การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (Corticosterone) เพื่อนำมาใช้ในการประเมินภาวะความเครียดในกลุ่มสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก

ชัยณรงค์ ปั้นคง [1]

(2555)

[1]งานวิจัย ฝ่ายอนุรักษ์ วิจัยและสุขภาพสัตว์

สวนสัตว์เปิดเขาเขียว 235 หมู่ 7 ต.บางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี 20110

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงจับคู่ขยายพันธุ์สัตว์ป่าหายากบางชนิดที่อยู่ในสภาพของการเพาะเลี้ยงนั้น มักพบว่าบางกลุ่มชนิดพันธุ์มีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้การขยายพันธุ์ประสบความสำเร็จได้ยาก ไม่ว่าจะเป็นภาวะความไม่สมบูรณ์พันธุ์ การไม่สามารถจับคู่ได้และภาวะความเครียดจากสภาพการบังคับด้วยสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง ซึ่งในกระบวนการพิสูจน์ทราบภาวะความเครียดในสัตว์นั้นสามารถกระทำได้จากการติดตามศึกษาพฤติกรรมเฉพาะแบบหรือพฤติกรรมซ้ำๆ (Stereotypic) และการประยุกต์ใช้การตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ โดยในปัจจุบันวิธีการที่นิยมคือการตรวจวัดระดับของฮอร์โมน เพราะฮอร์โมนคือปัจจัยในการขับเคลื่อนสู่กระบวนการสืบพันธุ์และรูปแบบของการหลั่งฮอร์โมนต่างๆ สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดสภาวะสภาพนั้นๆ ของสัตว์ได้ (Brown *et al.,* 2002) โดยฮอร์โมนแรกๆ ที่เป็นแนวหน้าในการที่จะศึกษาสภาพการถูกบังคับ กดดันจากสถานการณ์ต่างๆ คือฮอร์โมนกลุ่ม Glucocorticoids (GCs) และ Catecholamines (CAs) ฮอร์โมนเหล่านี้มักจะถูกนำมาใช้ในการศึกษาตัวอย่างที่ได้มาจากพลาสมาหรือสิ่งขับถ่าย สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดการทำหน้าที่ของต่อมไร้ท่อ (Adrenal) และพฤติกรรมความตื่นตัวในสัตว์ได้ ทั้งนี้ฮอร์โมนในกลุ่ม Glucocorticoids ประกอบไปด้วยฮอร์โมนคอร์ติซอล (Cortisol) และคอร์ติโคสเตอโรน (Corticosterone) ซึ่งโดยปกติการหลั่งฮอร์โมนกลุ่มนี้จะมีฤทธิ์กว้างซึ่งส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลของร่างกายภายหลังที่เกิดความเครียด เช่น ออกฤทธิ์ตรงข้ามกับการทำงานของอินซูลิน โดยส่งเสริมการสลายคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน เพื่อผลิตพลังงานสำรอง นำไปสู่การเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด ออกฤทธิ์เพิ่มความดันเลือด ซึ่งการหลั่งฮอร์โมนกลุ่มนี้เป็นวลานานจะเป็นผลให้เกิดภาวะไม่พึงประสงค์ เช่น การสูญเสียมวลกล้ามเนื้อ น้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) ภูมิคุ้มกันต่ำ และกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบลดลงเกิดภาวะการติดเชื้อได้ง่ายเป็นต้น ซึ่งเป็นภาวะเครียดเรื้อรัง (Chronic stress) ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาและประสบความสำเร็จในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน โดยใช้วิธีการแบบ enzyme immunoassays (EIA) ที่แตกต่างออกไป กระบวนการตรวจทาง EIA ที่ใช้ในปัจจุบันได้รับการพัฒนาให้มีความไวในการตรวจได้เทียบเท่าหรือดีกว่าการตรวจทาง RIA ที่มีการใช้กัมมันตภาพรังสี (Czekala *et al*., 1986) ซึ่งสามารถนำมาใช้ศึกษาตรวจวัดระดับของฮอร์โมนต่างๆ ในพลาสมาหรือฮอร์โมนที่ถูก metabolites ออกมาในมูลสัตว์ได้ ทั้งนี้การที่สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนสภาพของการหลั่งฮอร์โมนในตัวอย่างมูลสัตว์ได้จึงเป็นเครื่องมือสำคัญที่สามารถนำมาใช้ในตรวจติดตามประเมินการผลิตและหลั่งฮอร์โมนกลุ่ม Glucocorticoids (GCs) ของสัตว์หลากหลายชนิดทั้งในสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และสัตว์ทดลองต่างๆ (Palme *et al*, 2005) ได้เช่นกัน โดยจัดเป็นการศึกษาแบบไม่ทำการจับบังคับหรือรบกวนตัวสัตว์ (Noninvasive methods) ที่มีความเหมาะสมสำหรับสัตว์ที่อยู่ในสภาพของกรงเลี้ยง (Palme *et al*., 2005) โดยในปัจจุบันห้องปฏิบัติการของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนบางชนิดได้โดยได้รับการสนับสนุนถ่ายทอดกระบวนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนในสัตว์ป่าหายากจาก Dr. Janine L. Brown ผู้เชี่ยวชาญจากสถาบันสมิทโซเนียนสหรัฐอเมริกา เมื่อประมาณปี ค.ศ.2008 และอ้างอิงวิธีการจากคู่มือการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเพื่อประเมินการสืบพันธุ์ได้ในกลุ่มสัตว์เลี้ยงและที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยง (Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species) ของ Brown *et al*. (2004) แต่พบว่าในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนบางชนิดคือ คอร์ติโคสเตอโรน (Corticosterone)

ที่เป็นฮอร์โมนในกลุ่ม Glucocorticoids ที่มักพบได้ในกลุ่มสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด (Mostl, 2005) ยังไม่ได้มีการระบุไว้ในคู่มือดังกล่าวหรือคู่มืออื่นๆ ที่สามารถสืบค้นได้มาก่อน อีกทั้งพบว่ารายงานจากต่างประเทศที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดคอร์ติโคสเตอโรน (Corticosterone) ในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็กด้วยวิธีการตรวจทาง EIA มีอยู่น้อยมาก และส่วนใหญ่มีวิธีการและการใช้สารละลาย (reagent) ในการตรวจวัดที่แตกต่างกัน จึงยังไม่พบว่ามีรายงานการศึกษาปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (Corticosterone) ในกลุ่มสัตว์ปีกด้วยวิธีการตรวจทาง EIA มาก่อนในประเทศไทยหรือภูมิภาคนี้ และเพื่อเป็นการพัฒนาเสริมสร้างองค์ความรู้ใหม่ในกระบวนการศึกษาชีววิทยาตัวสัตว์ ทางห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวจึงริเริ่มที่จะทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนดังกล่าวขึ้นเพื่อประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดการทำหน้าที่ของต่อมไร้ท่อ (Adrenal) และภาวะความเครียดในกลุ่มสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดขึ้น นอกเหนือจากการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอลแบบเดิมแต่เพียงอย่างเดียวอันจะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้พัฒนาวางแผนในการจัดการกรงเลี้ยงได้อย่างเหมาะสมให้กลุ่มสัตว์ป่าหายากได้มีคุณภาพชีวิตที่ดีสามารถขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้ อันเป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์สัตว์ป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ชนิดนี้ได้อย่างยั่งยืนต่อไป

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน ด้วยวิธีการตรวจแบบ EIA

2.2 เพื่อทดลองเตรียมและใช้สารละลายต่างๆ สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานและความเหมาะสมของการทำปฏิกิริยา

2.3 เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในกลุ่มสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดในการประเมินการทำงานของต่อมไร้ท่อและภาวะความเครียดแทนการตรวจวัดปริมาณคอร์ติซอลได้

3. การทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการทบทวนวรรณกรรมจากต่างประเทศ พบว่าเคยมีรายงานการตรวจวัดระดับของคอร์ติโคสเตอโรน (Corticosterone) ในปัสสาวะของกบ Fijian (*Platymantis vitiana*) โดย Narayan *et al.* (2010) ซึ่งใช้ polyclonal anti-corticosterone antiserum (CJM06) ที่ระดับความเข้มข้น 1: 45,000 และ horseradish peroxidase conjugated corticosterone ที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:120,000 และใช้สารละลายมาตรฐานของ corticosterone ที่ระดับความเข้มข้น 1.56–400 pg/well สารละลายทั้งหมดได้รับการเตรียมขึ้นโดยห้องปฏิบัติการฮอร์โมนของมหาวิทยาลัย California–Davis เพื่อใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะของกบด้วยวิธีการแบบ EIA โดยเฉพาะ ค่าความไว (sensitivity) ในการตรวจอยู่ที่ประมาณ 2 pg/well

รายงานของ Herring and Gawlik (2009) ได้รายงานถึงความเสถียรของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (corticosterone ในตัวอย่างอุจจาระที่แช่แข็งของนก โดยมีการใช้ชุดสารละลายที่เป็น การตรวจ corticosterone ด้วยวิธี enzyme Immunoassay (EIA) จากบริษัท Assay Designs รัฐไมอามี่ สหรัฐอเมริกา และใช้วิธีการตรวจตามที่บริษัทระบุไว้ ทั้งนี้สารละลายแอนติบอดี (antibody) ได้จากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในลา

รายงานของ Rothschild *et al.* (2008) มีการตรวจวัดระดับฮอร์โมนคอร์โคสเตอโรนที่สกัดจากอุจจาระเพื่อประเมินความเครียดของนากแม่น้ำ (River otter) โดยพบว่ามีการใช้สารละลายในการตรวจจากแหล่งผลิตที่แตกต่างออกไป คือจากบริษัท Assay Designs รัฐไมอามี่ สหรัฐอเมริกา

รายงานของ Frigerio *et al.* (2004) ทำการศึกษาความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน เมตะบอไลเตสในห่านขาเทา (*Anser anser*) ที่สภาพอุณหภูมิและความดันอากาศที่แตกต่างกัน มีการใช้สารละลายแอนติบอดี (antibody) จากกระต่าย (ไม่ทราบแหล่งผลิต) โดยพบว่ากราฟสารละลายมาตรฐาน มีค่าการตรวจวัดได้ที่ระดับ 2 ถึง 500 pg/ well และค่ากึ่งกลางกราฟ (50% intercept) มีค่าอยู่ที่ 30 pg

Kotrschal *et al*. (1997) รายงานถึงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเครียดทางสังคมและช่วงฤดูกาลในห่านขาเทา ซึ่งใช้การตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระ ด้วยการใช้ corticosterone-3-CMO:BSA (ระดับความเข้มข้นที่เป็น working dilution เท่ากับ 1:40,000) ค่าความไวในการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่า 2 pg

ทั้งนี้คู่มือการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนต่างๆ (ยกเว้น Corticosterone) ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวได้ใช้การอ้างอิงวิธีการตรวจของ Brown *et al*, (2004) และสารละลายที่เป็น Antibody และ Horseradish peroxside (HRP) จาก Coralie Munro (มหาวิทยาลัย California–Davis)

4. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

<u>Reagent immune assays</u>

- polyclonal anticorticosterone antiserum
- Horseradish peroxside corticosterone

จาก Coralie Munro (ผ่านสถาบันสมิธโซเนี่ยน สหรัฐอเมริกา)

<u>Standards reagent</u>

- Corticosterone (Sigma Dianostics)

<u>การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน</u>

ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Enzyme immunoassay แบบ Competitive ELISA

5. สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการทดลองเตรียมและใช้สารละลายในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน โดยเทียบเคียงกับวิธีการตรวจวัดปริมาณคอร์ติซอลของ Brown *et al*. (2004) และรายงานต่างๆ ในต่างประเทศพบว่า สามารถทำการตรวจวัดและให้ผลการตรวจได้ โดยมีวิธีการและขั้นตอนในการเตรียมสารดังนี้

<u>ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standards)</u>

- ชั่งสารละลายมาตรฐาน corticosterone (Sigma Dianostics) หนัก 1 มิลลิกรัม
- เติม Ethyl alcohol (ETOH) 1 มิลลิลิตร (ml) ลงไปผสมกับสารละลายมาตรฐานที่ชั่งเตรียมไว้
  - ได้ความเข้มข้นที่ระดับ 1 มิลลิกรัม (mg)/ml ใช้เป็น primary stock
- เจือจางสารละลายที่เป็น primary stock ในอัตราส่วน 1:100 โดยการดูดเอา primary stock.ออกมา 100 ไมโครลิตร (ul) ลงไปผสมกับ Ethyl alcohol (ETOH) 10 มิลลิลิตร (ml)
  - ได้ความเข้มข้นที่ระดับ 10 ไมโครกรัม (ug)/ml ใช้เป็น secondary stock
- เจือจางสารละลายที่เป็น secondary stock ในอัตราส่วน 1:500 โดยการดูดเอา secondary stock ออกมา 100 ไมโครลิตร (ul) ลงไปผสมกับ Assay buffer (EIA buffer) 49.9 มิลลิลิตร (ml)
  - ได้ความเข้มข้นที่ระดับ 20,000 พิโคกรัม (pg)/ml ใช้เป็น working stock
  - เทียบได้กับระดับความเข้มข้นที่ 1,000 pg/ well (เมื่อ 1 well = 50 ul)

<u>ขั้นตอนการเตรียมสารละลายแอนติบอดี (antibody stock)</u>

- เจือจาง polyclonal anticorticosterone antiserum ที่ระดับการเจือจาง 1:100 โดยการดูดเอา polyclonal anticorticosterone antiserum มา 25 ไมโครลิตร (ul) ลงไปใน coating buffer 2.475 มิลลิลิตร (ml) ใช้เป็น

antibody stock เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการดำเนินการในขั้นตอนการทดลองใช้หรือทำ checker board

<u>ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย Horseradish peroxside (HRP stock)</u>

- เจือจาง Horseradish peroxside corticosterone ที่ระดับการเจือจาง 1:100 โดยการดูด Horseradish peroxside corticosterone มา 25 ul ลงไปใน assay buffer 2.475 ml ใช้เป็น Horseradish peroxside corticosterone stock เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการดำเนินการในขั้นตอนการทดลองใช้หรือทำ checker board

<u>สรุปผลการทำ checker board และการทดลองใช้</u>

จากการทำ checker board เพื่อหาอัตราส่วนการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้กราฟมาตรฐาน (standard curve) และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม พบว่าการใช้ antibody ในอัตราส่วนที่เป็น working dilution ประมาณ 1: 25,000 และ Horseradish peroxside ที่อัตราส่วนประมาณ 1:25,000 สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายที่เป็นซับเสตรท (มีส่วนผสมของ ABTS reagent) เกิดความเข้มสีที่เหมาะสมในช่วงเวลาราว 25-30 นาที ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนในห้องปฏิบัติการ แต่ทั้งนี้พบว่าจากการจำลองการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในตัวอย่างมูลของนกเงือกบางชนิด พบว่าการลดระดับความเข้มข้นของ antibody ที่เป็น working dilution เหลืออัตราส่วนมากกว่า 1:30,000 และ horseradish peroxside ที่อัตราส่วน 1:40,000 สามารถแสดงผลที่เป็นกราฟมาตรฐาน (Standard curve) คล้ายคลึงกับการตรวจวัดปริมาณคอร์ติซอล ระยะเวลาการอ่านค่าอยู่ในช่วง 30-40 นาที โดยมีช่วงการตรวจวัดอยู่ที่ 39 พิโคกรัม (pg)/มิลลิลิตร (ml) ถึง 20,000 พิโคกรัม(pg)/มิลลิลิตร (ml) โดยมีค่าความไวในการตรวจอยู่ที่ น้อยกว่า 2 pg/well ค่ากึ่งกลางกราฟ (50% intercept) หรือค่า ED 50 มีค่าอยู่ที่ประมาณ 1,200-1,400 pg/ml หรือ 60-70 pg/well

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาจากต่างประเทศพบว่า การใช้อัตราส่วน working dilution ในส่วนของ antibody และ horseradish peroxside มีความเข้มข้นที่สูงเมื่อเทียบกับรายงานของ Narayan *et al.* (2010) โดยพบว่าการใช้ antibody ที่ระดับการเจือจาง 1:30,000 นั้นใกล้เคียงกันกับที่ Narayan *et al.* (2010) และ Kotrschal *et al.* (1997) ใช้ แต่ระดับความเข้มข้นของ horseradish peroxside มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างชัดเจนกับรายงานของ Narayan *et al.* (2010) ซึ่งมีข้อสังเกตถึงระยะเวลาและค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ใช้ในการอ่านค่าในแต่ละรายงานอาจมีการเลือกใช้ที่แตกต่างกันไป รวมถึงช่วงการอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเมื่อเทียบค่าความไวในการตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวใช้กับรายงานจากต่างประเทศของ Narayan *et al.* (2010), Frigerio *et al.* (2004) และ Kotrschal *et al.* (1997) พบว่ามีค่าเทียบเท่ากันที่ระดับ 2 pg ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ช่วงระดับการตรวจวัดได้แตกต่างกันโดยกราฟมาตรฐานในการตรวจวัดของห้องปฏิบัติการฮอร์โมนสวนสัตว์เปิดเขาเขียวมีค่าอยู่ในช่วง 2 – 1,000 pg/well ซึ่งกว้างกว่าที่ Narayan *et al.* (2010)และ Frigerio *et al.* (2004) ใช้ที่ระดับ 2 ถึง 500 pg/ well กว่า 2 เท่า และด้วยความแตกต่างของการเลือกใช้ช่วงกราฟมาตรฐานที่แตกต่างกันจึงทำให้ค่ากึ่งกลางกราฟหรือค่า ED 50 แตกต่างกันไป โดยพบว่าค่ากึ่งกลางกราฟแตกต่างกันกับรายงานของ Frigerio *et al.* (2004) ที่ 30 pg/well แต่เทียบเท่าหรือใกล้เคียงกันกับรายงานของ Rothschild *et al.* (2008) ที่ระดับมากกว่า 1,000 pg/ml หรือประมาณ 60 pg/well ซึ่งเมื่อพิจารณาความเหมาะสมในการใช้สารละลายที่ทดลองใช้ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ตรวจวัดปริมาณคอร์ติโคสเตอโรนในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็กของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว พบว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ โดยอาจพิจารณาเลือกใช้อัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง antibody กับ horseradish peroxside และค่าการดูดแสงหรือระยะเวลาในการทำปฏิกิริยากับ ABTS ได้ความเข้มสีที่เหมาะสมในระดับที่แตกต่างกันออกไป รวมถึงการพิจารณาเลือกใช้ช่วงระดับความเข้มข้นของ

สารละลายมาตรฐานซึ่งต้องพิจารณาถึงความเข้มข้นของปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนที่มีอยู่ในตัวอย่างต่างๆ ที่อาจมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด จึงจำเป็นต้องพิจารณาความเหมาะสมเป็นกรณีๆ ไป โดยในที่นี้ได้ยึดเอากราฟมาตรฐานอ้างอิงตามรายงานของ Rothschild *et al.* (2008) และอ้างอิงการใช้สารละลายตามรายงานของ Brown *et al*. (2004) และ Narayan *et al.* (2010) ตามลำดับ.

6. เอกสารอ้างอิง

Brown, J.L., Bellem, A.C., Michael, F., Wildt, D.E. and Roth, T.L. 2002. **Comparative Analysis of Gonadal and Adrenal Activity in The Black And White Rhinoceros in North America by Noninvasive Endocrine Monitoring**. Zoo Biology .20: 483-486.

Brown, J.L., Walker, S. and Steinman, K. 2004. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species, 2nd edition,** Smithsonian institution. USA.

Czekala, N.M., Gallusser, S., Meier, M.E. and Lasley, B.L. 1986. **The development and application of an enzyme immunoassay for urinary estrone conjugates**. Zoo Biology .5: 1-16.

Frigerio Didone, Dittami John, Mostl Erich and Kotrschal Kurt. 2004. **Excreted corticosterone metabolites co-vary with ambient temperature and air pressure in male Greylag geese (*Anser anser*)**. General and Comparative Endocrinology 137:29–36.

Herring Garth, Gawlik D.E. 2009. **Stability of avian fecal corticosterone metabolite levels in frozen avian feces**. Journal of Wildlife Management .73(6):1010–1013.

Kotrschal Kurt, Hirschenhauser Katharina and Mostl Erich. 1998. **The relationship between social stress and dominance is seasonal in greylag geese**. Anim. Behav. 55: 171–176

Mostl Erich, Rettenbacher Sophi and Palme Rupert. 2005. **Measurement of Corticosterone Metabolites in Birds' Droppings: An Analytical Approach**. Ann. N.Y. Acad. Sci .1046: 17–34.

Narayan Edward, Molinia Frank, Christi Ketan, Morley Craig and Cockrem John. 2010. **Urinary corticosterone metabolite responses to capture and annual patterns of urinary corticosterone in wild and captive endangered Fijian ground frogs (*Platymantis vitiana*)**. Australian Journal of Zoology .58: 189–197.

Palme, R. 2005. **Measuring Fecal Steroids Guidelines for Practical Application.** Academy of Science, New York.

Rothschild M. D., Serfass T.L., Seddon W.L., Hegde L.and Fritz R.S. 2008. **Using Fecal Glucocorticoids to Assess Stress Levels in Captive River Otters**. Journal of Wildlife Management .72(1):138–142.