

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices[#]

R. Wagner¹, H. Fieseler¹, M. Kaiser¹, H. Müller¹, N. Mielenz², J. Spilke², J. Gottschalk³, A. Einspanier³, R. Palme⁴, A. Rizk⁵, G. Möbius⁶, W. Baumgartner⁷, F. Rachidi¹, A. Starke¹

¹Klinik für Klautiere, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Deutschland; ²Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Arbeitsgruppe Biometrie und Agrarinformatik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland; ³Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Biochemie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig, Deutschland; ⁴Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich; ⁵Abteilung Chirurgie, Anästhesiologie und Radiologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Mansoura, Ägypten; ⁶Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig, Deutschland; ⁷Universitätsklinik für Wiederkäuer, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich

Zusammenfassung

Zur Erfassung der Stressantwort sind nichtinvasiv entnommene Matrices beim Schaf bisher kaum untersucht. In der vorliegenden Studie sollte die Eignung verschiedener Matrices zur Erfassung einer Stressantwort untersucht werden. Als Stressmodell diente die simulierte Klauenbehandlung im Kippstand. Bei 13 gesunden, weiblichen Merinofleischschafen wurde die Kortisolkonzentration in den Matrices Blut, Tränenflüssigkeit und Speichel sowie die Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot über sechs Tage einmal täglich gemessen. Am Tag 4 erfolgte die simulierte Klauenbehandlung in einem Kippstand, während der die Kortisolkonzentration in Blut und Tränenflüssigkeit (Minute 0, 10, 20, 30, 40, 60) erfasst wurde. Während der simulierten Klauenbehandlung stieg die Kortisolkonzentration in Blut (Maximum: Minute 30) und Tränenflüssigkeit (Maximum: Minute 40) an und fiel danach ab. Über den Verlauf der simulierten Klauenbehandlung (Fläche unter der Kurve, Minute 0–60) zeigten die Kortisolkonzentrationen von Blut und Tränenflüssigkeit signifikante Korrelationen ($p = 0,04$). Zwischen den Kortisolkonzentrationen in Blut und Tränenflüssigkeit ($r = 0,55$; $p < 0,001$), Blut und Speichel ($r = 0,53$; $p < 0,001$) sowie Tränenflüssigkeit und Speichel ($r = 0,78$; $p < 0,001$) konnte eine signifikante Korrelation über die sechs Tage ermittelt werden. Die Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot zeigte am Tag 5 eine signifikante Erhöhung gegenüber Tag 4 ($p \leq 0,05$), während sie an den restlichen Tagen keine bedeutsamen Änderungen aufwies. In den anderen Matrices konnten über die sechs Tage keine signifikanten Änderungen der Kortisolkonzentrationen

Cortisol concentrations in sheep before, during and after sham foot trimming on a tilt table – the suitability of different matrices

Matrices that can be collected non-invasively for quantification of a stress response in sheep have received little attention in the veterinary literature. This study examines the suitability of blood, tears and saliva for determining a stress response in sheep undergoing sham foot trimming on a tilt table. The cortisol concentration of blood, tears and saliva and the concentration of cortisol metabolites in faeces were measured in 13 healthy Meat Merino ewes once a day for six days. Sham foot trimming on a tilt table was used as the stressor and was done during a one-hour period on day 4; cortisol concentrations of blood and tears were measured at 0, 10, 20, 30, 40 and 60 minutes. Cortisol concentrations of blood (maximum at 30 minutes) and tears (maximum at 40 minutes) increased during the procedure and then decreased. There were significant correlations between cortisol concentrations of blood and tears ($p = 0,04$) during sham foot trimming (area under the curve, 0 to 60 minutes). Over the entire 6-day study period, significant correlations were seen between the cortisol concentrations of blood and tears ($r = 0,55$; $p < 0,001$), blood and saliva ($r = 0,53$; $p < 0,001$) and tears and saliva ($r = 0,78$; $p < 0,001$). Faecal cortisol metabolite concentration was significantly increased on day 5 ($p \leq 0,05$), but the cortisol concentration of the other matrices did not change significantly in the 6-day study period. Sham foot trimming on a tilt table was considered an acute stressor in sheep because of increased cor-

<https://doi.org/10.17236/sat00325>

Eingereicht: 12.04.2021
Angenommen: 08.09.2021

[#]Prof. Dr. Dr. h.c. med.
vet. Ueli Braun zum
70. Geburtstag gewidmet

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

festgestellt werden. Die simulierte Klauenbehandlung im Kippstand stellt für Schafe einen akuten Stressreiz dar, der mit Hilfe der Kortisolkonzentrationen in Blut und Tränenflüssigkeit, beziehungsweise der Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot erfasst werden konnte. Unter Berücksichtigung des Zeitversatzes spiegelt die Matrix Tränenflüssigkeit den Verlauf der Kortisolkonzentration im Blut während der simulierten Klauenbehandlung wider und stellt damit eine nichtinvasive Alternative dar.

Schlüsselwörter: Blut, Kot, nichtinvasiv, Speichel, Stress, Tränenflüssigkeit

tisol concentrations in blood, tears and increased cortisol metabolite concentrations in faeces. The cortisol concentration of tears was similar to that of blood, and therefore collection of tears represents a viable non-invasive alternative to blood for cortisol testing. The delay in the peaks between the maximum concentration of cortisol in tears and blood must be considered when interpreting results.

Keywords: Blood, faeces, non-invasive, saliva, stress, tears

Einleitung

Das Handling von Schafen und die Fixation im Kippstand während der Klauenbehandlung sind mit Stress verbunden und eignen sich als Modell für die Stressauslösung.^{21,17,47} Stressmodelle werden in der Nutztiermedizin eingesetzt, um Wissen zu Haltung, Management und Verhalten von Nutztieren zu generieren und dadurch Tiergesundheit und Tierwohl zu verbessern. Im Zuge zootechnischer Maßnahmen müssen Schafe häufig fixiert werden, sodass derartige Stressmodelle besonders praxisrelevant sind. Infolge des akuten Stressreizes wird Kortisol ins Blut freigesetzt.^{34,46} Dort ist es zu 10% als freies Kortisol nachweisbar und zu 90% an Proteine gebunden.⁶ Das freie Kortisol stellt die biologisch wirksame Form dar.^{24,1} Es gelangt mittels Diffusion aus dem Blut in Tränenflüssigkeit, Speichel und Milch.^{45,24,18} In der Leber konjugierte Metaboliten werden u.a. in den Darm abgegeben.^{32,37,38} Beim Schaf konnten 21 Metaboliten gefunden werden, wovon 11,17-Dioxoandrostane einen wesentlichen Anteil darstellen.³³ Im Blut wurden bei Schafen in bisherigen Studien Kortisolbasalkonzentrationen zwischen 5 ng/ml und 40 ng/ml sowie eine Halbwertszeit von 60 Minuten angegeben.^{23,42,14} Die Bestimmung der Kortisolkonzentration (KoK) über die Matrix Blut wird bei Schafen als etablierte Methode für die Beurteilung von akutem Stress angesehen.^{23,8} Die dafür erforderliche Blutentnahme stellt eine Stressbelastung dar.^{13,20,48} Daher erscheint die Bestimmung der KoK bzw. Kortisolmetabolitenkonzentration (KmK) aus den Matrices Tränenflüssigkeit, Speichel, Kot, Milch, Haar und Harn aufgrund der nichtinvasiven Entnahmemethoden geeigneter.^{30,5,32,12,22,43} Eine vergleichende Untersuchung der KoK bzw. der KmK nichtinvasiv entnommener Matrices gegenüber der KoK im Blut beim Schaf fehlt bisher jedoch (pubmed-Suche am 03.03.2021 mit den Schlagwörtern: sheep, cortisol, tear, saliva, faeces, blood).

Ziel dieser Studie war es, die Eignung verschiedener Matrices zur Erfassung einer Stressantwort während

der simulierten Klauenbehandlung (sKB) mit entsprechender Fixation im Kippstand als Stressmodell bei Schafen zu untersuchen. Dazu sollten die Verläufe der KoK bzw. KmK in den verschiedenen Matrices betrachtet werden.

Material und Methoden

Die Studie wurde als Tierversuch unter dem Aktenzeichen 42502-3-734 bestätigt. Sie ist Teil eines Gesamtprojektes zum Schmerzmanagement bei weiblichen Schafen.^{9,10} Die Schafe, deren Daten in der vorliegenden Arbeit ausgewertet wurden, erfuhren über die hier beschriebenen Maßnahmen keine weiteren Manipulationen. Sie fungierten im Gesamtprojekt als Kontrollgruppe und durchliefen den Versuch mit drei weiteren Gruppen. Die Schafe der anderen Gruppen litten an Dermatitis interdigitalis contagiosa und erhielten verschiedene Formen von Schmerzmanagement.

Patientengut

In die Studie wurden 13 gesunde, lahmheitsfreie, weibliche, nicht tragende, nicht laktierende Merinofleischschafe eingeschlossen (Alter: 1,96 Jahre (Mittelwert; MW), Min. = 1,1, Max. = 5,4; Körpermasse: 55,7 kg (MW), Min. = 43,4, Max. = 71,5, SD = 8,9; Body Condition Score: Median = 3,25, Min. = 3, Max. = 3,5). Die Tiere durften in den letzten 28 Tagen vor Studienbeginn nicht mit entzündungshemmenden Medikamenten behandelt worden sein und sich nicht innerhalb einer Sperrfrist aufgrund der Gabe eines Antibiotikums befinden. Die Schafe wurden in einem Stallabteil gehalten, welches von der restlichen Herde abgetrennt war. Zwischen den Tieren der Herde und denen im Stallabteil bestand Sichtkontakt. Der Kippstand (Fa. Biermann Eisenwaren Landtechnik, 31637 Rodewald) war über einen Treibgang mit dem Abteil der Studientiere verbunden. Die Tiere konnten somit ruhig und stressfrei dem Kippstand zugeführt werden.

Bei Schafen, die während des Studienverlaufs eine Dermatitis interdigitalis contagiosa, eine Körpertemperatur über 39,5° C oder eine hochgradige Störung des Allgemeinbefindens entwickelt hätten, wäre die Studie unverzüglich abgebrochen worden. Diese Abbruchkriterien erfüllte kein Studientier. Bei Studientieren, bei denen die Blutentnahme über den Venenverweilkatheter (VVK) nicht mehr möglich war oder die eine Thrombophlebitis entwickelten, wurden die KoK bzw. KmK separat ausgewertet. Aufgrund eines nicht mehr durchgängigen VVK wurden die KoK bzw. KmK von zwei (1: Tag 5, 2: Tag 6) und aufgrund einer Thrombophlebitis von zwei weiteren Schafen (3 und 4: Tag 6) ab dem Tag, an dem die Komplikationen auftraten (Tag 5 bzw. Tag 6), separat ausgewertet. In der Auswertung wurden die KoK bzw. KmK der Tiere mit Komplikationen (N = 4) denen ohne Komplikationen (N = 9) gegenübergestellt.

Studiendesign

Zur Auswahl wurden alle Tiere des Bestandes gesichtet und auf ihre Eignung zur Teilnahme überprüft. Am Tag 0 erfolgte die vollständige klinische Eingangsuntersuchung im Stehen inklusive orthopädischer Untersuchung.^{2,9} Aufgrund des übergeordneten Versuchsdesigns erfolgte zu diesem Zeitpunkt an drei Gliedmaßen (beide Vordergliedmaßen, linke Hintergliedmaße) eine Klauenpflege.^{7,9} Die Klauenpflege der drei Gliedmaßen an Tag 0 erfolgte für alle Schafe gleichermaßen, um einen standardisierten Studienablauf zu gewährleisten. Mögliche Einflüsse durch die Manipulationen sind daher für alle Schafe gleich. Für die Blutentnahmen wurde den Tieren durch erfahrene Fachtierärzte mittels standardisierten Vorgehens unter Lokalanästhesie der Implantationsstelle ein VVK (VWI Jugularis-Katheter AD 2,4 mm Länge 10 cm mit Teflonkatheter, Walter Veterinär-Instrumente e.K.,

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

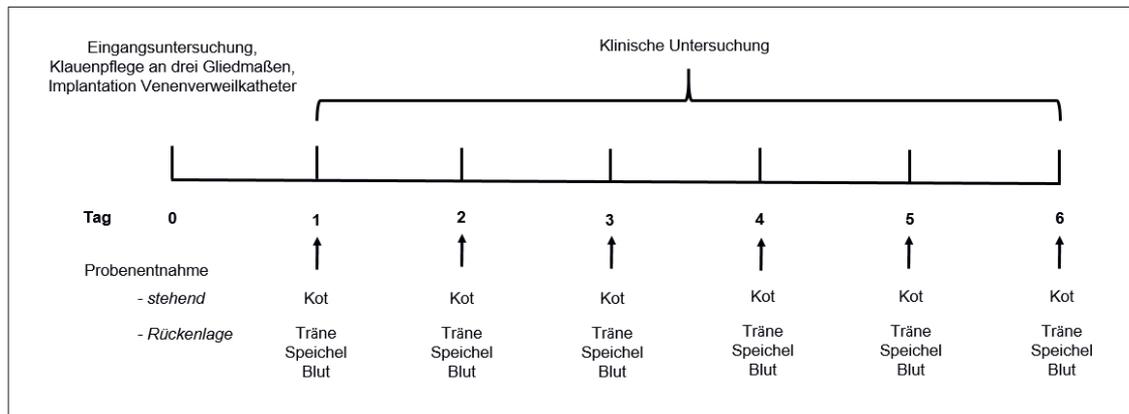


Abbildung 1: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Studie «Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand». Tag 0: Eingangsuntersuchung, Klauenpflege an drei Gliedmaßen und Implantation des Venenverweilkatheters. Tag 1–6: klinische Untersuchung, Probenentnahme von Kot im Stehen und von Tränenflüssigkeit, Speichel und Blut in Rückenlage.

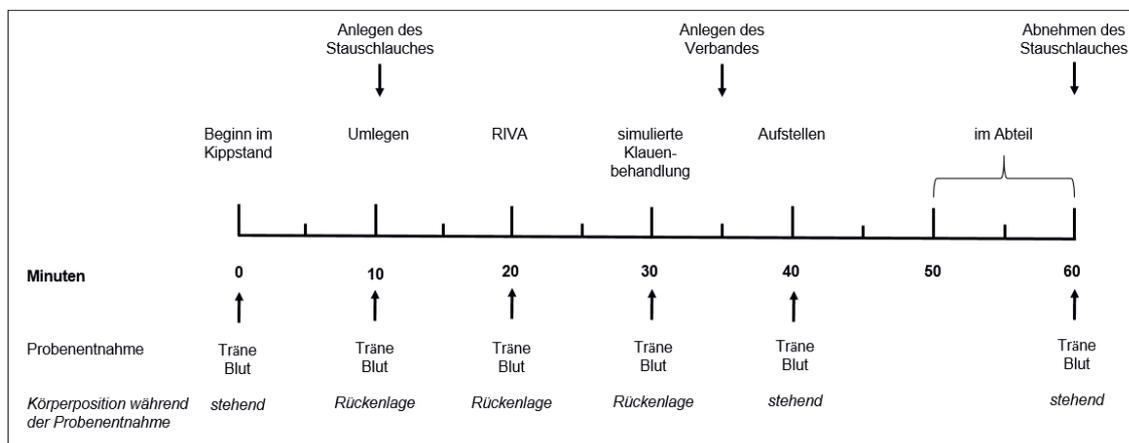


Abbildung 2: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der simulierten Klauenbehandlung bei Schafen im Kippstand. Minute 0: Beginn der Probenentnahme von Blut und Tränenflüssigkeit; Min 10: Umlegen und Fixieren der Tiere in Rückenlage sowie Anlegen des Stauschlauchs; Min 20: Durchführung der retrograden intravenösen Stauungsanästhesie (RIVA) mit Placebo; Min 30: Durchführung der simulierten Klauenbehandlung; Min 35: Anlegen des Verbandes; Min 40: Aufstellen des Tieres aus der Rückenlage; Min 50: Entlassen des Tieres in das Stallabteil; Min 60: Probenentnahme im Stallabteil und Abnahme des Stauschlauchs.

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

Baruth/Mark) in die Vena jugularis externa gelegt.¹⁹ An den Tagen 1–6 wurden die Tiere im Stehen einer klinischen Untersuchung unterzogen. Zur Gewöhnung an das Stressmodell wurden die Tiere nach der Untersuchung im Kippstand in Rückenlage gebracht.⁹ Im Zuge dessen erfolgte die tägliche Probenentnahme (Abbildung 1). Im Rahmen der sKB am Tag 4 (Stressmodell) wurde die vierte Gliedmaße behandelt.⁹ Vor (Tag 1–4) und nach (Tag 5–6) der sKB wurden täglich morgens zwischen 8 und 10 Uhr Proben der Matrices Kot, Tränenflüssigkeit, Speichel und Blut zur Bestimmung der KoK bzw. KmK entnommen. Den Schafen stand in der Gruppe stets Futter und Wasser zur Verfügung. Täglich nach der morgendlichen Probenentnahme gegen 10 Uhr erfolgte die Entfernung des Restfutters und die Fütterung der Tiere. Vor der Probenentnahme hatten die Tiere, während der Wartezeit im Treibegang, keinen Zugang zum Futter. Jedoch konnte ein Wiederkäuen der Tiere nicht vollumfänglich vermieden werden. Bei der Entnahme der Speichelprobe wurde darauf geachtet, dass sich kein Futterbolus im Maul befand.

Am Tag 4 während der sKB im Kippstand erfolgten mit tags zwischen 11 und 15 Uhr engmaschig die Entnahmen der Matrices Tränenflüssigkeit und Blut. Bei jedem Studientier erfolgte zunächst eine Probenentnahme im Stehen. Zu Minute 10, 20 und 30 erfolgte, nach entsprechender Manipulation (Umlegen und Fixieren in Rückenlage, Durchführung retrograde intravenöse Stauungsanästhesie mit Placebo, simulierte Klauenbehandlung), die

Probenentnahme in Rückenlage. Unmittelbar nach dem Aufstellen in Rückenlage (Minute 40) und im Stallabteil (Minute 60) wurden die Proben erneut im Stehen entnommen (Abbildung 2). Am Tag 6 wurde der VVK entfernt und die Tiere aus der Studie entlassen. Die Untersuchungen der Studientiere sowie die Probenentnahmen erfolgten stets nach dem gleichen Protokoll sowie zur gleichen Tageszeit durch die gleichen, erfahrenen Tierärztinnen.

Probenentnahme, -lagerung, -analyse

Die Kotprobenentnahme erfolgte am stehenden Tier. Im Anschluss wurde Tränenflüssigkeit, Speichel und Blut in Rückenlage im Kippstand entnommen (Abbildung 1). An Tag 4 wurden darüber hinaus zu definierten Zeitpunkten Manipulationen an den Schafen durchgeführt und jeweils im Anschluss zuerst Tränenflüssigkeit und dann Blut gewonnen (Abbildung 2). Es wurde stets auf ruhigen und behutsamen Umgang mit den Schafen geachtet. Die Entnahme der Tränenflüssigkeit (Abbildung 3) sowie des Speichels erfolgten nach der Methode von Heinrich et al. (2020).¹⁹ Die Kotproben wurden direkt aus dem Rektum am stehenden Tier entnommen. Die Kotbeschaffenheit wurde bewertet und dokumentiert. Alle Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der KoK in Blut, Tränenflüssigkeit und Speichel sowie die Bestimmung der KmK im Kot erfolgten nach den bei Heinrich et al. (2020)¹⁸ beschriebenen Verfahren.



Abbildung 3: Entnahme von Tränenflüssigkeit beim Schaf in Rückenlage; Ansicht rechtes Auge.

Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit linearen gemischten Modellen analog zu dem bei Heinrich et al. (2020)¹⁹ beschriebenen Konzept. Vor Studienbeginn erfolgte eine statistische Fallzahlplanung. Zur Schätzung der Modellparameter wurden die Prozeduren MIXED und CORR von SAS Vers. 9.4 (SAS Institute 2013, Cary, NC, USA) verwendet.

Zur Auswertung der KoK vor und nach sKB wurden die Prüffaktoren Tag, Gruppe (mit (N = 4) und ohne Komplikationen (N = 9)) und deren Wechselwirkung über feste Effekte im Modell berücksichtigt. Die Messwiederholung pro Tier wurde über zufällige Tiereffekte abgebildet. Zusätzlich wurden für die Resteffekte der Beobachtungen eines Tieres bei Nutzung der repeated Anweisung von Prozedur MIXED mit der Typ-Option folgende Korrelationsstrukturen mit und ohne inhomogene Restvarianzen geprüft: unveränderlich, unstrukturiert, autoregressiv und Toeplitz-Struktur. Die Auswahl der Korrelationsvariante für das finale Modell erfolgte mit dem Akaike Informationskriterium unter Verwendung der LogLikelihood der REML-Methode. Zur Prüfung auf Normalverteilung kam der Shapiro-Wilk-Test, angewendet auf die studentisierten Residuen in den linearen gemischten Modellen, zum Einsatz. Die Korrelationen bei Einbeziehung aller sechs Tage wurden mit Zweimerkmalsmodellen, die feste Effekte der Tage und zufällige Tiereffekte enthielten, geschätzt. Für die Matrices Tränenflüssigkeit, Speichel und Kot ließ sich erst durch logarithmische Transformation die Annahme von Normalverteilung der studentisierten Residuen einhalten. Die für Tränenflüssigkeit, Speichel und Kot gefundenen signifikanten Differenzen zu den Zeitpunkten in der logarithmischen Skala, implizieren signifikante Unterschiede zwischen den zugehörigen Medianen in der Originalskala.

Für die Auswertung der KoK im Blut und in der Tränenflüssigkeit während der sKB wurde die Prüfminute als

quantitative Einflussgröße aufgefasst und im Ergebnis einer Trendanalyse über eine Polynomregression im Modell berücksichtigt. Zur Bestimmung des Polynomgrades in der Regressionsfunktion wurde der F-Test in MIXED mit der Option htype = 1 verwendet. Die Berücksichtigung der Messwiederholung pro Tier erfolgte analog zu den angewendeten Methoden über die sechs Tage. Zusätzlich wurden simultan tierspezifische Regressionsfunktionen (Polynome zweiten und dritten Grades) angepasst und die folgenden drei Merkmale abgeleitet: Fläche unter der Kurve (AUC) im Intervall von 0 bis 60, maximale KoK (max. K) in [0,60] und deren Zeitpunkt (max. Zp). Die Berechnung der Korrelationen zwischen den Matrices zu den Zeitpunkten sowie zwischen den abgeleiteten Merkmalen (AUC, max. K, max. Zp) erfolgte nach Pearson mit der Prozedur CORR.

Resultate

Kortisolkonzentrationen in Blut, Tränenflüssigkeit, Speichel und Kot vor und nach der simulierten Klauenbehandlung

Zu jedem Untersuchungszeitpunkt konnten bei den Schafen (Tag 1–4: N = 13; Tag 5: N = 12; Tag 6: N = 9) im Blut höhere KoK als in der Tränenflüssigkeit und im Speichel gemessen werden (Abbildung 4 a–c). Die KoK in Blut, Tränenflüssigkeit und Speichel blieben bis zu Tag 6 auf gleichem Niveau (Abbildung 4 a–c; $p > 0,05$; Tabelle 1). Die KmK im Kot war nach der sKB (Tag 5) am höchsten ($p \leq 0,05$, Abbildung 4 d) und fiel am Tag 6 wieder auf das Level von vorher (Tag 1–4).

Vergleich der Kortisolkonzentrationen zwischen den Matrices (Blut, Tränenflüssigkeit, Speichel und Kot) vor und nach der simulierten Klauenbehandlung

An den sechs Tagen ergaben sich für die KoK zwischen den Matrices Blut, Tränenflüssigkeit und Speichel hohe Korrelationen. Die KoK in Tränenflüssigkeit und Spei-

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

Tabelle 1: Kortisolkonzentration (Least Square Means (LSM) \pm Standardfehler (SE); ng/ml) bei Schafen im Blut, in der Tränenflüssigkeit, im Speichel und Kortisolmetabolitenkonzentration (LSM \pm SE; ng/g) im Kot an den Tagen 1–6, Tag 4 vor der simulierten Klauenbehandlung (Tag 1–4: N = 13; Tag 5: N = 12; Tag 6: N = 9)

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
Blut [ng/ml]	44,7 \pm 3,8	37,5 \pm 3,8	38,7 \pm 3,8	37,8 \pm 3,8	37,9 \pm 3,8	35,2 \pm 4,2
Tränenflüssigkeit [ng/ml]	2,0 \pm 0,3	2,1 \pm 0,3	2,3 \pm 0,3	2,2 \pm 0,3	3,0 \pm 0,4	2,2 \pm 0,4
Speichel [ng/ml]	2,6 \pm 0,3	2,7 \pm 0,3	2,9 \pm 0,4	2,6 \pm 0,4	3,3 \pm 0,6	2,4 \pm 0,2
Kot [ng/g]	51,6 ^{ab} \pm 15,2	46,2 ^{ab} \pm 13,6	38,5 ^{ab} \pm 11,3	34,1 ^a \pm 10,0	110,2 ^b \pm 33,2	57,7 ^{ab} \pm 19,3

^{a,b}Mediane der Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot, gekennzeichnet mit unterschiedlichen Buchstaben, unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$, Tukey-Test).

Tabelle 2: Pearson-Korrelation (mit p-Werten) zwischen den Kortisolkonzentration der Matrices Blut, Tränenflüssigkeit (logarithmiert), Speichel (logarithmiert) und Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot (logarithmiert) bei Schafen an den Tagen 1–6, Tag 4 vor der simulierten Klauenbehandlung (Tag 1 – 4: N = 13; Tag 5: N = 12; Tag 6: N = 9), sowie den Korrelationen ± Standardfehler ($r \pm SE$) an den Tagen 1–6

Tag	Pearson-Korrelation (mit p-Werten)					
	Blut – Speichel	Blut – Träne	Träne – Speichel	Speichel – Kot	Blut – Kot	Träne – Kot
1	0,48 (p = 0,1)	0,59 (p = 0,03)	0,69 (p = 0,01)	0,13 (p = 0,68)	0,30 (p = 0,33)	0,30 (p = 0,33)
2	0,47 (p = 0,11)	0,50 (p = 0,09)	0,80 (p < 0,001)	0,26 (p = 0,40)	0,18 (p = 0,56)	0,33 (p = 0,28)
3	0,66 (p = 0,01)	0,68 (p = 0,01)	0,85 (p < 0,001)	0,40 (p = 0,18)	0,38 (p = 0,21)	0,37 (p = 0,22)
4	0,56 (p = 0,05)	0,57 (p = 0,04)	0,90 (p < 0,001)	0,62 (p = 0,02)	0,16 (p = 0,62)	0,44 (p = 0,14)
5	0,71 (p < 0,01)	0,55 (p = 0,06)	0,77 (p < 0,01)	-0,31 (p = 0,34)	-0,24 (p = 0,46)	-0,10 (p = 0,76)
6	0,25 (p = 0,53)	0,52 (p = 0,16)	0,26 (p = 0,52)	-0,32 (p = 0,42)	0,47 (p = 0,21)	-0,21 (p = 0,60)
1–6* [$r \pm SE$]	0,53 ± 0,11 (p < 0,001)	0,55 ± 0,12 (p < 0,001)	0,78 ± 0,06 (p < 0,001)	0,14 ± 0,11 (p = 0,22)	0,17 ± 0,17 (p = 0,31)	0,17 ± 0,12 (p = 0,16)

*Korrelation geschätzt über die Tage 1–6 bei Nutzung von Zweimerkmalsmodellen.

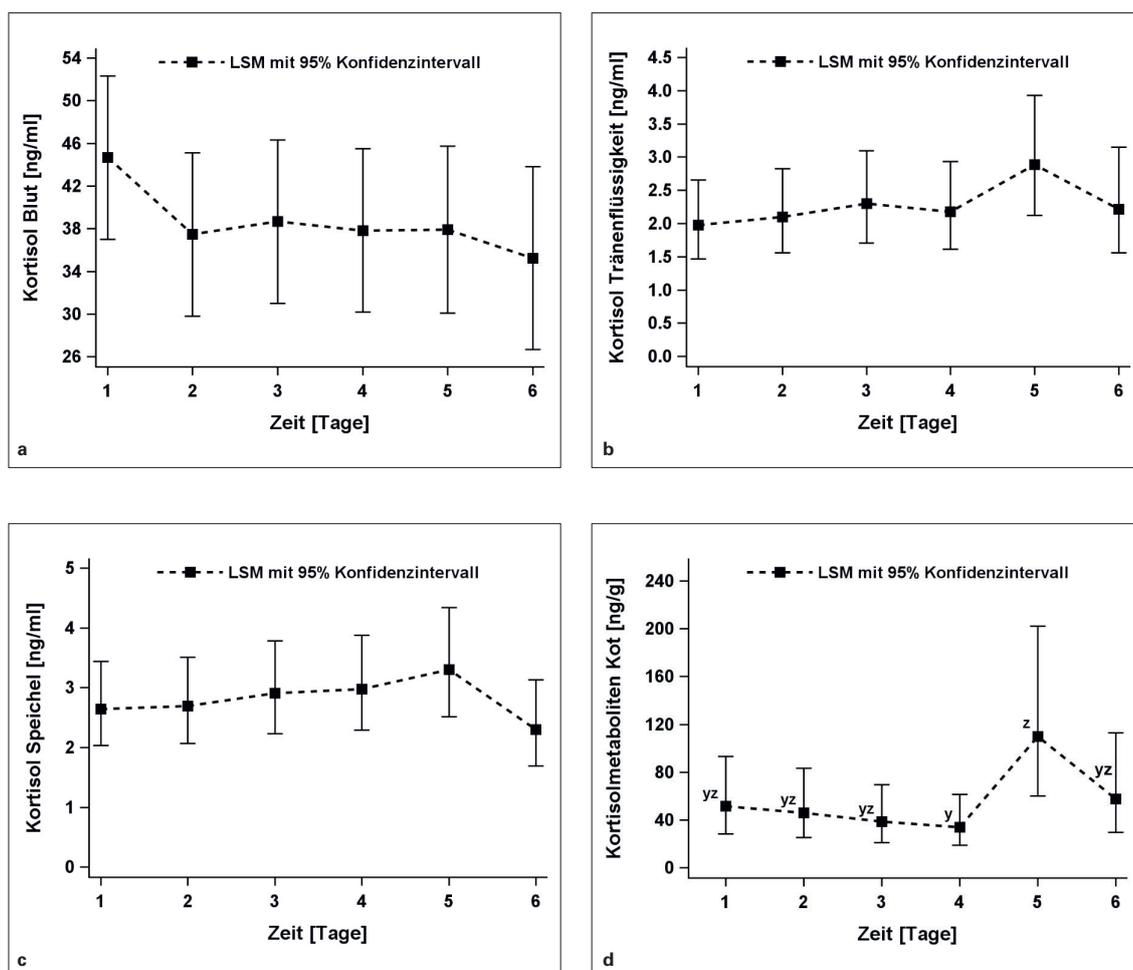


Abbildung 4 a–d: Verlauf der Kortisolkonzentration (Least Square Means (LSM); ng/ml; 95% – Konfidenzintervall (KI)) bei Schafen: a – im Blut, b – in der Tränenflüssigkeit, c – im Speichel und d – Kortisolmetabolitenkonzentration (LSM; ng/g, 95% – KI) im Kot an den Tagen 1–6, Tag 4 vor der simulierten Klauenbehandlung (Tag 1 – 4: N = 13; Tag 5: N = 12; Tag 6: N = 9)
 yzSignifikanz zwischen den Zeitpunkten innerhalb einer Matrix ($p \leq 0,05$).

chel korrelieren eng miteinander ($r = 0,78$; $p < 0,001$). Zwischen den KoK dieser Matrices und den KmK im Kot konnten bei Betrachtung aller Untersuchungstage nur geringe positive Korrelationen, jedoch mit deutlichen Schwankungen zwischen den Untersuchungstagen festgestellt werden (Tabelle 2).

Vergleich der Kortisolkonzentrationen zwischen den Matrices (Blut, Tränenflüssigkeit, Speichel und Kot) bei Schafen mit und ohne Komplikationen

Bei den Schafen mit Komplikationen ($N = 4$) war die KoK im Blut am Tag 5 ($p \leq 0,05$) und am Tag 6 ($p < 0,01$) höher als bei den Schafen ohne Komplikationen ($N = 9$; Abbildung 5 a). Die KoK in Tränenflüssigkeit und Speichel lagen bei den Schafen mit Komplikationen zwei Tage nach der Klauenbehandlung (Tag 6) höher als bei den Schafen ohne Komplikationen (Tränenflüssigkeit $p < 0,01$; Speichel $p \leq 0,05$; Abbildung 5 b, c).

Im Kot wurde bei den Tieren mit Komplikationen an den Tagen vor Auftreten der Komplikationen (Tage 2–4) eine niedrigere KmK gemessen als bei den Tieren ohne Komplikationen ($p \leq 0,05$; Abbildung 5 d).

Kortisolkonzentrationen in Blut und Tränenflüssigkeit während der simulierten Klauenbehandlung

Bei den 13 Schafen verliefen die KoK im Blut und in der Tränenflüssigkeit während der sKB ähnlich (Tabelle 3, Abbildung 6). Die niedrigste KoK wurde in beiden Matrices zu Beginn der Untersuchung (Min 0) am stehenden Tier gemessen (Tabelle 3, Abbildung 6). Bis zur Durchführung der sKB (Min 30) stieg die KoK in beiden Matrices an. Dabei war der Anstieg im Blut steiler als der in der Tränenflüssigkeit. Die höchste KoK wurde im Blut kurz nach der sKB ermittelt. In der Tränenflüssigkeit wurde das Maximum der KoK erst 11,4 Minuten später erreicht ($p_{\max, Zp} < 0,05$; Tabelle 4). Die KoK fielen

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

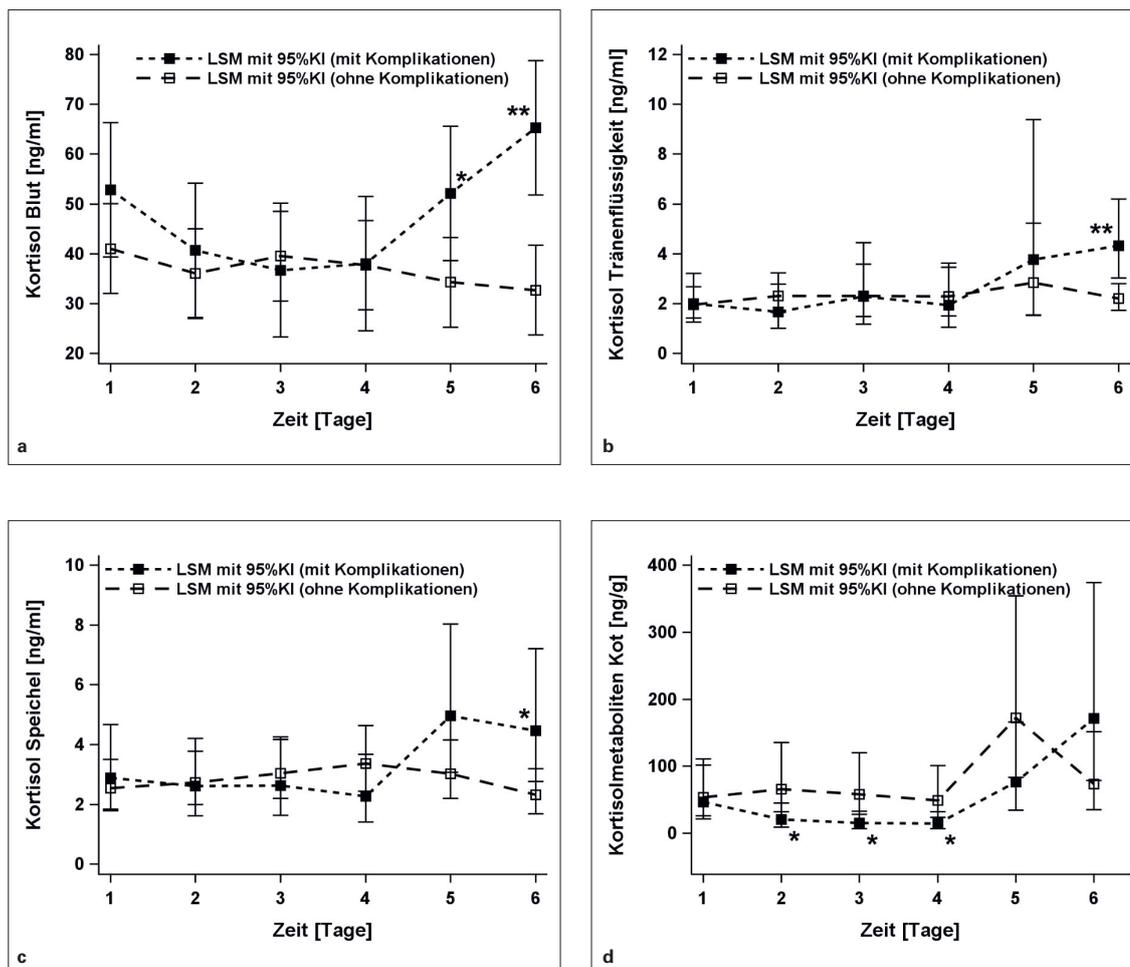


Abbildung 5 a–d: Verlauf der Kortisolkonzentration (Least Square Means (LSM); ng/ml; 95% – Konfidenzintervall (KI)) bei neun Schafen ohne Komplikationen und vier Schafen mit Komplikationen an den Venen: a – im Blut, b – in der Tränenflüssigkeit, c – im Speichel und d – Kortisolmetabolitenkonzentration (LSM; ng/g, 95% – KI) im Kot an den Tagen 1–6, Tag 4 vor der simulierten Klauenbehandlung (Tag 1–4: $N = 13$; Tag 5: $N = 12$; Tag 6: $N = 9$) Signifikanz zwischen den Gruppen innerhalb eines Zeitpunktes: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$.

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

in beiden Matrices bis zur Verbringung der Schafe in das Stallabteil ab (Tabelle 3, Abbildung 6). Mit Ausnahme zur Minute 10 und 20 korrelierten die Matrices zu allen Probenentnahmezeitpunkten miteinander (Tabelle 3). Zu allen Messzeitpunkten während der sKB war die AUC des Blutes größer als die der Tränenflüssigkeit ($p_{AUC} < 0,01$; Tabelle 4).

Vergleich der Kortisolkonzentrationen in Tränenflüssigkeit und Blut bei Änderung der Position der Schafe während der Fixation
Die KoK in Tränenflüssigkeit und Blut der 13 Schafe

war bei der Probenentnahme, welche im Stehen am Tag der sKB erfolgte (Tag 4, Min 0) niedriger (Tränenflüssigkeit: $1,0 \pm 0,2$ ng/ml, $p < 0,01$; Blut: $17,8 \pm 3,8$ ng/ml, $p < 0,01$) als diejenige, welche an den Tagen 1–4 in Rückenlage entnommen wurden (Abbildung 7, Tabelle 5).

Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden die Matrices Blut, Tränenflüssigkeit, Speichel und Kot über verschiedene Probenentnahmetechniken gewonnen. Die Entnahme

Tabelle 3: Kortisolkonzentration (Least Square Means \pm Standardfehler) und geschätzte phänotypische Korrelationen nach Pearson (mit p-Werten) im Blut und in der Tränenflüssigkeit bei 13 Schafen während der simulierten Klauenbehandlung.

Zeitpunkt der Manipulation [Min]	Maßnahme	Kortisolkonzentration [ng/ml]		Korrelationen (mit p-Werten)
		Blut	Tränenflüssigkeit	
0	Beginn der Probenentnahme	$17,8^a \pm 3,4$	$1,2^a \pm 0,2$	0,7 ($p = 0,01$)
10	Umlegen und Fixieren in Rückenlage	$39,1^b \pm 2,9$	$4,0^b \pm 0,2$	0,5 ($p = 0,06$)
20	Durchführung RIVA ¹	$50,0^c \pm 2,7$	$6,1^c \pm 0,3$	0,4 ($p = 0,15$)
30	simulierte Klauenbehandlung	$53,5^d \pm 2,4$	$7,6^d \pm 0,4$	0,6 ($p = 0,05$)
40	Aufstellen aus Rückenlage	$52,3^{cd} \pm 2,6$	$8,4^e \pm 0,5$	0,7 ($p = 0,01$)
60	Probenentnahme im Stallabteil	$47,6^e \pm 2,4$	$7,9^{de} \pm 0,7$	0,7 ($p = 0,01$)

¹RIVA: retrograde intravenöse Stauungsanästhesie mit Placebo a...e Mit Hochbuchstaben gekennzeichnete Konzentrationen innerhalb einer Matrix unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$).

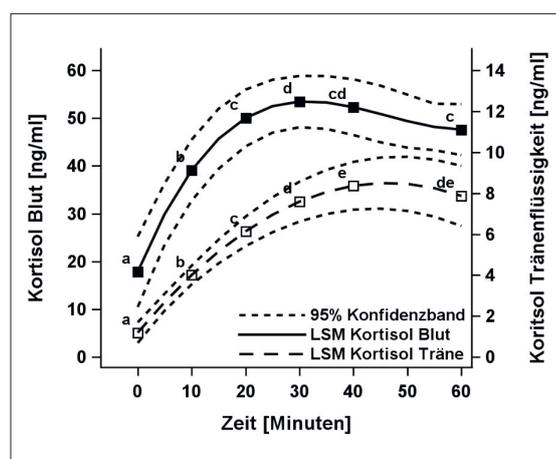


Abbildung 6: Verlauf der Kortisolkonzentration (Least Square Means (LSM); ng/ml; 95% – Konfidenzband) im Blut, als Polynom dritten Grades und in der Tränenflüssigkeit als Polynom zweiten Grades bei 13 Schafen während des zeitlichen Ablaufs der simulierten Klauenbehandlung: Minute 0: Beginn der Probenentnahme; Min 10: Umlegen und Fixieren der Tiere in Rückenlage; Min 20: Durchführung der retrograden intravenösen Stauungsanästhesie mit Placebo; Min 30: Durchführung der simulierten Klauenbehandlung; Min 40: Aufstellen des Tieres aus der Rückenlage; Min 60: Probenentnahme im Stallabteil; nach jeder Manipulation wurde eine Probe entnommen a...e Mit Hochbuchstaben gekennzeichnete Konzentrationen innerhalb einer Matrix unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

von Tränenflüssigkeit, Speichel und Kot erfolgte nicht-invasiv und die Blutentnahme erfolgte wiederholt über einen, vor Studienbeginn implantierten, VVK. Es wurde besonderer Wert daraufgelegt, dass der VVK durch erfahrene Fachtierärzte so schmerz- und stressarm wie möglich implantiert wurde. Die Probenentnahme erfolgte immer in der gleichen Reihenfolge, durch die gleiche Person und zur gleichen Tageszeit. Dies dient der Vermeidung von inter-Untersucher-Einflüssen und tageszeitlichen Schwankungen der KoK bzw. KmK.^{3,19,28} Bei vier Schafen traten ab Tag 5 (Tier 1) bzw. ab Tag 6 (Tier 2, 3, 4) Komplikationen bei der Blutentnahme auf. Auf die vermehrte Manipulation bei der Blutentnahme reagierten diese Tiere mit einem Anstieg der KoK im Blut. Die Implantation eines VVK ist üblich, allerdings sind Komplikationen (z. B. Thrombophlebitis) möglich.^{26,20} Aus eigenen Untersuchungen ist bekannt, dass eine Thrombophlebitis neben der Konzentrationserhöhung der Blutmerkmale für Entzündung²⁹ auch hochgradig schmerzhaft ist. Bei dem Vorliegen einer Thrombophlebitis können Schmerzen bei der Blutentnahme oder durch eine längere Manipulation den Stress bei der Probenentnahme erhöhen.^{26,1}

Aus diesem Grund wurde die KoK der Tiere mit Komplikationen separat ausgewertet. Erfolgt die Blutentnahme über einen VVK, sollten die Tiere, wie in der vorliegenden Studie, täglich klinisch untersucht bzw. überwacht und beim Vorliegen von Komplikationen gesondert betrachtet werden. Da die KoK aller Matrices an den Tagen 1–4 bei den Tieren mit und ohne Komplikationen analog verliefen, wurden die KoK der Tiere erst bei Auftreten der Komplikationen separat betrachtet. Die Entnahme von Kot-, Tränenflüssigkeit- und Speichelproben wird beim Schaf ähnlich wie bei Rind und Pferd als stressarme, nicht-invasive Probenentnahmetechnik beschrieben.^{36,48,1} In der vorliegenden Studie war die Entnahme von Tränenflüssigkeit, Speichel und Kot problemlos durchführbar und es traten keine Komplikationen auf. Dagegen traten bei der Blutentnahme trotz der Verwendung von Venenverweilkathetern und des ruhigen Umgangs mit den Tieren durch erfahrene Tierärztinnen Komplikationen, die mit einer Stressantwort der Tiere einhergingen, auf.

Der Erhalt der Funktionsfähigkeit der VVK über einen längeren Zeitraum bei Tieren, die sich in der Herde frei

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

Tabelle 4: Mittels Polynomregression berechnete Fläche unter der Kurve (AUC) ± Standardfehler (SE), maximale Kortisolkonzentration (KoK) ± SE und Zeitpunkt der maximalen KoK ± SE mit Korrelation nach Pearson (p-Werten) im Blut und in der Tränenflüssigkeit bei 13 Schafen während des zeitlichen Ablaufs der simulierten Klauenbehandlung am Tag 4

	Blut	Tränenflüssigkeit	Korrelation (mit p-Werten)
AUC [ng/ml × Min ± SE]	47,1 ^a ± 3,2	6,3 ^b ± 0,7	0,6 (p = 0,04)
Maximale KoK (max. K) [ng/ml ± SE]	57,3 ^a ± 3,5	9,0 ^b ± 0,8	0,6 (p = 0,02)
Zeitpunkt der maximalen KoK (max. Zp) [Min ± SE]	36,9 ^a ± 3,5	48,3 ^b ± 2,6	0,5 (p = 0,08)

^{a,b}Mit Hochbuchstaben gekennzeichnete AUC, maximale KoK und Zeitpunkt der maximalen KoK im Intervall von 0 bis 60 zwischen den Matrices unterscheiden sich signifikant ($p_{AUC,max K} \leq 0,01$; $p_{max. Zp} \leq 0,05$).

Tabelle 5: Kortisolkonzentration im Blut und in der Tränenflüssigkeit (Least Square Means (LSM) ± Standardfehler; ng/ml) bei 13 Schafen an den Tagen 1–4 bei der Probenentnahme in Rückenlage und zu Beginn der simulierten Klauenbehandlung (Tag 4, Minute 0) bei der Probenentnahme am stehenden Tier

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 4 Minute 0
Probenentnahme	Rückenlage	Rückenlage	Rückenlage	Rückenlage	stehend
Blut [ng/ml]	44,7 ^a ± 3,8	37,5 ^a ± 3,8	38,7 ^a ± 3,8	37,8 ^a ± 3,8	17,8 ^b ± 3,8
Tränenflüssigkeit [ng/ml]	2,0 ^a ± 0,3	2,1 ^a ± 0,3	2,3 ^a ± 0,4	2,2 ^a ± 0,3	1,0 ^b ± 0,2

^{a,b}LSM von Blut und Mediane der Tränenflüssigkeit, gekennzeichnet mit unterschiedlichen Buchstaben, unterscheiden sich signifikant ($0,01 < p < 0,05$).

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

bewegen, stellt eine Herausforderung dar. In der vorliegenden Studie wurde eine Technik verwendet, welche bereits in Versuchen unter Praxisbedingungen bei Kälbern und Kühen erfolgreich angewendet wurde.^{19,27} Allerdings traten, im Vergleich zu diesen Studien bei Kälbern und Kühen, in der vorliegenden Studie bei den Schafen mehr Thrombophlebitiden auf. Es ist vorstellbar, dass die Fixation der Schafe im Kippstand eine besondere Belastung für die implantierten Katheter darstellt. Vor allem die mit der Manipulation einhergehende Abwehrreaktion der Tiere während des Ablegens oder in Rückenlage¹¹ führen zu besonderer, mechanischer Reizung der Implantationsstellen. Dagegen erfolgte die Probenentnahme bei Heinrich et al. (2020)¹⁹ sowie Kretschmann et al. (2020)²⁷ am stehenden Tier ohne zusätzliche Reizung der Implantationsstelle. Das sollte in zukünftigen Studien Beachtung finden.

Bei Untersuchungen an Schafen, in welchen ausschließlich die Stressantwort auf Basis der KoK geprüft werden soll, sind nichtinvasiv entnommene Matrices, wie Tränenflüssigkeit und Speichel, der invasiven Blutentnahme vorzuziehen.¹⁵ Zukünftige Studien können sich nach Veröffentlichung des Manuskriptes auf die vorliegenden Ergebnisse beziehen und ggf. auf eine invasive Blutprobenentnahme verzichten.

Während die Kotprobenentnahme am stehenden Tier erfolgte, wurden die Schafe für die tägliche Entnahme von Tränenflüssigkeit, Speichel und Blut im Kippstand in Rückenlage fixiert. Eine Ausnahme davon stellte die Probenentnahme von Tränenflüssigkeit und Blut am Tag 4 vor Beginn der sKB (Min 0) dar. Dabei diente die sKB als Modell, um den Stress der Schafe während der Fixation im Kippstand zur Diagnostik und Versorgung

von komplizierten Klauenlederhautdefekten darzustellen. Die Fixation in einem Kippstand in Rückenlage hat sich für die Durchführung zootechnischer Maßnahmen bei Schafen bewährt.²⁵ Trotzdem stellen die Isolation der Tiere von der Herde, die Fixation sowie die Manipulation durch den Menschen erhebliche Stressoren für die Tiere dar.^{17,11} In der vorliegenden Studie erfolgte die wiederholte Probenentnahme sicher und ohne Verletzungen bei Menschen und Tieren. Allerdings stellte besonders das Verbringen der Tiere in Rückenlage einen massiven Stressreiz dar. Die höhere KoK in Tränenflüssigkeit und Blut am Tag 4 in Rückenlage (morgens) im Vergleich zu den KoK der Matrices, welche im Stehen (Tag 4, Min 0) gewonnen wurden, verdeutlichen, dass die Fixation in Rückenlage als Stressmodell geeignet ist.

Die Schafe reagierten auf die gesetzten Stressoren im Stressmodell mit einem Anstieg der KoK in den Matrices Tränenflüssigkeit und Blut. Die KoK der Tränenflüssigkeit lag dabei zu jedem Messzeitpunkt niedriger als die KoK des Blutes und reagierte mit zeitlicher Verzögerung. Die niedrigere KoK der Tränenflüssigkeit im Vergleich zur KoK im Blut sowie der zeitliche Versatz wurden bisher bei Rind und Pferd ermittelt.^{31,19} Der zeitlich versetzte Anstieg der KoK der Tränenflüssigkeit sollte in zukünftigen Studien bei der Befundinterpretation berücksichtigt werden. Unter Beachtung dessen, eignet sich die KoK der Tränenflüssigkeit analog der im Blut sehr gut zur Darstellung der akuten Stressantwort.

An den Tagen vor der sKB wurden keine signifikanten Änderungen der KoK bzw. KmK ermittelt. Die Korrelation zwischen den KoK der Matrices Tränenflüssigkeit und Speichel und der KoK im Blut war stärker als die Korrelation zwischen der KmK im Kot und der

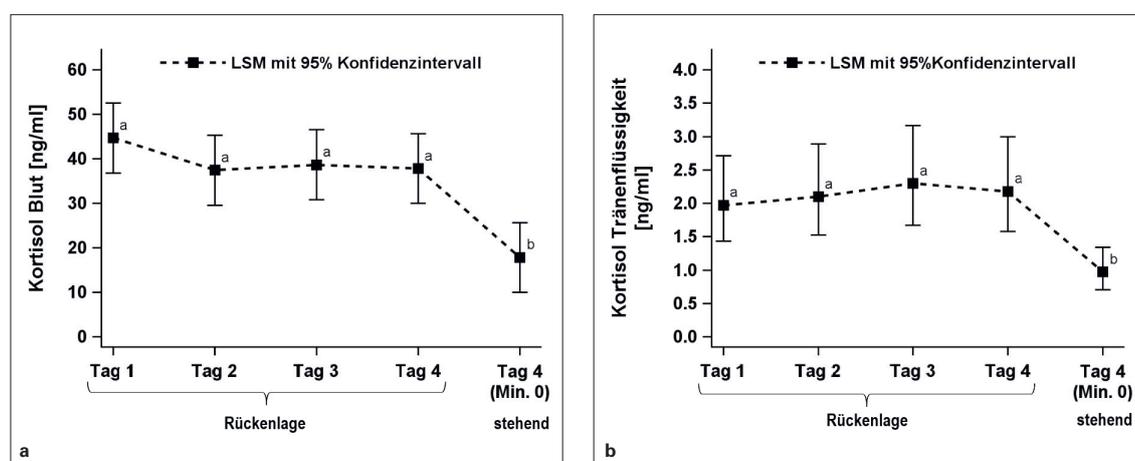


Abbildung 7 a–b: Verlauf der Kortisolkonzentration (Least Square Means (LSM); ng/ml; 95% – Konfidenzintervall) bei 13 Schafen: a – im Blut, b – in der Tränenflüssigkeit an den Tagen 1–4 in Rückenlage und zu Beginn der simulierten Klauenbehandlung (Tag 4, Minute 0) am stehenden Tier ^{a,b}Mit Hochbuchstaben gekennzeichnete Konzentrationen innerhalb einer Matrix unterscheiden sich signifikant (0,01 < p < 0,05).

KoK im Blut (Tabelle 2). Analoge Verläufe der KoK von Speichel und Blut sind beim Schaf und hinsichtlich der KoK von Tränenflüssigkeit und Blut beim Pferd und Rind beschrieben.^{48,22,31} Die KmK im Kot korreliert beim Schaf durch den zeitversetzten Anstieg weniger stark mit der KoK im Blut.³⁰ Die Adaptation an die täglichen Manipulationen, gekennzeichnet durch den Abfall der KoK bzw. KmK, ist beim Rind innerhalb von vier Tagen beschrieben.¹⁹ Ihre Dauer ist abhängig von der Dauer und Art des Stressors sowie tierindividuellen Gegebenheiten.¹⁶ Während v.a. Pferde, aber auch Rinder an Manipulationen und Fixation im Zuge von Untersuchungen und Pflegemaßnahmen (z. B. Gewöhnung an die Hufpflege bzw. Klauenbehandlung) gewöhnt werden, sind Schafe diesbezüglich häufig unerfahren.^{39,41,4} Das Ausbleiben des Abfalls der KoK zeigt, dass sich die Schafe der eigenen Untersuchungen innerhalb der vier Tage noch nicht an den Stressreiz „Fixation in Rückenlage“ inklusive der damit verbundenen Manipulationen gewöhnen konnten. Die gewählte Adaptationszeit war für den gesetzten Stressreiz offenbar zu kurz. Der numerische Abfall der KmK im Kot an den Tagen vor der sKB (Tag 1–4) könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Adaptation bei den Schafen bereits begann. Andanson et al. (2020) ermittelte für die tägliche Punktion der Vena jugularis externa bei Schafen eine Adaptationszeit von acht Tagen.¹ Bei zukünftigen Studienplanungen sollten bereits publizierte Adaptationszeiten bei Schafen sowie das gewählte Stressmodell berücksichtigt werden.

Am Tag nach der sKB (Tag 5) lag die KmK im Kot über der vor dieser Manipulation. Im Kot kann die maximale KmK erst 12 Stunden nach einem Stressreiz gemessen werden.³⁵ Durch den Zeitversatz wird die Stressantwort auf die sKB am Vortag im Kot erst an Tag 5 sichtbar. Dieser Zeitversatz muss bei der Befundinterpretation berücksichtigt werden. Da stressige Ereignisse bei Schafen noch Monate später zu Aversionen führen,^{40,44} kann bei dieser Tierart von einem Stressgedächtnis ausgegangen werden. In der vorliegenden Untersuchung war in den Matrices Speichel und Tränenflüssigkeit lediglich ein numerischer Anstieg der KoK am Tag nach der sKB zu verzeichnen. Offenbar überlagerte sich der erneut gesetzte Reiz des Ablegens der Tiere ohne bereits erfolgte Adaptation mit der Erinnerung an die Manipulationen des Vortages.

Die Schafe mit Komplikationen reagierten bereits am Tag des erstmaligen Auftretens der pathologischen Befunde mit einer Erhöhung der KoK im Blut. Sie lag über der von Tieren ohne Komplikationen (ab Tag 5). Dabei führte der kurz einwirkende Stressor der Blutentnahme bereits zu einem Anstieg der KoK im Blut. Es wäre aber auch zu vermuten, dass der im Rahmen

des Kippens der Schafe an der Vene bzw. dem VVK ausgelöste Schmerzreiz dies auslöste. Da die Tränen- und Speichelprobenentnahme vor der Blutprobenentnahme erfolgte, und deren Anstieg ohnehin offenbar zeitversetzt zur KoK im Blut erfolgt, war die KoK in der Tränenflüssigkeit und im Speichel am Tag 5 zwischen den Tieren mit und ohne Komplikationen analog. Es kann also davon ausgegangen werden, dass am Vortag zum Zeitpunkt der Tränen und Speichelprobenentnahme noch kein schmerzhafter, stressauslösender Insult vorlag. Trotzdem waren am darauffolgenden Tag (Tag 6) die KoK auch in der Tränenflüssigkeit und im Speichel bei den Tieren mit Komplikationen höher als bei den Tieren ohne Komplikationen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Schafe mit Komplikationen an die stressige Manipulation des vorherigen Tages erinnerten.

Schlussfolgerung

Das Ablegen inklusive der Fixation der Schafe im Kippstand mit sKB ist als Stressmodell geeignet. Berücksichtigt man den Zeitverzug im Anstieg der KoK in der Tränenflüssigkeit und im Speichel bzw. der KmK im Kot gegenüber der im Blut bei der Befundinterpretation, so stellen die Matrices Tränenflüssigkeit, Speichel und Kot geeignete, nichtinvasiv entnommene Alternativen zur Matrix Blut zur Erfassung der Stressantwort beim Schaf dar. Eine Gewöhnung der Schafe an die gewählte, stressauslösende Manipulation bedarf einer über vier Tage hinausgehenden Adaptationsphase. Die erhöhten KoK in Tränenflüssigkeit und Speichel bei Tieren mit schmerzhaften Komplikationen während der Blutprobenentnahme geben Hinweise auf das Vorhandensein eines Stressgedächtnisses der Schafe. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen belegen, dass in Studien, welche die Stressantwort bei Schafen auf Basis der KoK erfassen, nichtinvasiv entnommene Matrices, wie die Tränenflüssigkeit, genutzt werden können.

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Danksagung

Unser Dank gilt der Bayer Animal Health GmbH für die finanzielle Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt den teilnehmenden Tierärzten und Tierärztinnen, Kollegen und Kolleginnen sowie dem Schäferiebetrieb Dirk Papendieck.

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

Concentrations de cortisol chez les moutons avant, pendant et après le parage fictif des pieds sur une table basculante - l'adéquation de différentes matrices

Les marqueurs qui peuvent être collectés de manière non invasive pour quantifier une réponse au stress chez le mouton ont fait l'objet de peu d'attention dans la littérature vétérinaire. Cette étude examine la pertinence du sang, des larmes et de la salive pour déterminer une réponse au stress chez des moutons subissant un parage fictif des pieds sur une table basculante. La concentration de cortisol dans le sang, les larmes et la salive ainsi que la concentration de métabolites de cortisol dans les fèces ont été mesurées chez 13 brebis Meat Merino saines une fois par jour pendant six jours. Le parage fictif des pieds sur une table inclinable a été utilisé comme facteur de stress et a été effectué pendant une période d'une heure le jour 4; les concentrations de cortisol dans le sang et les larmes ont été mesurées à 0, 10, 20, 30, 40 et 60 minutes. Les concentrations de cortisol dans le sang (maximum à 30 minutes) et les larmes (maximum à 40 minutes) ont augmenté au cours de la procédure puis ont diminué. Il y avait des corrélations significatives entre les concentrations de cortisol dans le sang et les larmes ($p = 0,04$) lors du parage fictif des onglons (aire sous la courbe, 0 à 60 minutes). Sur l'ensemble de la période d'étude de 6 jours, des corrélations significatives ont été observées entre les concentrations de cortisol dans le sang et les larmes ($r = 0,55$; $p < 0,001$), le sang et la salive ($r = 0,53$; $p < 0,001$) et les larmes et la salive ($r = 0,78$; $p < 0,001$). La concentration fécale de métabolites de cortisol était significativement augmentée au jour 5 ($p 0,05$), mais la concentration de cortisol des autres supports n'a pas changé de manière significative au cours de la période d'étude de 6 jours. Le parage fictif des pieds sur une table basculante a été considéré comme un facteur de stress aigu chez les moutons en raison de l'augmentation des concentrations de cortisol dans le sang, des larmes et de l'augmentation des concentrations de métabolites de cortisol dans les selles. La concentration de cortisol dans les larmes était similaire à celle du sang et, par conséquent, la collecte de larmes représente une alternative viable et non invasive au sang pour les tests de cortisol. Le délai des pics entre la concentration maximale de cortisol dans les larmes et le sang doit être pris en compte lors de l'interprétation des résultats.

Mots clés: sang, selles, non invasif, salive, stress, larmes

Concentrazioni di cortisolo nelle pecore prima, durante e dopo il trattamento simulato degli zoccoli su un tavolo inclinato – idoneità di diverse matrici

Le matrici che possono essere raccolte in modo non invasivo per registrare la risposta allo stress nelle pecore sono state poco studiate finora. Nel presente studio, è stata studiata l'idoneità di diverse matrici per la registrazione di una risposta allo stress. Il trattamento simulato della cura degli zoccoli su un tavolo inclinato è servito come modello di stress. La concentrazione di cortisolo nelle matrici di sangue, di liquido lacrimale e di saliva, così come la concentrazione dei metaboliti del cortisolo nelle feci sono state misurate una volta al giorno per sei giorni in 13 pecore da carne Merino sane. Il giorno 4, il trattamento simulato della cura degli zoccoli ha avuto luogo su di un tavolo inclinato, durante il quale è stata registrata la concentrazione di cortisolo nel sangue e nel liquido lacrimale (minuto 0, 10, 20, 30, 40, 60). Durante il trattamento simulato degli zoccoli, la concentrazione di cortisolo nel sangue (massimo: minuto 30) e nel liquido lacrimale (massimo: minuto 40) è aumentata e poi diminuita. Nel corso del trattamento simulato dello zoccolo (area sotto la curva, minuto 0 - 60), le concentrazioni di cortisolo del sangue e del liquido lacrimale hanno mostrato correlazioni significative ($p = 0,04$). Una correlazione significativa è stata trovata tra le concentrazioni di cortisolo nel sangue e nel liquido lacrimale ($r = 0,55$; $p < 0,001$), sangue e saliva ($r = 0,53$; $p < 0,001$) e liquido lacrimale e saliva ($r = 0,78$; $p < 0,001$) durante i sei giorni. La concentrazione dei metaboliti del cortisolo nelle feci ha mostrato un aumento significativo il giorno 5 rispetto al giorno 4 ($p \leq 0,05$), mentre non ha mostrato alcun cambiamento significativo nei giorni rimanenti. Nessun cambiamento significativo nelle concentrazioni di cortisolo è stato rilevato nelle altre matrici durante i sei giorni. Il trattamento simulato della cura degli zoccoli sul tavolo inclinabile rappresenta uno stimolo di stress acuto per le pecore, che può essere registrato con l'aiuto delle concentrazioni di cortisolo nel sangue e nel liquido lacrimale, o la concentrazione dei metaboliti del cortisolo nelle feci. Tenendo conto del ritardo temporale, il fluido lacrimale della matrice riflette l'andamento della concentrazione di cortisolo nel sangue durante il trattamento simulato della cura degli zoccoli e rappresenta quindi un'alternativa non invasiva.

Parole chiave: Sangue, feci, non invasivo, saliva, stress, liquido lacrimale

Literaturnachweis

- ¹ Andanson S, Boissy A, Veissier I: Conditions for assessing cortisol in sheep: the total form in blood v. the free form in saliva. *Animal*. 2020; 14(9): 1916-1922. doi:10.1017/S1751731120000695
- ² Baumgartner W: Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere. 8. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart. 2014; 43-190; 216-280.
- ³ Beausoleil NJ: Behavioural and physiological responses of domestic sheep (*Ovis aries*) to the presence of humans and dogs. Phd Thesis: Massey University Palmerston North New Zealand, 2006.
- ⁴ Beaver BV, Höglund DL: Efficient Livestock Handling. The Practical Application of Animal Welfare and Behavioral Science. Academic Press, London, Großbritannien, 2016: 81-122
- ⁵ Cook CJ, Jacobson LH: Salivary cortisol as an indicator of stress in sheep (*Ovis ovis*). *New Zeal Vet J*. 1995; 43(6): 248. doi:10.1080/00480169.1995.35902
- ⁶ Cook NJ.: Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Can J Anim Sci*. 2012; 92(3): 227-259. doi:10.4141/cjas2012-045
- ⁷ Deinhofer G: Tiergesundheit Teil 4: Klauenpflege und Klauenprobleme. Österreichischer Bundesverband für Schafe und Ziegen, Wien. 2008.
- ⁸ Fell LR, Shutt DA, Bentley CJ: Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma «free» cortisol arising from acute stress in sheep. *Aust Vet J*. 1985; 62(12): 403-406. doi:10.1111/j.1751-0813.1985.tb14120.x
- ⁹ Fieseler H, Weck R, Kaiser M, Müller H, Spilke J, Mielenz N, Möbius G, Starke A: Erfassung und Bewertung von akutem und chronischem Schmerz anhand ethologischer Merkmale bei weiblichen Merinofleischschafen. *Tierarztl Prax G N*. 2018; 46: 229-240. doi:10.15653/TPG-180029
- ¹⁰ Fieseler H, Weck R, Kaiser M, Müller H, Spilke J, Mielenz N, Möbius G, Starke A: Bewertung verschiedener Methoden des Schmerzmanagements während der Behandlung von Klauenlederhaut-Läsionen bei weiblichen Merinofleischschafen. *Tierarztl Prax G N*. 2019; 47: 213-222. doi:10.1055/a-0947-8428
- ¹¹ Fieseler H: Bewertung verschiedener Methoden des Schmerzmanagements anhand ethologischer Merkmale während der Behandlung von Klauenlederhaut – Läsionen bei weiblichen Merinofleischschafen. Diss med vet: Universität Leipzig, 2020.
- ¹² Fukasawa M, Tsukada H, Kosako T, Yamada A: Effect of lactation stage, season and parity on milk cortisol concentration in Holstein cows. *Livest Sci*. 2008; 113(2): 280-284. doi:10.1016/j.livsci.2007.05.020
- ¹³ Gohary GS, Bickhardt K: Der Einfluss des Blutentnahmestresses auf Blutmesswerte des Schafes. *Deut Tierarztl Woch*. 1979; 86(6): 225-228.
- ¹⁴ Greco D, Stabenfeldt GH. Endocrinology. In: Cunningham JG. (eds.), *Textbook of Veterinary Physiology*. W.B. Saunders Company, Pennsylvania, 2013: 359-406.
- ¹⁵ Gundlach NH, Piechotta M, Siebert U: Is lachrymal fluid a potential method for cortisol measurement in wild harbor seals? A pilot study. *Int J Vet Med*. 2014: Article ID 967043: 1-12. doi:10.5171/2014.967043
- ¹⁶ Hargreaves AL, Hutson GD: Some effects of repeated handling on stress responses in sheep. *Appl Anim Behav Sci*. 1990a; 26(3): 253-265. doi:10.1016/0168-1591(90)90141-Y
- ¹⁷ Hargreaves AL, Hutson GD: Handling systems for sheep. *Livest Prod Sci*. 1997; 49(2): 121-138. doi:10.1016/S0301-6226(97)00009-2
- ¹⁸ Hart KA, Kitchings KM, Kimura S, Norton NA, Myrna KE: Measurement of cortisol concentration in the tears of horses and ponies with pituitary pars intermedia dysfunction. *Am J Vet Res*. 2016; 77(11): 1236-1244. doi:10.2460/ajvr.77.11.1236
- ¹⁹ Heinrich M, Müller H, Fieseler H, Steiner A, Gottschalk J, Einspanier A, Spilke J, Mielenz N, Palme R, Baumgartner W, Möbius G, Starke A: Kortisolkonzentration bei Deutsch-Holstein-Kühen vor, während und nach der Klauenbehandlung im Durchtreibestand – Eignung verschiedener Matrices. *Tierarztl Prax G N*. 2020; 48(5): 291-300. doi:10.1055/a-1261-6583
- ²⁰ Hopster H, van der Werf JT, Erkens JH, Blokhuis HJ: Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-loused dairy cows. *J Anim Sci*. 1999; 77(3): 708-714. doi:10.2527/1999.773708x
- ²¹ Hutson GD: The influence of barley food rewards on sheep movement through a handling system. *Appl Anim Behav Sci*. 1985; 14(3): 263-273. doi:10.1016/0168-1591(85)90007-3
- ²² Khraim MN: Effects of dexamethasone and training on the hypothalamic-pituitary-adrenal response on mild stress challenge in dairy cows. Diss med vet: Tierärztliche Hochschule Hannover, 2011.
- ²³ Kilgour R, de Langen H: Stress in sheep resulting from management practices. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 1970; 30: 65-76.
- ²⁴ Kirschbaum C, Hellhammer DH: Salivary Cortisol. In: Fink G, *Encyclopedia of Stress*. Academic Press, San Diego, CA, 2000; 3: 379-384.
- ²⁵ Kofler J: Klauenpflege bei Schaf und Ziege. *Klauentierpraxis*. 2016; 24(2): 61-68.
- ²⁶ Kraetzl WD, Weiler U: Erfahrungen mit einem implantierbaren Kathetersystem zur frequenten und chronischen Blutentnahme bei Schafen in Gruppenhaltung und bei säugenden Sauen. *Tierarztl Umschau*. 1998; 53: 567-574.
- ²⁷ Kretschmann J, Scherf L, Fischer ML, Kaiser M, Müller H, Spielke J, Mielenz N, Möbius G, Bittner L, Steinhöfel I, Baumgartner W, Starke A: Einfluss der thermischen Enthornung mit unterschiedlichem Schmerzmanagement auf die Gesundheit von Kälbern. *Tierarztl Prax G N*. 2020; 48: 318-326. <https://doi.org/10.1055/a-1229-8393>
- ²⁸ Lane J: Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress animals?. *Anim Welfare*. 2006; 15(4): 331-342.

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

Kortisolkonzentrationen bei Schafen vor, während und nach der simulierten Klauenbehandlung im Kippstand – Eignung verschiedener Matrices

R. Wagner et al.

- ²⁹ Leonhardt A-S, Müller H, Heinrich M, Zoldan K, Hoffmann A, Lehmann J, Bittner L, Starke A: Haptoglobin concentration in various inflammatory diseases in German Holstein cows under field conditions, Poster, 43th Leipzig Continuing Education, Germany, 2018
- ³⁰ Miller MW, Hoobs NT, Sousa MC: Detecting stress responses in Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*): Reliability of cortisol concentrations in urine and feces. *Can J Zool.* 1991; 69(1): 15-24. doi:10.1139/z91-003
- ³¹ Monk CS, Hart KA, Berghaus RD, Norton NA, Moore PA, Myrna KE: Detection of endogenous cortisol in equine tears and blood at rest and after simulated stress. *Vet Ophthalmol.* 2014; 17 Suppl 1: 53-60. doi:10.1111/vop.12128
- ³² Möstl E, Palme R: Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrin.* 2002; 23(1-2): 67-74. doi:10.1016/S0739-7240(02)00146-7
- ³³ Möstl E, Maggs JL, Schrötter G, Besenfelder U, Palme R: Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Vet Res Commun.* 2002; 26(2): 127-139. doi:10.1023/A:1014095618125
- ³⁴ Niezgota J, Bobek S, Wronska-Fortuna D, Wierzchos E: Response of sympatho-adrenal axis and adrenal cortex of short term resistant stress in sheep. *J Vet Med A.* 1993; 40(8): 631-638. doi:10.1111/J.1439-0442.1993.TB00677.X
- ³⁵ Palme R, Fischer P, Schildorfer H, Ismail MN: Excretion of infused 14C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim Reprod Sci.* 1996; 43(1): 43-63. doi:10.1016/0378-4320(95)01458-6
- ³⁶ Palme R, Robia Ch, Messmann S, Hofer J, Möstl E: Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: A non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wien Tierarztl Monat.* 1999; 86: 237-241.
- ³⁷ Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr SM, Möstl E: Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1040: 162-171. doi:10.1196/annals.1327.021
- ³⁸ Palme R: Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol Behav.* 2019; 199: 229-243. doi:10.1016/j.physbeh.2018.11.021
- ³⁹ Pesenhofer G, Palme R, Pesenhofer RM, Kofler J: Comparison of two methods of fixation during functional claw trimming - Walk-in crush versus tilt table - In dairy cows using faecal cortisol metabolite concentrations and daily milk yield as parameters. *Wien Tierarztl Monat.* 2006; 93: 288-294.
- ⁴⁰ Rushen J: Aversion of sheep to electro-immobilization and physical restraint. *Appl Anim Behav Sci.* 1986b; 15(4): 315-324. doi:10.1016/0168-1591(86)90124-3
- ⁴¹ Schilling AK, Reese S, Palme R, Erhard M, Wöhr AC: Stress assesment in small ruminants kept on city farms in Southern Germany: *J Appl Anim Welf Sci.* 2015; 18: 119-132. doi:10.1080/10888705.2014.1000457
- ⁴² Scoggins BA, Coghlan JP, Denton DA: ACTH-induced hypertension in sheep. In: de Jong W (eds.), *Handbook of Hypertension, Vol. 4: Experimental and Genetic Hypertension.* Elsevier, Amsterdam, 1984: 107-134
- ⁴³ Stubbsjøen SM, Bohlin J, Dahl E, Knappe-Poindecker M, Fjeldaas T, Lepschy M, Palme R, Langbein J, Ropstad E: Assessment of chronic stress in sheep (part I): The use of cortisol and cortisone in hair as non-invasive biological markers. *Small Ruminant Res.* 2015; 132: 25-31. doi:10.1016/j.smallrumres.2015.09.015
- ⁴⁴ Thorhallsdottir AG, Provenza FD, Balph DF: Food aversion learning in lambs with or without a mother: Discrimination, novelty and persistence. *Appl Anim Behav Sci.* 1987; 18(3-4): 327-340. doi:10.1016/0168-1591(87)90226-7
- ⁴⁵ Verkerk GA, Phipps AM, Carragher JF, Matthews LR, Stelwagen K: Characterization of Milk Cortisol Concentrations as a Measure of Short-Term Stress Responses in Lactating Dairy Cows. *Anim Welfare.* 1998; 7: 77-86.
- ⁴⁶ von Borell E: Stress and coping in farm animals. *Arch Tierzucht.* 2000; 43(3): 144-152
- ⁴⁷ Yardimci M, Sahin EH, Cetingul IS, Bayram I, Aslan R, Sengor E: Stress responses to comparative handling procedures in sheep. *Animal.* 2012; 7(1):143-150. doi:10.1017/S1751731112001449
- ⁴⁸ Yates DT, Yates LJ, Halalsheh RA, Wesley RL, Hallford DM, Ross TT: Comparison of serum and salivary cortisol in restrained ewe lambs after (Adrenocorticotrophic Hormone) ACTH administration. *J Vet Med Anim Health.* 2010; 2(4): 59-61. doi:10.5897/JVMAH.9000008

Korrespondenzadresse

Dr. Fanny Rachidi
Klinik für Klauentiere, Veterinärmedizinische Fakultät der
Universität Leipzig
An den Tierkliniken 11
DE-04103 Leipzig
Telefon: +49 341 9738320
E-Mail: Fanny.Ebert@vetmed.uni-leipzig.de