla (*Saimiri sciureus*), mono capuchino (*Cebus apella*), macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), macaco cynomolgus, (macaco cangrejero) (*Macaca fascicularis*), Cercopiteco Verde (*Cercopithecus aethiops*), los babuinos (*Papio* spp.), *Macaca radiata*, *Macaca nemestrina* y los chimpancés (*Pan troglodytes*) (Reinhardt & Reinhardt 2002).

Antes de hacer pruebas clínicas controladas con pacientes humanos o voluntarios, se evalúa la seguridad preclínica de los nuevos fármacos en un roedor y en un no roedor ("segunda" especie). Los primates no humanos suelen utilizarse en la evaluación de seguridad de fármacos putativos para los que otras especies de no roedores (por ejemplo, perros) han demostrado ser un modelo que da menos pistas sobre la respuesta humana, debido a las similitudes entre las respuestas cinéticas, metabólicas y farmacológicas, reacciones idiosincrásicas o falta de respuesta biológica. El mono tití (*Callitrix jacchus*) se ha utilizado

en estudios de evaluación preclínica de seguridad durante más de una década. Como especie de roedor se han utilizado ratas en la mayoría de los casos, y los perros o los primates no humanos [(macacos, normalmente macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) o Rhesus (*Macaca mulatta*)] se utilizan para estudios preclínicos de toxicología.

Muchos primatólogos tienen miedo de los primates no humanos, por lo que aprueban las limitaciones impuestas a estos animales durante los procedimientos que requieren cualquier tipo de interacción física entre los humanos y los primates no humanos. Se utilizan arneses para inmovilizar al animal y empujarle a la parte delantera de la jaula durante la recolección de muestras de sangre u orina. Además, durante la toma de muestras se emplean estructuras limitadoras ajustables con paneles en guillotina. Estos procedimientos de limitación forzosa generan variables fisiológicas relacionadas con el estrés que pueden llevar a errores en los resultados de la investigación. Este sufrimiento se incrementa al estar separados del entorno familiar de su jaula. El British Code of Practice for the Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures (Código británico de prácticas para el alojamiento y cuidado de los animales utilizados en procedimientos científicos) (1989) señala que el adiestramiento del primate no humano para que coopere durante estos procedimientos es el método que menos les hace sufrir.

Recolección de orina de monos tití y tamarinos

Hearn *et al.* (1975) describieron un sistema para la inmovilización y toma de muestras de sangre y orina de estos animales. En su método, se trasladaba al mono tití a una jaula metabólica para ratas durante un periodo de 24 horas. En el embudo de la jaula se separaba automáticamente la orina del material fecal y pasaba por un brazo lateral a un contenedor desechable de plástico sumergido en hielo.

La administración de materiales radiomarcados para estudios metabólicos no podía realizarse utilizando este método, ya que el volumen de la jaula era demasiado pequeño para que el animal pudiese permanecer en él

más de 24 horas. Los estudios metabólicos estipulaban que el animal debía permanecer en la jaula hasta que los materiales radiomarcados fuesen eliminados en la orina y las heces. Lunn (1989) modificó el método de Hearn *et al.* para que esto fuera posible. Modificó una jaula metabólica modelo Metabowl III (Jencons Scientific Ltd, Leighton Buzzard, Bedfordshire, Reino Unido) para incrementar su altura, añadiendo un cilindro de acero inoxidable. Además, incluyó un comedero de acero inoxidable en lugar del comedero estándar y desplazó el bebedero hacia el interior de la jaula para mejorar su accesibilidad. Se mantuvo a los animales en la jaula Metabowl hasta 5 días seguidos sin ningún efecto perjudicial aparente.

En otro método, se familiarizó a grupos de monos tití con un aparato para la recolección de orina hecho a mano como prolongación del habitáculo en el que se les alojaba (Anzenberger & Gossweiler 1993), y poco a poco se les acostumbró a orinar cuando se apagaban las luces a cambio de una recompensa en forma de alimento. Los experimentadores descubrieron que, después de 3 semanas de entrenamiento, podían recolectar muestras de orina individuales de una familia completa de 4-16 animales.

Se acostumbró a tamarinos (*Saguinus* sp.) hembra alojadas en grupo a orinar en contenedores poco después de despertarse por la mañana a cambio de una recompensa en forma de comida, sin necesidad de un protocolo de entrenamiento ni de invertir tiempo extra (Snowdon *et al.* 1985).

Recolección de orina de macacos

López-Anaya *et al.* (1990) han empleado un sencillo método para recoger orina de crías de macaco (*Macaca nemestrina*) sin imponerles limitaciones. Han adaptado un método con pañales, utilizado en medicina pediátrica, para la recolección del total de la orina para uso en estudios de farmacocinética. Se elaboró un pañal utilizando espuma de celulosa, láminas de polietileno y velcro. Primero, se cortó una tira de celulosa con forma de pañal. La parte que iba a situarse sobre los genitales se hizo cosiendo dos capas de celulosa para maximizar

la capacidad de absorción de orina. La capa de celulosa se colocó dentro de un sobre de polietileno, ligeramente mayor pero con la misma forma. La parte de celulosa de una sola capa se aseguró entre las capas de polietileno con cinta aislante, para evitar la contaminación de orina y heces. Además, se añadió un orificio para la cola. Tiras de velcro a lo largo de los extremos del pañal lo mantenían en su sitio cuando se le colocaba a las crías de macaco. Pesando el pañal antes y después de su uso, los autores pudieron calcular el volumen de orina obtenido (suponiendo la unidad como gravedad específica de la orina). Escurrieron el pañal para obtener alicuotas de orina para análisis posteriores. La celulosa podía contener 20 veces su peso en agua, lo que permitía la recolección de orina durante un largo periodo de tiempo. En algunos casos, se encontró una pequeña cantidad de material fecal en la celulosa. Sin embargo, no se mezclaba de forma significativa con la orina, lo que se deducía de la estabilidad de uno de los metabolitos estudiados.

Un grupo japonés (Hayakawa & Takenaka 1999) recogió orina de macacos japoneses (*Macaca fuscata*) alojados individualmente, colocando bajo sus jaulas una cubeta cubierta con una malla. Se recogieron las muestras de orina de la cubeta con una pipeta de plástico desechable. Se obtuvieron volúmenes de orina que iban desde los 0,02 (cría de macaco) a los 14 ml.

Recolección de muestras de cercopitecos verdes y chimpancés

Se ha demostrado que entrenar a los primates no humanos para que cooperen durante procedimientos experimentales es una de las mejores opciones, utilizando el alimento como motivación positiva. Kelley y Bramblett (1981) entrenaron a *Cercopithecus aethiops* machos para orinar en un vaso de precipitados cuando se les pidiera, recibiendo cacahuetes como recompensa. Durante este procedimiento no se separaba a los animales del grupo social. Se encontró que seis de ocho machos proporcionaban muestras de orina de forma predecible después de un periodo de entrenamiento de 2 meses.

Stone *et al.* (1996) entrenaron a 19 chimpancés hembra alojadas en grupo para que cooperasen en la recogida de muestras de orina. Descubrieron que el tiempo medio de entrenamiento para llegar a un comportamiento satisfactorio era de 237 minutos.

El sistema más utilizado para albergar primates no humanos se resume a continuación (Comisión Europea 2002):

(a) *Alojamiento individual en una sola jaula con las siguientes especificaciones*

La jaula debe reducir el riesgo de transmisión de enfermedades entre animales, y debe ser salubre y poder limpiarse con facilidad.

(b) *Jaulas para parejas y jaulas conectadas para dos primates o un pequeño grupo de animales*

Este sistema de enjaulado debe alojar de forma permanente parejas compatibles de primates no humanos, y permitir el contacto físico entre los animales uniendo jaulas adyacentes. Este sistema permite la separación temporal de animales cuando se llevan a cabo tomas de muestras o procedimientos experimentales.

(c) *Rediles para el alojamiento en grupo* Estas son jaulas grandes, habitáculos o corrales limitados por vallas, paredes, barrotes o tela metálica, y se utilizan generalmente para alojar a grupos de animales. En este caso pueden ser necesarios procedimientos de captura especiales, descritos por Reinhardt y Reinhardt (2009), en el momento de la toma de muestras.

(d) *Recintos interiores-exteriores* En este caso un área exterior está conectada a un espacio interior climatizado, donde los animales pueden encontrar protección frente a las inclemencias del tiempo y buscar refugio frente a amenazas y ataques.

Un alojamiento confortable para los primates no humanos es tan importante como en el caso de otros animales, para asegurar su bienestar y, en consecuencia, la calidad de las investigaciones que se realizan con ellos. Se ha descubierto que la compañía social es una necesidad, en el mismo grado que el alimento. Se ha comprobado que es muy efectivo alojar a los animales por parejas desde una edad temprana. La compañía sirve para amortiguar el estrés en situaciones angustiosas

como experimentos que requieren que los animales sean inmovilizados en una silla o atados. Cuando debe aislarse a los animales de forma temporal, como durante un estudio metabólico, la disposición de la jaula debe asegurar el contacto visual del animal con al menos otro congénere para reducir el estrés de la falta de socialización (Reinhardt 2002). Además, el entorno confortable tanto física como psicológicamente que se proporciona al animal tiene un importante papel en la obtención de resultados fiables. Se ha demostrado que es esencial una relación de confianza con el personal, además de cuidados compasivos. Una persona con actitud agresiva ha demostrado producir reacciones de intranquilidad en el animal que han derivado en resultados experimentales inexactos (Reinhardt 2002). Se ha afirmado con acierto que “el comportamiento de un animal durante un procedimiento depende de la confianza que tenga en su cuidador” y que “esta confianza se desarrolla mediante contacto humano habitual que, una vez establecido, debe prolongarse” (Ministerio del Interior de Reino Unido, 1989). Este sentimiento es comparado por el Consejo Nacional de Investigación de EE.UU. (1998). Muchos primates tienen la capacidad de aprender a interactuar con un cuidador de forma cooperativa, haciendo posible enseñarles tareas simples como presentarse voluntariamente para que se les tomen muestras de orina o sangre. Este tipo de entrenamiento con motivación positiva permite a los primates convertirse en “compañeros” en lugar de en “víctimas” de la investigación.

Conclusión

Las muestras fiables de orina pura de animales de experimentación son muy difíciles de conseguir, sobre todo de los roedores pequeños. La recolección de orina en condiciones de microgravedad es una tarea prácticamente imposible. Los numerosos métodos para la recolección de orina animal con fines experimentales aquí descritos deberían ayudar al lector a comprender mejor lo intrincado y caprichoso de la obtención de orina pura y sin contaminar.

Algunos de los métodos descritos para la recolección de orina en roedores son la micción voluntaria, métodos quirúrgicos, y requerimientos especiales de las jaulas y los modos de limitación.

El tiempo empleado y volúmenes recogidos varían según los diferentes métodos. De todos los métodos que hemos descrito, sólo encontramos uno que no utilizase ningún tipo de intervención para recoger orina de roedores (Kurien & Scofield 1999). Mediante este método, la orina podía recogerse rápidamente y sin ningún tipo de contaminación. Se han descrito ingeniosos métodos para la recolección de orina de animales de mayor tamaño, que incluyen la cistocentesis y la cateterización. Todos estos métodos han jugado un papel decisivo en la obtención de orina pura para estudios cualitativos y cuantitativos.

Muchos de los métodos que se han descrito aquí, no obstante, no toman las precauciones necesarias para proporcionar un cuidado animal adecuado. Ya que los resultados experimentales que se obtengan de estos animales de investigación dependen, en gran medida, de su bienestar, es de vital importancia mantenerlos en un entorno lo más natural posible. Además, debe mostrarse siempre compasión y proporcionar un cuidado adecuado a todos los animales, ya sean roedores, canes o primates no humanos.

Debe reducirse el dolor y el sufrimiento de los animales en la mayor medida posible. Por ejemplo, la cistocentesis deberá utilizarse sólo como último recurso cuando la orina estéril sea absolutamente necesaria. El método de la micción libre debe ser el preferido para estudios cualitativos que se llevan a cabo puntualmente. En general, desde un punto de vista experimental debería considerarse el método de la micción libre como una práctica estándar para recoger orina de roedores, conejos, canes, cerdos enanos y primates no humanos. Para animales más grandes debería utilizarse una combinación de cateterización y/o jaulas metabólicas (por ejemplo para el ganado).

Existen relativamente pocas especies de laboratorio con las que no se pueda utilizar una jaula metabólica en la recolección de orina. Puede que sean necesarias algunas modificaciones en el diseño general para acomodar especies con requerimientos especiales, pero la idea fundamental es evitar la contaminación de las muestras de orina con restos de comida, agua y/o heces. Las jaulas pueden modificarse para albergar animales canulados, o incluso aquellos que están expuestos a una atmósfera experimental, o a los que se está tomando muestras del aire expirado. Existen relativamente pocos casos en los que la orina no pueda recogerse.

La forma más eficiente de proceder para obtener muestras de orina pura, que generen datos de investigación fiables, consiste en una mejora constante en las técnicas para la recolección de orina de animales para experimentación.

Agradecimientos

Agradecemos a Ms Marilyn Bonham-Leyba y Ms Beverly Hurt del Centro de Recursos Gráficos, OMRF, por su excelente esfuerzo realizando las ilustraciones y diseñando las tablas presentes en este manuscrito.

Este trabajo ha recibido el apoyo de la subvención ARO1844 del NIH al RHS y el Oklahoma Center for the Advancement of Science and Technology, al RHS y BTK.

Referencias

- American Association for Laboratory Animal Science (2001) *Cost of Sharing: Recognizing Human Emotions in the Care of Laboratory Animals*. Memphis, TN: American Association for Laboratory Animal Science
- American Medical Association (1992) *Use of Animals in Biomedical Research—The Challenge and Response*. An American Medical Association White Paper. AMA. Group on Science and Technology, Chicago, IL
- Anzenberger G, Gossweiler H (1993) How to obtain individual urine samples from undisturbed marmoset families. *American Journal of Primatology* **31**, 223–30
- Ainsworth L (1965) Surgical procedure for exteriorization of the ureteral openings of the hen. *Poultry Science* **44**, 1561
- Anderson CO, Denenberg VH, Zarrow MX (1972) Effects of handling and social isolation upon the rabbit's behaviour. *Behaviour* **43**, 165–75
- Arnold JW, Holt P (1996) Cytotoxicity in chicken alimentary secretions as measured by a derivative of the tumor necrosis factor assay. *Poultry Science* **75**, 329–34
- Aschbacher PW (1970) An adjustable metabolic stall for cattle. *Journal of Animal Science* **31**, 741–4
- Barsanti JA, Blue J, Edmunds J (1985) Urinary tract infection due to indwelling bladder catheters in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **187**, 384–8
- Bateson P, Turner DC (1988) Questions about cats. In: *The Domestic Cat: The Biology of its Behavior* (Turner DC, Bateson P, eds). Cambridge: Cambridge University Press, pp 193–201
- Benson KG, Paul-Murphy J (1999) Clinical pathology of the domestic rabbit. Acquisition and interpretation of samples. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice* **2**, 539–51, v. Review

- Biertuempfel PH, Ling GV, Ling GA (1981) Urinary tract infection resulting from catheterization in healthy adult dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **178**, 989–91
- Black WD, Claxton MJ (1979) A simple, reliable and inexpensive method for the collection of rat urine. *Laboratory Animal Science* **29**, 253–4
- Boers K, Gray G, Love J, Mahmutovic Z, McCormick S, Turcotte N, Zhang Y (2002) Comfortable quarters for rabbits in research institutions. In: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals*, 9th edn (Reinhardt V, Reinhardt A, eds). Washington DC: Animal Welfare Institute
- British Codes of Practice for the Housing and Care of Animals used in Scientific Procedures (1989) Home Office Animals (Scientific Procedures) Act 1986. London
- Carter JM, Klausner JS, Osborne CA, Bates FY (1978) Comparison of collection techniques for quantitative urine culture in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **173**, 296–8
- Colvin LB, Creger CR, Couch JR, Ferguson TM, Ansari MN (1966) A simplified method for separation of urine and faeces in the immature fowl. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **123**, 415–17
- Comer KM, Ling GV (1981) Results of urinalysis and bacterial culture of canine urine obtained by antepubic cystocentesis, catheterization, and the midstream voided methods. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **179**, 891–5
- Coulson EJ, Hughes JS (1930) Collection and analysis of chicken urine. *Poultry Science* **10**, 53
- Davis RE (1927) The nitrogenous constituents of hen urine. *Journal of Biological Chemistry* **74**, 509–13
- Deliberto TJ, Urness PJ (1995) A total urine collection apparatus for female bison and cattle. *Journal of Range Management* **48**, 92–3
- Denckla WD (1966) Low temperature urine collector for unstable compounds. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **68**, 173–6
- Denckla WD (1969) Inexpensive low-temperature urine collector. *Journal of Applied Physiology* **26**, 393–4
- Dhein CR (2002) *Small Animal Diagnostic and Therapeutic Techniques. Cystocentesis*. http://www.vetmed.wsu.edu/courses_samDX/cysto.htm
- European Commission (2002) *The Welfare of Non-Human Primates used in Research*. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare
- European Economic Community (1986) Council directive 86/609 on the Approximation of Laws, Regulations, and Administrative Provisions Regarding the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, Annex II Guidelines for Accommodation and Care of Animals. *Official Journal of the European Communities* **L358**, 7–28
- Evans J, Mulenburg GM, Harper JS, Skundberg TL, Navidi M, Arnaud SB (1994) *A Metabolic Cage for the Hindlimb Suspended Rat*. NASA Ames Research Center, pp 1–46
- Ewbank R (1984) Laboratory dogs and cats: Report of the working group. In: *Standards in Laboratory Animal Management*. Potters Bar: The Universities Federation for Animal Welfare, pp 105–6
- Fenske M (1989) Application of a new, simple method for quantitative collection of 24-hour urines in small laboratory animals: determination of basal excretion of proteins, creatinine, urea, electrolytes, and of free steroids. *Zeitschrift für Versuchstierkunde* **32**, 65–70
- Finco DR, Kern A (1977) Pyelonephritis. In: *Current Veterinary Therapy VI* (Kirk RW, ed). Philadelphia: WB Saunders, pp 1106–11
- Finkle AL, Karg SJ, Smith DR (1961) Bowel-window collection of urine after ureterosigmoidostomy in dogs. *Journal of Applied Physiology* **16**, 752–5
- Frape DL, Wilkinson J, Chubb LG (1970) A simplified metabolism cage and tail cup for young rats. *Laboratory Animals* **4**, 67–73
- Garvey JS, Aalseth BL (1971) Urine collection from newborn rabbits. *Laboratory Animal Science* **21**, 739
- Glade MJ (1986) Estimation of urinary flow rate in weanling and yearling horses. *American Journal of Veterinary Research* **47**, 2151–4
- Grandin T (2002) Comfortable quarters for pigs in research institutions. In: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals*, 9th edn (Reinhardt V, Reinhardt A, eds). Washington DC: Animal Welfare Institute
- Greiner EC, Ritchie BW (1994) Parasites. In: *Avian Medicine: Principles and Application* (Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR, eds). Lake Worth, FL: Wingers Publishing, pp 1007–29
- Groenendyk S, English PB, Abetz I (1988) External balance of water and electrolytes in the horse. *Equine Veterinary Journal* **20**, 189–93
- Gronwall R, Price G (1985) Estimation of urine flow rate in mares. *American Journal of Veterinary Research* **46**, 1107–10
- Hagedorn HW, Zankl H, Grund C, Schulz R (1997) Excretion of the anabolic steroid boldenone by racing pigeons. *American Journal of Veterinary Research* **58**, 224–7
- Harned BK, Cunningham RW, Gill ER (1949) A metabolism cage for small animals. *Science* **109**, 489–90
- Harper JS, Mulenburg GM, Evans J, Navidi M, Wolinsky I, Arnaud SB (1994) Metabolism cages for a space flight model in the rat. *Laboratory Animal Science* **44**, 645–7
- Harris P (1988) Collection of urine. *Equine Veterinary Journal* **20**, 86–8
- Hart WM, Essex HE (1942) Water metabolism of the chicken (*Gallus domesticus*) with special reference to the role of the cloaca. *American Journal of Physiology* **136**, 657–68

- Hayashi S, Sakaguchi T (1975) Capillary tube analysis of small animals. *Laboratory Animal Science* **25**, 782–3
- Hayakawa S, Takenaka O (1999) Urine as another potential source for template DNA in polymerase chain reaction (PCR). *American Journal of Primatology* **48**, 299–304
- Hearn JP, Lunn SF, Burden FJ, Pilcher MM (1975) Management of marmosets for biomedical research. *Laboratory Animals* **9**, 125–34
- Hester HR, Essex HE, Mann FC (1940) Secretion of urine in the chicken (*Gallus domesticus*). *American Journal of Physiology* **128**, 592
- Home Office (1989) Code of practice for the housing and care of animals used in scientific procedures. In: *Animals (Scientific procedures) Act 1986*. Her Majesty's Stationery Office, London, UK
- Hubrecht R (2002) Comfortable quarters for cats in research institutions. In: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals*, 9th edn (Reinhardt V, Reinhardt A, eds). Washington DC: Animal Welfare Institute
- Hughes BO, Black AJ (1976) The influence of handling on egg production, egg shell quality and avoidance behaviour of hens. *British Poultry Science* **17**, 135–44
- Jackson AJ, Sutherland JC (1984) Novel device for quantitatively collecting small volumes of urine from laboratory rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **73**, 816–18
- Jennings M, Batchelor GR, Brain PF, Dick A, Elliot H, Francis RJ, Hubrecht RC, Hurst JL, Morton DB, Peters AG, Raymond R, Sales GD, Sherwin CM, West C (1998) Refining rodent husbandry: the mouse. Report of the Rodent Refinement Working Party. *Laboratory Animals* **32**, 233–59
- Jezierski TA, Konecka AM (1996) Handling and rearing results in young rabbits. *Applied Animal Behaviour Science* **46**, 243–50
- Jones RB, Dilks RA, Nowell NW (1973) A method for the collection of individual mouse urine. *Physiology and Behavior* **10**, 163–4
- Kartchner RJ, Rittenhouse LR (1979) A faeces-urine separator for making total fecal collections from the female bovine. *Journal of Range Management* **32**, 404–5
- Kelley TM, Bramblett CA (1981) Urine collection from vervet monkeys by instrumental conditioning. *American Journal of Primatology* **1**, 95–7
- Khosho FK, Kaufmann RC, Amankwah KS (1985) A simple and efficient method for obtaining urine samples from rats. *Laboratory Animal Science* **35**, 513–14
- Klausner JS, Osborne CA, Hilgren J, et al. (1975) The interpretation and misinterpretation of bacteriuria. *Minnesota Veterinarian* **15**, 43–7
- Kohn CW, Strasser SL (1986) 24-hour renal clearance and excretion of endogenous substances in the mare. *American Journal of Veterinary Research* **47**, 1332–7
- Kruger JM, Osborne CA, Ulrich LK (1996) Cystocentesis. Diagnostic and therapeutic considerations. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* **26**, 353–61
- Kurien BT, Scofield RH (1999) Mouse urine collection using clear plastic wrap. *Laboratory Animals* **33**, 83–6
- Lane VM, Merritt AM (1983) Reliability of single sample phosphorus fractional excretion determination as a measure of daily phosphorus renal clearance in equids. *American Journal of Veterinary Research* **44**, 500–2
- Lartigue CW, Driscoll TB, Johnson PC (1978) Low-temperature urine collection apparatus for laboratory rodents. *Laboratory Animal Science* **28**, 594–7
- Lawlor MM (2002) Comfortable quarters for rats in research institutions. In: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals*, 9th edn (Reinhardt V, Reinhardt A, eds). Washington DC: Animal Welfare Institute
- Lensink BJ, Boivin X, Pradel P, Le Neindre P, Veissier I (2000) Reducing veal calves' reactivity to people by providing additional human contact. *Journal of Animal Science* **78**, 1213–18
- Levine S (1985) A definition of stress? In: *Animal Stress* (Moberg GP, ed). Baltimore, MD: Waverly Press, pp 51–69
- Lopez-Anaya A, Unadkat JD, Schumann LA (1990) Simple and effective procedure for complete urine collection from infant macaques (*Macaca nemestrina*). *Journal of Pharmacological Methods* **24**, 105–9
- Lunn, SF (1989) Systems for collection of urine in the captive common marmoset, *Callithrix jacchus*. *Laboratory Animals* **23**, 353–6
- Manser CE, Broom DM, Overend P, Morris TH (1998) Investigation into the preference of laboratory rats for nest-boxes and nesting materials. *Laboratory Animals* **32**, 23–35
- Manser CE, Elliott H, Morris TH, Broom DM (1996) The use of a novel operant test to determine the strength of preference for flooring in laboratory rats. *Laboratory Animals* **30**, 1–6
- Manser CE, Morris TH, Broom DM (1995) An investigation into the effects of solid or grid cage flooring on the welfare of laboratory rats. *Laboratory Animals* **29**, 353–63
- Matandos CK, Franz DR (1980) Collection of urine from caged laboratory cats. *Laboratory Animal Science* **30**, 562–4
- Mayrs EB (1924) Secretion as a factor in elimination by the bird's kidney. *Journal of Physiology* **58**, 276
- Merkenschlager M, Wilk W, eds (1979) Recommendation for the keeping of laboratory animals in accordance with animal protection principles. In: *Recommendations for the Possible Limitation and Substitution of Experiments with Animals*. Berlin: Paul Parey

- Miller LC, Bard KA, Juno CJ, Nadler RD (1986) Behavioral responsiveness of young chimpanzees (*Pan troglodytes*) to a novel environment. *Folia Primatologica (Basel)* 47, 128–42
- Milroy T (1903) *Journal of Physiology* 30, 47
- Minkowski O (1886) *Arch. F. Exper. Path. u. Pharmacol* 21, 41
- Morrissey JK, Ramer JC (1999) Ferrets. Clinical pathology and sample collection. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice* 2, 553–64, vi: Review
- Morton DB (2002) Foreword. In: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals*, 9th edn (Reinhardt V, Reinhardt A, eds). Washington DC: Animal Welfare Institute
- Mulcahy JJ, Baehler RW, Malvin RL (1978) A cystostomy cannula for dogs. *Investigative Urology* 16, 33–4
- Murray MJ (1997) Diagnostic techniques in avian medicine. *Seminars in Avian Exotic Pet Medicine* 6, 48
- Musacchia XJ, Deavers DR, Meininger GA, Davis TP (1980) A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat. *Journal of Applied Physiology* 48, 479–86
- National Research Council (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington DC: National Academy Press
- National Research Council (1998) *The Psychological Well-Being of Nonhuman Primates*. Washington DC: National Academy Press
- Ness RD (1999) Clinical pathology and sample collection of exotic small mammals. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice* 2, 591–620, vi: Review
- Pastoor FJ, van't Klooster AT, Beynen AC (1990) An alternative method for the quantitative collection of faeces and urine of cats as validated by the determination of mineral balance. *Zeitschrift für Versuchstierkunde* 33, 259–63
- Paton DN (1910) *Journal of Physiology* 39, 485
- Paulson GD, Cottrell DJ (1984) An apparatus for quantitative collection of urine from male cattle, sheep, and swine. *American Journal of Veterinary Research* 45, 2150–1
- Peacock AC, Harris RS (1950) Plastic house for the quantitative separation of urine and faeces excreted by male rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 27, 198–201
- Perline IR (1971) An inexpensive mouse urine collection system. *Physiology and Behaviour* 6, 597
- Poole TB (1997) Happy animals make good science. *Laboratory Animals* 31, 116–24
- Rawlings CA, Bisgard GE (1975) Renal clearance and excretion of endogenous substances in the small pony. *American Journal of Veterinary Research* 36, 45–8
- Reinhardt V, Reinhardt A (2000a) Blood collection procedure of laboratory primates: a neglected variable in biomedical research. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 4, 143–9
- Reinhardt V, Reinhardt A (2000b) Social enhancement for adult nonhuman primates in research laboratories: a review. *Name of journal please* 29, 34–41
- Reinhardt V (2002) Comfortable quarters for nonhuman primates in research institutions. In: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals*, 9th edn (Reinhardt V, Reinhardt A, eds). Washington DC: Animal Welfare Institute
- Rochlitz I (2000) Recommendations for the housing and care of domestic cats in laboratories. *Laboratory Animals* 34, 1–9
- Rochlitz I (2002) Comfortable quarters for cats in research institutions. In: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals*, 9th edn (Reinhardt V, Reinhardt A, eds). Washington DC: Animal Welfare Institute
- Russel FG, Wouterse AC, Hekman P, Grutters GJ, van Ginneken CA (1987) Quantitative urine collection in renal clearance studies in the dog. *Journal of Pharmacological Methods* 17, 125–36
- Russell WMS (2002) The ill effects of uncomfortable quarters. In: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals*, 9th edn (Reinhardt V, Reinhardt A, eds). Washington DC: Animal Welfare Institute
- Sharpe NC (1912) On the secretion of urine in birds. *American Journal of Physiology* 31, 75
- Sherwin CM (2002) Comfortable quarters for mice in research institutions. In: *Comfortable Quarters for Laboratory Animals*, 9th edn (Reinhardt V, Reinhardt A, eds). Washington DC: Animal Welfare Institute
- Smith CR, Felton JS, Taylor RT (1981) Description of a disposable individual-mouse urine collection apparatus. *Laboratory Animal Science* 31, 80–2
- Snowdon CT, Savage A, McConnell PB (1985) A breeding colony of cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *Laboratory Animal Science* 35, 477–80
- Stone AM, et al. (1996) Positive reinforcement training for voluntary movement of group-housed chimpanzees (Abstracts). XVIth Congress of the International Primatological Society/XIXth Conference of the American Society of Primatologists. Madison, Wisconsin, No. 679
- Styles DK, Phalen DN (1998) Clinical avian urology. *Seminars in Avian Exotic Pet medicine* 7, 104
- Sunderman FW (1944) Method of collecting albino rat urine. *American Journal of Clinical Pathology* 9, 11–12
- Tasker JB (1966) Fluid and electrolyte studies in the horse. II. An apparatus for the collection of total daily urine and faeces from horses. *Cornell Veterinarian* 56, 77–84
- Townsend P (1997) Use of in-cage shelters by laboratory rats. *Animal Welfare* 6, 95–103
- Toon S, Rowland M (1981) A simple restraining device for chronic pharmacokinetic and metabolic studies in rats. *Journal of Pharmacological Methods* 5, 321–3

- Van den Berg JS (1996) Modified apparatus for collection of free-flow urine from mares. *Journal of the South African Veterinary Association* 67, 214–16
- Van der Noot GW, Fonnesbeck PV, Lydman RK (1965) Equine metabolic stall and collection harness. *Journal of Animal Science* 24, 691–6
- Van Metre DC, Angelos SM (1999) Miniature pigs. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice* 2, 519–37, v: Review
- Watts RH (1971) A simple capillary tube method for the determination of the specific gravity of 25 and 50 micro l quantities of urine. *Journal of Clinical Pathology* 24, 667–8
- West RW, Stanley JW, Newport GD (1978) Singlemouse urine collection and pH monitoring system. *Laboratory Animal Science* 28, 343–5
- White WA (1971) A technique for urine collection from anesthetized male rats. *Laboratory Animal Science* 21, 401–2
- Wronski TJ, Morey-Holton ER (1987) Skeletal response to simulated weightlessness: a comparison of suspension techniques. *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 58, 63–8
- Wurbel H (2001) Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends in Neurosciences* 24, 207–11