



Hete ogen en koude staarten

Het gebruik van infraroodthermografie bij het inschatten van stress en dierenwelzijn

Afbeelding 2. Infrarood beelden van vier Wistar-ratten in een thuishok. Kleurenspectrum van koud naar warm: paars-rood-geel. Hoe geler, hoe hoger de temperatuur van het gebied (eigen materiaal).

Hetty Boleij

Departement Population Health Sciences, divisie Diergedrag, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht. Contact: h.boleij@uu.nl

Samenvatting

Acute stress kan effect hebben op het welzijn van (proef)dieren. Om dierenwelzijn te waarborgen en te verbeteren is het daarom van belang om stress te kunnen meten. Bij blootstelling aan een stimulus die stress veroorzaakt wordt een keten van fysiologische en gedragsmatige processen in gang gezet, waarvan sommige als marker voor stress kunnen dienen. Daaronder valt ook een toename in kerntemperatuur van het lichaam en een afname van perifere temperatuur, ook wel stress geïnduceerde hyperthermie (SIH) genoemd. Verschillende studies in zoogdieren en vogels tonen aan dat men met een infraroodcamera deze veranderingen in lichaamstemperatuur kan meten, bijvoorbeeld in de oren, ogen, neus of staart. Het grote voordeel van deze methode is dat het niet invasief is en het weinig invloed heeft op het gedrag van het dier. In het kader van verfijning is het te overwegen deze methode te gebruiken in plaats van meer invasieve methoden. Het is dan wel belangrijk ook gedragsparameters te meten aangezien vergelijkbare temperatuursveranderingen ook worden gemeten bij positieve opwindings.

Inleiding

Dieren worden al eeuwenlang ingezet voor het nut van de mens. Of het nu gaat om het produceren van voedsel, gezelschap of inzet als werk- of proefdier, in de huidige tijd is er steeds meer de erkenning dat ook (niet-menselijke) dieren zorg en bescherming verdienen omdat zij voelende wezens zijn. In de Wet op de dierproeven (art. 1a Wod) en de Wet Dieren (art. 1.3 Wet Dieren) wordt dit omschreven als intrinsieke waarde. Naast deze wettelijke erkenning worden er vanuit de maatschappij steeds meer zorgen geuit over hoe dieren behandeld worden.

Om iets te kunnen zeggen over dierenwelzijn moet je allereerst bepalen wat wordt beschouwd als goed dierenwelzijn en zal je dus een definitie van dierenwelzijn moeten aanhouden. De wat oudere definities voor dierenwelzijn hadden vooral de focus op de afwezigheid van negatieve aspecten, zoals bijvoorbeeld de 'vijf vrijheden' van Brambell. Meer recente definities includeren

ook het belang van positieve emoties en ervaringen voor dierenwelzijn [1], zie Box 1. Daarnaast zijn negatieve ervaringen, zoals acute stress, niet per se slecht voor dierenwelzijn omdat zij het dier ook helpen om zich aan te passen aan hun omgeving. Echter, als stress te hoog is of te vaak voorkomt heeft dit wel negatieve effecten op het dierenwelzijn [1]. Een betrouwbare stressmeting bij een dier zou dus informatie kunnen geven over een belangrijke factor die invloed heeft op dierenwelzijn.

Box 1. Definities van dierenwelzijn.

Er zijn over de jaren verschillende definities van dierenwelzijn opgesteld. Omdat niet iedereen dezelfde definitie gebruikt, worden het ook wel dierenwelzijnsconcepten genoemd. Voorbeelden van concepten zijn de 'vijf vrijheden' van Brambell en het 'dynamisch concept dierenwelzijn' van Ohl en Van der Staay. Het laatstgenoemde concept is hier als uitgangspunt gebruikt en wordt door de Faculteit Diergeneeskunde als definitie aangehouden:

Een individu verkeert in een positief welzijn als het in staat is om adequaat te kunnen reageren op:

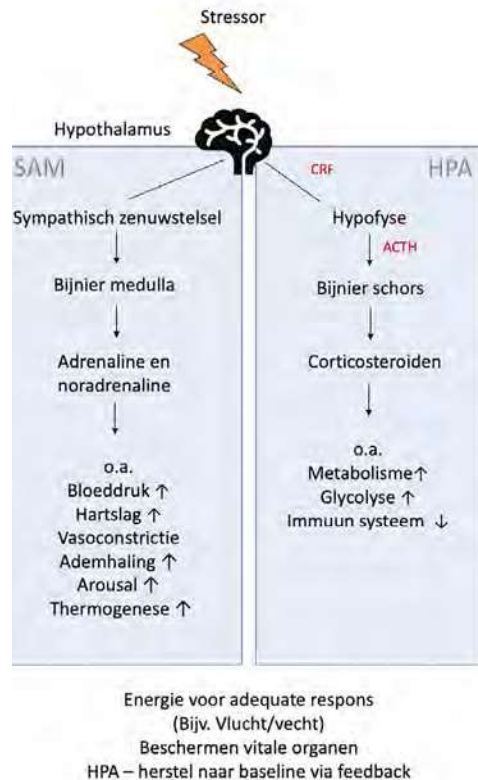
- Honger en dorst of verkeerd voedsel
- Thermaal en fysiek ongemak
- Verwonding en ziekte
- Angst en chronische stress en heeft daarom:
- De vrijheid om normaal soorteigen gedrag te vertonen, die het dier in staat stellen om zich aan te passen aan een veranderende omgeving, en op die manier in staat is om een toestand te bereiken die het dier zelf als positief ervaart.

Voor meer informatie over verschillende welzijnsconcepten, zie [1].

De acute stressrespons bestaat uit een keten van fysiologische veranderingen die uiteindelijk ook effect hebben op het gedrag van een dier. Om stress te meten zou je dus parameters kunnen meten die onderdeel zijn van deze keten. Bij de keuze van de methode moet echter in acht worden genomen dat de meetmethoden zelf ook meer of minder invasief en dus stressvol kunnen zijn voor een dier. In de proefdierkunde is het uitgangspunt om voor je specifieke onderzoeksvraag de meest geschikte methode te kiezen die het minste impact heeft op het welzijn van het dier (de V van verfijning). In dit overzichtsartikel zal verder worden ingegaan op methoden om acute stress in dieren te kunnen meten, met de nadruk op de potentie van het gebruik van infrarood thermografie als non-invasieve meting van stress.

Stressfysiologie en relatie met lichaamstemperatuur

Stress kan op verschillende manieren gedefinieerd worden, discussie hierover gaat echter voor dit artikel te ver. In essentie is er bij stress altijd een interne of externe factor (ook wel stressor genoemd) die opwinding en een fysiologische reactie veroorzaakt. Er worden twee fysiologische systemen in gang gezet. Het zo genoemde SAM-(sympatho-adreno medullary) systeem en de HPA-as (hypothalamus-hypofyse-bijnier-as). De activatie van beide systemen leidt uiteindelijk tot een verhoging van het metabolisme waarbij er energie wordt vrijgemaakt om actief te kunnen reageren op een stressor [2]. Deze reactie is heel zinvol als er een acute dreiging is, bijvoorbeeld als een prooidier een roofdier ziet zal het hierdoor snel kunnen reageren en meer energie hebben om te vechten of te vluchten. Het SAM systeem werkt snel (binnen minuten) en brengt het lichaam in een staat van paraatheid. Dit wordt in gang gezet door activatie van het autonome zenuwstelsel en de productie van adrenaline in de bijnier en zorgt onder andere voor een toename van de ademprequentie, bloeddruk en hartslag en zorgt voor vasoconstrictie (het samenknijpen van de vaten) in de ledematen. De activatie van de HPA-as duurt wat langer (piek rond de



Afbeelding 1. Schematische weergave van de twee fysiologische systemen die in gang worden gezet bij blootstelling aan een interne of externe stressor. Links het SAM-systeem en rechts de HPA-as. Beide systemen zorgen voor het vrijmaken van energie en opwekking (arousal) zodat het dier in staat is adequaat te reageren op de stressor.

20 minuten) en leidt uiteindelijk tot de productie van glucocorticoiden (cortisol of corticosteron) in de bijnier. Deze hormonen zorgen voor het vrijmaken van energie door bijvoorbeeld het laten toenemen van de stofwisseling. Deze respons zorgt er uiteindelijk ook voor dat het lichaam weer kan herstellen van de stress [2]. Zie Afbeelding 1 voor een schematische weergave van beide systemen.

Eén van de mechanismen die gestimuleerd wordt door het sympathisch zenuwstelsel is een toename in warmteproductie, door een toename van verbranding van bruin vet. Dit zorgt er, samen met de herverdeling van het bloed (door vasoconstrictie in de ledematen en vasodilatatie in vitale organen) voor dat de kerntemperatuur van het dier stijgt en de temperatuur van de ledematen daalt. Dit noemt men ook wel 'stress-geïnduceerde hyperthermie' of SIH [3].

Metten van acute stress

Alle fysiologische veranderingen zoals hierboven beschreven kunnen dus een indicatie zijn dat het lichaam in een staat van stress verkeert. Gebruikelijke methoden om de activatie van het SAM-systeem te meten zijn bijvoorbeeld het meten van de bloeddruk, hartslag, hartslagvariabiliteit (HRV), ademhaling en lichaamstemperatuur. Afhankelijk van de diersoort kan dit meer of minder invasief zijn. Zo kunnen bij honden en paarden hartslagmeters met een band bevestigd worden (gelijk aan meters die bij mensen gebruikt worden) maar is er voor het meten van de hartslag, temperatuur en bloeddruk van kleine knaagdieren vaak een operatie nodig om met een transponder via telemetrie deze data over de tijd te kunnen verzamelen. Activatie van de HPA-as wordt het meest gebruikelijk gemeten door het bepalen van corticosteroiden (cortisol of corticosteron) in het bloedplasma, en/of metabolieten in speeksel, feces of urine. Ook hiervoor geldt dat er monsters verzameld moeten worden en dit kan ook impact hebben op

het welzijn van het dier. Het verzamelen van bloed vereist bijvoorbeeld één of meerdere bloedafnames. Bovendien is het lastig om een meting van veranderingen van de hormoonniveaus over de tijd te doen, daar zijn weer meer invasieve methoden voor nodig (zoals het plaatsen van een canule). Om zo min mogelijk invloed te hebben op de meting van stress en voor het waarborgen van het welzijn van het (proef)dier is het belangrijk dat de metingen die gedaan worden zo min mogelijk impact hebben. In dit kader zal verder ingegaan worden op een non-invasieve methode om een indicatie te krijgen van stress; het gebruik van infrarood thermografie om temperatuurveranderingen in dieren te meten.

Infrarood thermografie

Een infraroodcamera zet infraroodstraling, die door elk object of organisme wordt uitgestraald, om in een thermogram (een plaatje met een temperatuuroverzicht in verschillende kleurgradienten) (Afb. 2). Met behulp van een softwareprogramma kunnen specifieke onderdelen van het thermogram geselecteerd worden, waarvan vervolgens een maximum, minimum en gemiddelde temperatuur verzameld en geanalyseerd kunnen worden. Van dieren en mensen kun je dus op deze manier temperatuurmetingen doen aan (delen van) het lichaamsoppervlak. Omdat haren en veren een isolerende functie hebben, zijn de onderdelen waar weinig beharing zit (zoals de ogen en de huid rondom de ogen, de oren bij konijnen, de staart bij ratten en muizen en de kam bij kippen) het meest geschikt om te meten. Als er gebruik gemaakt wordt van een infrarood videocamera, kunnen er meerdere beelden in de tijd geanalyseerd worden en kan er dus ook gekeken worden naar temperatuurveranderingen over de tijd zoals bij SIH dat optreedt na acute stress.

Infrarood thermografie en het meten van acute stress

De temperatuurveranderingen die optreden bij stress zijn een afname in temperatuur in de periferie van het lichaam door vasoconstrictie en een toename van kerntemperatuur. Omdat infraroodbeelden alleen een weergave zijn van de buitenkant van het dier is een meting van de daling van perifere temperatuur als gevolg van stress het meest voor de hand liggend. Dit is al gedaan in veel verschillende zoogdieren en vogels en lijkt ook inderdaad verband te houden met angst en stress. Zo is er bij konijnen gevonden dat het toedienen van verschillende stressoren, zoals hard geluid en blootstelling aan een onbekende soortgenoot, zorgt voor een afname in oortemperatuur [4]. In ratten en muizen blijkt de staart een goede perifere plek om stress-geïnduceerde vasoconstrictie te meten; meerdere artikelen rapporteren een afname in staarttemperatuur na blootstelling aan stressvolle situaties, zie bijvoorbeeld [8]. Ook in ons lab hebben we dit gezien in ratten en muizen (ongepubliceerd werk). In kippen is de kam juist een geschikte plek; deze toont ook een snelle afname in temperatuur na stress als gevolg van hanteren [5]. In verschillende primaten (makaken, chimpansees, maar ook de mens) wordt een afname in neustemperatuur gemeten na het toedienen van een stressor, zoals blootstelling aan dreigende vocalisaties en ruziënde soortgenoten. Alhoewel in al deze diersoorten een duidelijke afname in temperatuur te meten is in deze gebieden als reactie op verschillende stressoren, is er nog maar beperkt onderzoek gedaan naar de vraag of je aan de hand van de gemeten temperatuurverandering ook iets kan zeggen over de mate van stress die het dier ervaart. Er is bijvoorbeeld in kippen gevonden dat een daling in temperatuur van de kam en lel verschilt tussen twee hanteermethoden met verschillende intensiteit [6], maar zijn er ook verschillende studies die geen verschillen hebben kunnen vinden in de temperatuurdalingen tussen verschillende stressoren [7]. Bovendien is het belangrijk op te merken dat het van belang is dat ook andere gevalideerde stressparameters worden meegenomen om te verifiëren dat een bepaalde stressor ook daadwerkelijk stressvol is en hoe ernstig deze is, bijvoorbeeld door ook hormoonwaarden en gedrag te meten. Naast het meten van de genoemde perifere temperaturen is ook in verschillende diersoorten gebleken dat oogtemperatuur gemeten met IRT mogelijk een goede afspiegeling is van de kerntemperatuur. In verschillende diersoorten is een significante correlatie tussen oogtemperatuur

en interne lichaamstemperatuur gevonden, wat aangeeft dat het mogelijk gebruikt kan worden als marker voor SIH. Het gebied in en rond het oog is geschikt omdat er nauwelijks haren of veren zitten en er in en om het oog veel kleine bloedvaten zitten.

De veranderingen in temperatuur in dit gebied lijken onder invloed te staan van het sympathisch zenuwstelsel én ook van de HPA-as respons. In verschillende diersoorten is gevonden dat oogtemperatuur eerst snel afneemt (SAM-systeem) en dan langzaam toeneemt (HPA-as activatie) na het toedienen van een stressor. In (wilde) muizen is tevens gevonden dat de mate van toename gecorreleerd is aan individuele angst-gerelateerde karaktereigenschappen; muizen die meer angstgerelateerd gedrag laten zien in een gedragstest hebben ook een hogere toename in oogtemperatuur [8]. Er is beperkt onderzoek beschikbaar naar de (oorzakelijke) relatie tussen de HPA-as activatie en de toename in oogtemperatuur. In paarden zijn er bijvoorbeeld correlaties gevonden tussen de toename in oogtemperatuur en cortisol niveaus, maar in runderen bijvoorbeeld, is geen verband gevonden tussen activatie van de HPA-as en oogtemperatuur.

Voordelen en beperkingen

Het grote voordeel van het gebruik van een infraroodcamera om stress te kunnen meten is dat het non-invasief is en dat je het kunt gebruiken zonder dat het veel invloed heeft op de fysiologie en het gedrag van een dier. Bovendien is het met de meest geavanceerde camera's ook mogelijk om videobeelden te maken waarmee de reactie op een stressor over de tijd gemeten kan worden. Op deze manier kan dus ook het herstel van het lichaam vastgelegd worden. Met IRT zou men potentiële stressoren in de omgeving van een dier kunnen identificeren en kan men deze risicofactoren verminderen, zodat er minder impact is van acute stress op dierenwelzijn.

Er zijn echter ook verschillende beperkingen van de methode die zeker ook genoemd moeten worden. Tot nu toe is er gesproken over stress als iets dat negatief is. Echter, de fysiologische reactie die optreedt als reactie op een (aversieve) stressor wordt ook geactiveerd in situaties waarin er positieve opwinding is, zoals wanneer dieren anticiperen op een voedselbeloning of als dieren seksueel opgewonden zijn [2]. Er zijn studies die laten zien dat dit ook het geval is met temperaturen gemeten met IRT (bijvoorbeeld in kippen [9] en in honden [10]). Dit probleem treedt echter tevens op bij andere fysiologische metingen, zoals hartslag en bloeddruk. Dit betekent dat het altijd heel belangrijk is om naast de fysiologische metingen ook de context en het gedrag van het dier mee te nemen. Verder is het belangrijk om rekening te houden met andere factoren die van invloed kunnen zijn op de gemeten lichaamstemperatuur, zoals omgevingstemperaturen, de hoek van de camera ten opzichte van het dier, het circadiaans ritme, leeftijd en geslacht. Zoals ook voor elke andere onderzoeksmethode geldt, is het belangrijk dat de meting die je doet betrouwbaar en accuraat is. Dit begint al bij het verzamelen van de beelden; daarbij is het van belang de juiste parameters in te voeren in het camerasysteem of de software waarmee je de data verzamelt, zoals afstand van de camera tot de dieren, de emissiviteit (capaciteit van een object om warmtestraling uit te zenden in vergelijking met een dof zwart object), luchtvochtigheid en omgevingstemperatuur. Dit omdat de temperatuur wordt berekend aan de hand van deze ingevoerde parameters. Verder moet je ook rekening houden met de beperkingen van de camera, afhankelijk van het model kan de resolutie verschillen en als je werkt met kleine dieren zoals ratten en muizen is het meten van kleine gebieden (zoals het oog) dan minder accuraat omdat het te gemeten gebied maar bestaat uit een paar pixels.

Aanbevelingen voor het gebruik van IRT

Binnen dit artikel is kort ingegaan op verschillende aspecten rondom het gebruik van infrarood thermografie om een inschatting te maken van acute stress bij dieren. Mocht je overwegen ook deze methode in te gaan zetten, dan is het advies om goed literatuuronderzoek te doen naar de methoden en bevindingen die bekend zijn in de diersoort waarmee je werkt en een camera te gebruiken die van voldoende kwaliteit is. Er zijn ook een aantal goede review-artikelen beschik-

baar waarin veel uitgebreider wordt ingegaan op de ins-en-outs van IRT (op te vragen bij de auteur). Omdat ons eigen onderzoek met de infraroodcamera bij ratten en muizen nog in volle gang is en nog niet gepubliceerd zal ik daar graag op een later moment meer over vertellen.

Bronnen

1. Ohi F, van der Staay FJ (2012). Animal welfare: at the interface between science and society. *The Veterinary Journal* 192(1):13-9.
2. Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, et al. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35(5):1291-301.
3. Zethof TJJ, Vanderheyden JAM, Tolboom J, et al. (1994). STRESS-INDUCED HYPERTHERMIA IN MICE - A METHODOLOGICAL STUDY. *Physiology & Behavior* 55(1):109-15.
4. Ludwig N, Gargano M, Luzi F, et al. (2010). Technical note: Applicability of infrared thermography as a non invasive measurements of stress in rabbit. *World Rabbit Science* 15(4).
5. Edgar JL, Nicol CJ, Pugh CA, et al. (2013). Surface temperature changes in response to handling in domestic chickens. *Physiology & Behavior* 119:195-200.
6. Herborn KA, Graves JL, Jerem P, et al. (2015). Skin temperature reveals the intensity of acute stress. *Physiology & Behavior* 152(Pt A):225-30.
7. Blenkus U, Geros AF, Carpinteiro C, et al. (2022). Non-Invasive Assessment of Mild Stress-Induced Hyperthermia by Infrared Thermography in Laboratory Mice. *Animals (Basel)* 12(2).
8. Lecorps B, Rödel HG, Féron C (2016). Assessment of anxiety in open field and elevated plus maze using infrared thermography. *Physiology & Behavior* 157:209-16.
9. Moe RO, Stubsjoen SM, Bohlin J, et al. (2012). Peripheral temperature drop in response to anticipation and consumption of a signaled palatable reward in laying hens (*Gallus domesticus*). *Physiology & Behavior* 106(4):527-33.
10. Travain T, Colombo ES, Grandi LC, et al. (2016). How good is this food? A study on dogs' emotional responses to a potentially pleasant event using infrared thermography. *Physiology & Behavior* 159:80-7.

Een volledige literatuurlijst bij dit artikel is op te vragen bij de auteur.