

# Kortisolkonzentration bei Deutsch-Holstein-Kühen vor, während und nach der Klauenbehandlung im Durchtreibestand – Eignung verschiedener Matrizes

## Cortisol concentration before, during and after sham foot trimming in German Holstein cows – the suitability of different matrices

### Autoren

Maria Heinrich<sup>1</sup>, Hendrik Müller<sup>1</sup>, Helena Fieseler<sup>1</sup>, Adrian Steiner<sup>2</sup>, Jutta Gottschalk<sup>3</sup>, Almuth Einspanier<sup>3</sup>, Joachim Spilke<sup>4</sup>, Norbert Mielenz<sup>4</sup>, Rupert Palme<sup>5</sup>, Walter Baumgartner<sup>6</sup>, Gerd Möbius<sup>7</sup>, Alexander Starke<sup>1</sup>

### Institute

- 1 Klinik für Klauentiere, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig
- 2 Wiederkäuferklinik, Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern, Bern, Schweiz
- 3 Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig
- 4 Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Arbeitsgruppe Biometrie und Agrarinformatik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
- 5 Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien, Österreich
- 6 Universitätsklinik für Wiederkäufer, Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien, Österreich
- 7 Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig

### Schlüsselwörter

Stress, Blut, Kot, Tränenflüssigkeit, Speichel, Milch

### Key words

Stress, blood, faeces, tears, saliva, milk

eingereicht 28.04.2020

akzeptiert 02.09.2020

### Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/a-1261-6583>

Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2020; 48: 291–300

© 2020. Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,

70469 Stuttgart, Germany

ISSN 1434–1220

### Korrespondenzadresse

Dr. Helena Fieseler  
Klinik für Klauentiere  
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig  
An den Tierkliniken 11  
04103 Leipzig  
[helena.fieseler@elancoah.com](mailto:helena.fieseler@elancoah.com)



Zusätzliches Material finden Sie unter  
<https://doi.org/10.1055/a-1261-6583>

### ZUSAMMENFASSUNG

**Ziel** Überprüfung, ob sich die Änderung der Kortisolkonzentration im Blut (KoB) von Milchkühen während eines akuten Stressreizes durch die Kortisolkonzentration im Speichel (KoS), in der Tränenflüssigkeit (KoTr) und in der Milch (KoM) und die Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot (KoK) nachvollziehen lässt.

**Material und Methoden** Bei 10 gesunden Deutsch-Holstein-Kühen diente eine simulierte Klauenbehandlung (sKB) im Durchtreibestand als Modell für eine akute Stresssituation. KoB, KoS, KoTr, KoM sowie KoK wurden einmal täglich über 10 Tage gemessen. Bei der an Tag 4 durchgeführten sKB wurden die KoB und KoTr (Minute 0, 15, 25, 30, 40, 50, 60, 80) und die KoK (Minute 480, 540, 600, 660) bestimmt.

**Ergebnisse** Während der sKB stiegen die KoB und KoTr (Maximum zu Minute 60) und fielen anschließend ab. Nach der sKB kam es zu einem Anstieg der KoK (Maximum zu Minute 660). Während der sKB korrelierten KoB und KoTr sowie KoK und KoTr signifikant und KoK und KoB tendenziell. Im gesamten Verlauf der sKB (Area under the Curve [AUC], Minute 0–80) zeigten KoB und KoTr eine signifikante Korrelation ( $p = 0,04$ ). Die KoB fiel von Tag 1 zu Tag 4 signifikant ab ( $p < 0,01$ ). An Tag 5 waren KoB ( $p = 0,03$ ) und KoK ( $p < 0,01$ ) signifikant höher. Der Verlauf der KoS und KoTr (Tag 1–10) spiegelte den KoB-Verlauf gut wider. Der Verlauf der KoK wies Parallelen, der von KoM einige Unterschiede zum Verlauf der KoB auf. Deutlich positive Korrelationen ergaben sich für den Zeitraum Tag 1–10 im

Vergleich von KoB und KoS ( $p = 0,002$ ) sowie von KoB und KoT ( $p = 0,002$ ).

**Schlussfolgerungen und klinische Relevanz** Die Gewinnung von Tränenflüssigkeit und Speichel stellt bei der Bestimmung der Kortisolkonzentration eine Alternative zur invasiven Blutentnahme dar. Ein ruhiger Umgang mit den Kühen führt zu einer geringeren Stressreaktion und kann somit das Tierwohl verbessern.

## ABSTRACT

**Objective** The objective of this study was to determine whether changes in cortisol concentration measured in blood serum (KoB) of cows exposed to an acute stressor shows a correlation to cortisol concentrations in saliva (KoS), tears (KoT) and milk (KoM) as well as the concentration of cortisol metabolites in feces (KoK).

**Materials and methods** In 10 healthy German Holstein cows, sham foot trimming (sKB) including the movement/fixation of the cows through/in a foot trimming chute was used as a model for acute stress. KoB, KoS, KoT, KoM and KoK were measured once a day for 10 days. During sKB, performed on day 4, KoB and KoT were measured at the initiation of foot trimming

(minute 0) as well as 15, 25, 30, 40, 50, 60 and 80 minutes later. Additionally, KoK was measured 480, 540, 600 and 660 minutes after the start of sKB.

**Results** KoB and KoT increased during sKB and reached a maximum at 60 minutes followed by a decrease. KoK increased after sKB and reached a maximum at 660 minutes. There was a significant correlation between KoB and KoT, KoK and KoB and a trend towards a significant correlation between KoK and KoT during sKB. KoB and KoT were significantly correlated (area under the curve, minute 0–10,  $p = 0.04$ ). KoB decreased significantly from day 1 to day 4 ( $p < 0.01$ ). On day, 5 KoB ( $p = 0.03$ ) and KoK ( $p < 0.01$ ) were significantly higher. KoS and KoT served as good proxies for KoB throughout the study, and KoK and KoB exhibited similar profiles. There were several differences between the profiles of KoM and KoB. During the 10-day measurement period, a significant positive correlation was detected between KoB and KoS ( $p = 0.002$ ) as well as between KoB and KoT ( $p = 0.002$ ).

**Conclusions and clinical relevance** The collection of tear fluid and saliva for determination of cortisol concentrations are non-invasive alternatives to blood sampling. Calm handling of cows may reduce their stress reaction and thus improve animal welfare.

## Einleitung

Der tägliche Umgang mit Rindern sowie notwendige zootecnische und Routinemaßnahmen im Produktionsalltag können für die Tiere stressauslösend sein [1][2][3][4][5]. Somit ist es unabdingbar, einen geeigneten Indikator zur Stresserfassung zu identifizieren. Das Verbringen und die Fixation von Kühen in einem Klauenbehandlungsstand sind mit Stress und einer Erhöhung der Kortisolkonzentration im Blut verbunden [6][7][8] und eignen sich daher als Modell für die Stressauslösung. Die Blutprobenentnahme stellt ebenfalls ein stressauslösendes Ereignis dar [3]. In aus Venenkathetern gewonnenen Proben lag die Basalkortisolkonzentration niedriger als in Proben, die mittels Venenpunktion entnommen wurden [8][13]. Sind Blutprobenentnahmen an mehreren Tagen oder mehrere Blutproben binnen weniger Stunden geplant, empfiehlt sich daher, einen Verweilkatheter zu legen [14]. Bei Verwendung eines Verweilkatheters müssen dessen Implantation, Pflege und Erhalt bedacht und an die Gegebenheiten im Betrieb angepasst werden [15]. Daher besteht die Notwendigkeit, nach alternativen Methoden zu suchen, mit denen sich geeignetes Probenmaterial zur Bestimmung der Kortisolkonzentration weniger invasiv und mit geringerem Stress gewinnen lässt als bei Verwendung eines Verweilkatheters [10][16]. Das Ziel der Studie war, die Eignung verschiedener Matrizes (Blut, Speichel, Tränenflüssigkeit, Milch und Kot) zur Erfassung der Stressantwort bei Milchkühen während einer simulierten Klauenbehandlung (sKB) als Stressmodell zu erfassen und die Konzentration von Kortisol (Blut, Speichel, Träne, Milch) bzw. dessen Metaboliten (Kot) zu vergleichen.

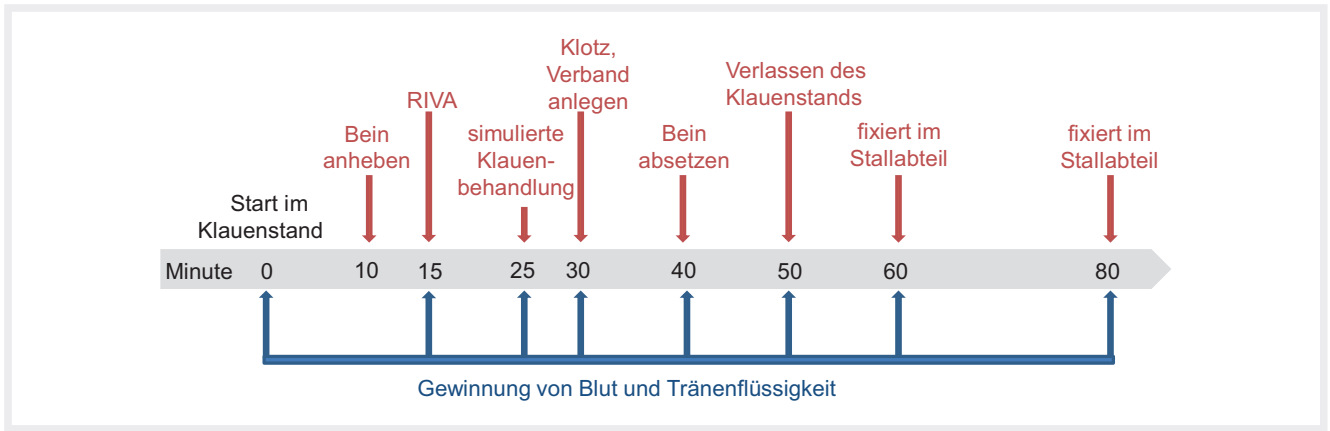
## Material und Methode

Die prospektive, randomisierte, kontrollierte Dreifachblindstudie wurde als Tierversuchsanzeige (Registriernummer 24–9168.21/4/30; A 30/12) von der Landesdirektion Sachsen, Referat 24 – Veterinärwesen und Lebensmittelüberwachung, Pharmazie, GMP Inspektorat, genehmigt. Einzelne Ergebnisse aus dem dazugehörigen Gesamtprojekt wurden bereits veröffentlicht [17][18][19].

## Studiendesign

Die Untersuchungen fanden in einem Milchviehbetrieb mit 800 melkenden Kühen statt. Alle 5 Monate erfolgte im Betrieb eine Klauenkorrektur und 2-mal wöchentlich wurden lahme Tiere durch einen Klauenpfleger behandelt. Bei den Probanden handelte es sich um 10 klinisch gesunde, lahmheitsfreie Deutsch-Holstein-Kühe in der 2. Laktation. Die Auswahl der Tiere erfolgte wie bei Nechanitzky et al. [19] beschrieben.

An Tag 0 wurde ein Verweilkatheter (WVI Jugularis-Katheter AD 2,4 mm Länge 20 cm mit Teflonkatheter, Walter Veterinär-Instrumente e. K., Baruth/Mark) in die linke V. jugularis externa implantiert und mit einer aufgeklebten Wundabdeckung geschützt. Die Untersuchungen, Probenentnahmen und Behandlungen aller Versuchstiere liefen stets nach dem gleichen Protokoll ab (► **Abb. S1**). An den Tagen 1–10 wurden die Kühe täglich beprobt und klinisch untersucht [20]. An Tag 2 wurde eine Klauenpflege [21] an 3 Gliedmaßen (beide Vordergliedmaßen sowie eine zugeordnete Hintergliedmaße) durchgeführt. Aufgrund des übergeordneten Studiendesigns erfolgte die sKB (Stressmodell) der zweiten Hintergliedmaße an Tag 4. Sie wurde von einem qualifizierten Lehrklauenpfleger nach einem zeitlich getakteten Ablauf durchgeführt (► **Abb. 1**).



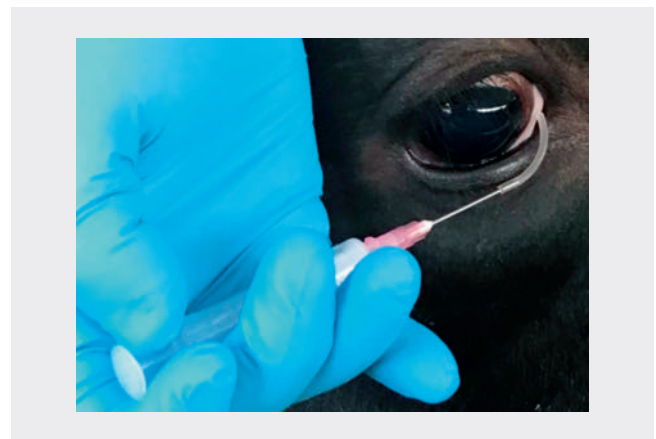
► **Abb. 1** Schematische Darstellung des Zeitplans der simulierten Klauenbehandlung. Zu jedem Zeitpunkt erfolgte die Manipulation im Anschluss an die Probenentnahme. Quelle: © M. Heinrich.

► **Fig. 1** Study design and standardized 80-minute sham foot trimming procedure on day 4 in 10 German Holstein cows. At each time point, blood and tear fluid were collected immediately preceding the scheduled foot trimming step. Source: © M. Heinrich.

Zu Beginn wurden die Kühe in den Klauenpflegestand geführt. Aufgrund des übergeordneten Studiendesigns wurde nach der ersten Probenentnahme (Minute 0) über den Venenverweilkatheter ein Placebo (2,5 ml/100 kg KM, Isotone NaCl-Lösung 0,9% Braun®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verabreicht. Anschließend wurde die distale Gliedmaße 5 Minuten lang mit körperwarmen Wasser abgedadet, in Minute 10 wurde es angehoben und fixiert. Zur Simulation der Anästhesie diente eine retrograde intravenöse Stauungsanästhesie (RIVA) [22] mit 20 ml Placebo (s. o.) (Minute 15) und 10 Minuten später startete die skB (Minute 25). Nach der Klauenpflege [21] an der Gliedmaße (Minute 25–30) wurde auf die Innenklaue ein Gummiklotz (Sächsischer Klauensohlengummi®, Genossenschaft Klauenpfleger eG Sachsen, Lohmen) geklebt, ein Verband angelegt (Minute 30–40) und dann die Gliedmaße heruntergelassen (Minute 40). Bis zur nächsten Probenentnahme verblieben die Tiere im Klauenbehandlungsstand (Minute 50). Anschließend wurden sie in ihr Stallabteil gebracht und für weitere Probenentnahmen (Minute 60 und 80) im Fressfanggitter fixiert. An Tag 7 wurden die Kühe erneut in den Klauenstand verbracht und der Verband entfernt.

## Probengewinnung

Die Probenentnahmen zur Bestimmung der Kortisolkonzentration in Blutserum (KoB), Speichel (KoS) und Tränenflüssigkeit (KoTr) sowie der Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot (KoK) erfolgten täglich zwischen 8.00 und 10.00 Uhr, an Tag 4 zwischen 5.00 und 7.00 Uhr. Aufgrund der nur schwach ausgeprägten zirkadianen Rhythmik von Kortisol [12] wurde der Zeitunterschied der Probenentnahmen zu Tag 4 als unproblematisch bewertet. Die Gewinnung von Milchproben zur Bestimmung der Kortisolkonzentration (KoM) fand täglich bei der Melkung um 14.00 Uhr statt. An Tag 4 erfolgten weitere Entnahmen von Blutproben und Tränenflüssigkeit (► **Abb. 1**; Minute 0, 15, 25, 30, 40, 50, 60, 80) sowie Kotproben (Minute 480, 540, 600, 660). Aufgrund des bekannten zeitlich versetzten Anstiegs der KoK wurden die Kotproben zu diesen Zeitpunkten entnommen [6][13]. Bei allen Probenentnahmen wurde auf die gleiche Reihenfolge (Tag 1–10: Blut, Speichel, Tränenflüs-



► **Abb. 2** Darstellung der Entnahme von Tränenflüssigkeit. Quelle: © M. Heinrich.

► **Fig. 2** Illustration of the collection of tear fluid. Source: © M. Heinrich.

sigkeit, Kot, Milch gesondert im Melkstand; Tag 4: Blut, Tränenflüssigkeit) und einen ruhigen Umgang mit den Tieren geachtet.

Die **Blutprobenentnahme** erfolgte aus dem Venenverweilkatheter. Bei einem Tier musste dieser an Tag 7 aufgrund einer paravenösen Phlegmone entfernt werden, wonach zur Blutentnahme die rechte V. jugularis externa punktiert wurde (Hypodermic Needle, 1,2 × 40 mm, Henry Schein®, Hamburg). Zur Entnahme der **Speichelproben** wurde eine Mullkomresse (7,5 × 7,5 cm, 8-fach, unsteril, Wilhelm Weisweiler GmbH & Co. KG, Münster) mit einer Kornzange gefasst, in das Maul des Tieres geführt und anschließend in ein Röhrchen (15 ml Cellstar® Polypropylen Röhrchen, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) verbracht. Zur Gewinnung von **Tränenflüssigkeit** (► **Abb. 2**) diente eine 2-ml-Spritze mit stumpf geschliffener Kanüle (Hypodermic Needle, s. o.), auf die ein 3,5 cm langes Stück des Kunststoffschlauchs eines Butterfly-Katheters (Venofix®, 21 G, 0,8 × 20 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) aufgeschoben wurde. Nach Platzierung des Schlauchendes im medialen Au-

genwinkel und Bindehautsack wurde Tränenflüssigkeit aspiriert und in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf Tubes® 3810X, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf) überführt. Zur **Milchprobenentnahme** wurden nach dem Vormelken und Reinigen der Zitzen aus jedem Viertel 3 ml Milch in ein Röhrchen (15 ml Cellstar® Polypropylen Röhrchen, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) gemolken. Bei der Entnahme der **Kotproben** mit einem Rektalhandschuh wurde nach Möglichkeit spontan abgesetzter Kot gewonnen, andernfalls eine Probe vorsichtig rektal entnommen.

### Probenanalyse

Alle Proben wurden bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Bestimmung der KoB, KoS, KoTr und KoM erfolgte mit einem labor-eigenen  $^3\text{H}$ -Radioimmunoassay (RIA), Label/Tracer: [1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]-Cortisol, Intra-Day und Inter-Day-Variationskoeffizient 6,5 % bzw. 7,8 %, Sensitivität 0,5 ng/ml für Blutserum, Speichel, Tränenflüssigkeit, Milch) modifiziert nach Abraham et al. [23]. Im Unterschied zu deren Studie wurde Blutserum statt Blutplasma genutzt und bei der Trennung von Eiweiß im Blutserum und Milch erfolgte eine Zentrifugation der Proben vor dem RIA (5 Minuten bei Raumtemperatur und  $3500 \times g$ ; Laborzentrifuge Rotanta, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen). Die Speichelproben wurden vor dem RIA 15 Minuten bei  $4000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  (Laborzentrifuge Rotanta, s. o.) zentrifugiert und der Überstand in Reaktionsgefäße abpipetiert und erneut bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Tränen- und Speichelproben wurden im RIA mit dem Assaypuffer 1:10 verdünnt eingesetzt. Für die Herstellung der Eichlösungen diente unmarkiertes Kortisol (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg). Die Inkubation des Antikörper-Hormon-Probengemisches erfolgte im Unterschied zu Abraham et al. [23] bei 4 Stunden im Eisbad. Die anschließende Trennung von freiem und antikörpergebundenem Hormon erfolgte durch Zugabe von  $500 \mu\text{l}$  Dextran-Aktivkohle-Suspension. Nach 15-minütigem Stehen im Eisbad und Zentrifugation bei  $3500 \times g$  für 10 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  (Laborzentrifuge Rotanta, s. o.) wurde der Überstand in Messgläschen abgegossen und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint® Mini, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) versetzt. Die Messung der gebundenen Aktivität erfolgte im Flüssigszintillationszähler (Tri-Carb® 2810TR Low Activity Liquid Scintillation Analyzer, Perkin Elmer, USA). Zur Ermittlung der Hormonkonzentration in den Proben diente die Auswertungssoftware Multicalc (Perkin Elmer, USA).

Die Bestimmung der KoK (11, 17-Dioxoandrostan) entsprach der Methodik von Palme et al. [13] sowie Palme und Möstl [24]. Zur quantitativen Bestimmung von 11, 17-Dioxoandrostan schloss sich an die Probenextraktion ein 11-Oxoätiocholanolon-Enzymimmunoassay an.

### Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SAS Version 9.4 (SAS Institute 2013, Cary, NC, USA), vorrangig unter Nutzung von Prozedur MIXED. Die Ergebnisse werden als Least Square Means (LSM) mit Standardfehler (SE) angegeben und in den Abbildungen findet sich eine Darstellung der LSM mit 95 %-Konfidenzintervall oder -Konfidenzband. Unterschiede bzw. Korrelationen galten als signifikant bei  $p < 0,05$  und als Trend bei  $0,05 \leq p < 0,1$ .

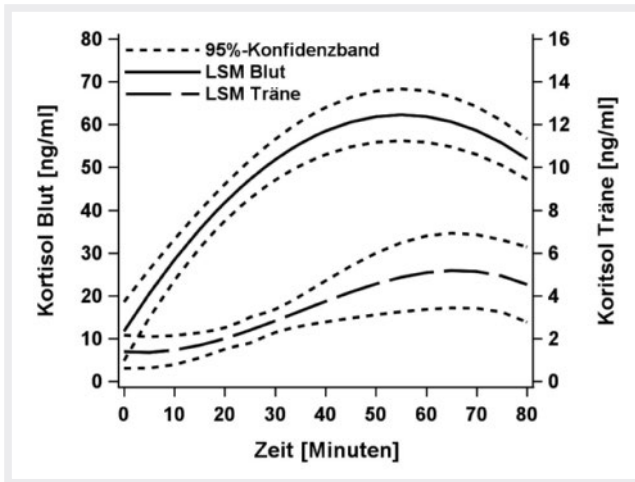
Die LSM stellen Schätzungen für die Mittelwerte der Stufen des Prüffaktors dar, wobei zur Berechnung die Methode der kleinsten Quadrate verwendet wird. Bei gleicher Klassenbesetzung und fehlender Messwiederholung fallen arithmetische Mittel und LSM zusammen. Bei wiederholten Messungen erfolgt bei der Berechnung von LSM zusätzlich eine Wichtung der Abweichungsquadrate unter Nutzung der geschätzten Korrelationsmatrix der wiederholten Beobachtungen pro Tier.

**KoB und KoTr sowie KoK während der Klauenbehandlung** Bei der Auswertung der KoB und KoTr wurde die Zeit als quantitative Einflussgröße aufgefasst und über eine Polynomregression im Modell berücksichtigt. Bei der Analyse der KoK wurde die Zeit als qualitative Einflussgröße interpretiert und über fixe Effekte im Modell berücksichtigt. Die Messwiederholungen pro Tier wurden über zufällige Tiereffekte abgebildet. Zusätzlich wurden für die Resteffekte der Beobachtungen eines Tieres bei Nutzung des REPEATED statement von Prozedur MIXED mit der TYPE Option folgende Korrelationsstrukturen geprüft: unstrukturiert, autoregressiv und Toeplitz-Struktur [25]. Die Auswahl der Korrelationsvariante für das finale Modell erfolgte mit dem Akaike- Informationskriterium (AIC) unter Verwendung der LogLikelihood der REML-Methode. Bei der Bestimmung des Polynomgrads in der Regressionsfunktion kam der F-Test in MIXED mit der Option htype = 1 zur Anwendung. Die Güte der Anpassung durch die Polynomregression wurde mit dem verallgemeinerten Bestimmtheitsmaß [26][27] überprüft.

Unter Verwendung von Polynomen 2. Grades für die KoB und 3. Grades für die KoTr wurden simultan tierspezifische Regressionsfunktionen angepasst. Aus der für jede Kuh geschätzten Regressionsfunktion wurden die folgenden 3 Merkmale abgeleitet: AUC (Area under the Curve) im Intervall von 0 bis 80,  $Y_{\text{MAX}}$  = maximale Konzentration in  $[0,80]$ ,  $T_{\text{MAX}}$  = Zeitpunkt der maximalen Konzentration in  $[0,80]$ . Der Programmcode kann bei den Autoren erfragt werden.

**KoB, KoS, KoTr und KoM sowie KoK vor und nach der Klauenbehandlung** Bei der statistischen Auswertung je Matrix wurden die Tage über fixe Effekte im Modell berücksichtigt. Die Messwiederholung wurde über zufällige Tiereffekte und korrelierte Resteffekte, wie bei den Minuten beschrieben, im Modell abgebildet.

Für alle Auswertungen kam der Shapiro-Wilk-Test zur Prüfung auf Normalverteilung zum Einsatz, angewendet auf die Residuen in den linearen gemischten Modellen. Die Forderung von Normalverteilung für die Residuen bei Anwendung des gewählten Auswertungsmodells ließ sich für KoM, KoS und KoK erst durch logarithmische Transformation einhalten. Die von der logarithmischen Skala in die Originalskala zurücktransformierten LSM stellen Schätzwerte für die Mediane in der Originalskala dar [28][29]. Bei der Durchführung der statistischen Tests (F-Test, multipler t-Test und Tukey-Test) wurden die Freiheitsgrade nach der Methode von Kenward und Roger [30] approximiert. Die Berechnung von Korrelationen zwischen den Matrizes zu den Prüfminuten und zu den Prüftagen erfolgte nach Pearson mit der Prozedur CORR. Pearson-Korrelationen wurden analog zwischen den abgeleiteten Merkmalen AUC,  $Y_{\text{MAX}}$  und  $T_{\text{MAX}}$  berechnet.



► **Abb. 3** Verlauf der Kortisolkonzentration (Least Square Means [LSM] mit 95%-Konfidenzband) im Blutserum (geschätzt durch Polynom 2. Grades) und in der Tränenflüssigkeit (geschätzt durch Polynom 3. Grades) bei 10 Deutsch-Holstein-Kühen während/nach der simulierten Klauenbehandlung im Behandlungsstand. Quelle: © M. Heinrich.

► **Fig. 3** Cortisol concentrations (least square means [LSM] with 95% confidence band) in serum (quadratic polynomial equation) and in tear fluid (cubic polynomial equation) during sham foot trimming on day 4 in 10 German Holstein cows. Source: © M. Heinrich.

## Ergebnisse

### KoB und KoTr sowie KoK während der Klauenbehandlung

Sämtliche KoB und KoTr sowie alle Korrelationen und dazugehörigen p-Werte von KoB, KoTr und KoK bei den 10 Deutsch-Holstein-Kühen sind in ► **Tab. S1**, ► **Tab. S2**, ► **Tab. S3** und ► **Tab. S4** dargestellt.

Die **KoB** lag zwischen  $11,7 \pm 3,0$  und  $61,9 \pm 2,7$  ng/ml, die **KoTr** zwischen  $1,38 \pm 0,3$  und  $5,08 \pm 0,8$  ng/ml (LSM  $\pm$  SE). Die niedrigsten Konzentrationen ergaben sich jeweils unmittelbar zu Beginn sämtlicher Manipulationen im Klauenbehandlungsstand (Minute 0). Darauf folgte in beiden Matrizes ein Anstieg bis zum Erreichen der Maximalwerte zu Minute 55 mit  $62,3 \pm 2,7$  ng/ml (KoB) bzw. Minute 66 mit  $5,18 \pm 0,8$  ng/ml (KoTr) bei Schätzung durch Polynomregression (LSM  $\pm$  SE, ► **Abb. 3**). In beiden Matrizes wurden 60 Minuten nach Verbringen in den Klauenstand, d. h. zum Zeitpunkt, als die Kühe wieder im Stallabteil waren, die höchsten Kortisolkonzentrationen bei Nutzung der LSM zu den 8 Prüfminuten festgestellt. Bis zur letzten Probenentnahme an diesem Tag (Minute 80) sanken die Kortisolkonzentrationen, erreichten jedoch nicht die Basalkonzentration von Minute 0 (► **Tab. S1**, ► **Abb. 3**).

Für die **KoK** wurden Werte zwischen  $183 \pm 44$  und  $266 \pm 44$  ng/g ermittelt (LSM  $\pm$  SE), wobei der niedrigste bei der ersten Messung (Minute 480) und der höchste bei der letzten Messung (Minute 660) vorlag (► **Tab. 1**). Zwischen den Minuten 480 und 540 ( $p = 0,09$ ) sowie 480 und 660 ( $p = 0,05$ ) wiesen die Werte tendenzielle Unterschiede auf.

Beim Vergleich des Verlaufs der KoB und der KoTr waren während der verschiedenen Manipulationen im Klauenbehandlungs-

► **Tab. 1** Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot (Least Square Means [LSM]  $\pm$  Standardfehler) bei 10 Deutsch-Holstein-Kühen nach der simulierten Klauenbehandlung.

► **Table 1** Cortisol metabolites in feces (least square means [LSM]  $\pm$  standard error) after sham foot trimming in 10 German Holstein cows.

| Zeitpunkt nach der Klauenbehandlung (Minuten) | Konzentration der Kortisolmetaboliten im Kot (ng/g) |
|---|---|
| 480   | 183 <sup>a</sup> $\pm$ 44                           |
| 540   | 256 <sup>b</sup> $\pm$ 44                           |
| 600   | 238 <sup>ab</sup> $\pm$ 44                          |
| 660   | 266 <sup>b</sup> $\pm$ 44                           |

LSM mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben kennzeichnen tendenzielle Unterschiede zwischen den zugehörigen Mittelwerten ( $0,05 \leq p < 0,1$ ).

stand deutliche Parallelen nachweisbar. In beiden Matrizes kam es zu einem initialen Anstieg bis zum Erreichen der Maximalwerte, gefolgt von einem Abfall bis zur letzten Probenentnahme (► **Abb. 3**). Zu mehreren Probenentnahmezeitpunkten ließen sich signifikante positive Korrelationen zwischen den Matrizes feststellen (Minute 0:  $r = 0,78$ ,  $p = 0,006$ ; Minute 60:  $r = 0,82$ ,  $p = 0,003$ , ► **Tab. S2**). Beim Vergleich der KoB und der KoK wurden tendenzielle Korrelationen erfasst (KoB Minute 40 und KoK Minute 540:  $r = 0,63$ ,  $p = 0,05$ ; KoB Minute 50 und KoK Minute 540:  $r = 0,56$ ,  $p = 0,09$ , ► **Tab. S3**). Signifikante Korrelationen zeigten sich beim Vergleich der KoTr und der KoK (KoTr Minute 30 und KoK Minute 540:  $r = 0,65$ ,  $p = 0,04$ ; KoTr Minute 40 und KoK Minute 660:  $r = 0,71$ ,  $p = 0,02$ ; ► **Tab. S4**).

Die Kortisolkonzentrationen aller 10 Kühe wiesen im gesamten Zeitraum (Minute 0–80, AUC) eine signifikante Korrelation ( $r = 0,66$ ;  $p = 0,04$ ) zwischen den Matrizes Blutserum und Tränenflüssigkeit auf. Die höchste signifikante Korrelation ( $r = 0,75$ ;  $p = 0,01$ ) bestand zwischen der maximalen Kortisolkonzentration ( $Y_{MAX}$ ) im Blutserum und in der Tränenflüssigkeit (► **Tab. 2**). Ebenso zeigte sich eine tendenzielle Korrelation für den Zeitpunkt der maximalen Kortisolkonzentration ( $T_{MAX}$ ) dieser beiden Matrizes ( $r = 0,58$ ;  $p = 0,08$ ). Für die Matrizes Blut und Kot sowie Tränenflüssigkeit und Kot konnten beim vorliegenden Stichprobenumfang keine signifikanten Korrelationen zwischen den abgeleiteten Parametern AUC,  $Y_{MAX}$  und  $T_{MAX}$  nachgewiesen werden (► **Tab. 2**).

### KoB, KoS, KoTr und KoM sowie KoK vor und nach der Klauenbehandlung

Bei den 10 Deutsch-Holstein-Kühen wurden vor und nach der sKB Konzentrationen (LSM) zwischen  $11,9$  und  $23,2$  ng/ml (KoB, SE = 2,6),  $1,7$  und  $2,7$  ng/ml (KoS, SE = 0,3–0,5),  $1,1$  und  $1,7$  ng/ml (KoTr, SE = 0,2),  $1,6$  und  $2,7$  ng/ml (KoM, SE = 0,3–0,5) bzw. zwischen  $38,6$  und  $88,9$  ng/g (KoK, SE = 5,6–13,4) bestimmt. Die KoB, KoS, KoTr und KoK zeigten bei der ersten Probenentnahme (Tag 1) die höchsten Werte. Alle LSM für die Parameter sind in ► **Tab. S5** dargestellt.

Die Verläufe der Kortisol(metaboliten)konzentration in den verschiedenen Matrizes wiesen einige Parallelen auf (► **Abb. 4**).



► **Tab. 2** Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) für die Fläche unter der Reaktionskurve (AUC), die maximale Konzentration ( $Y_{MAX}$ ) und den Zeitpunkt der maximalen Konzentration ( $T_{MAX}$ ) des Kortisols in Blutserum und Tränenflüssigkeit und für die Kortisolmetaboliten im Kot sowie Korrelationen nach Pearson (mit p-Werten) zwischen den Matrizes innerhalb von AUC,  $Y_{MAX}$  und  $T_{MAX}$  bei 10 Deutsch-Holstein-Kühen während/nach der simulierten Klauenbehandlung.

► **Table 2** Means ( $\pm$  standard error) for the area under the curve (AUC), for the maximum concentration ( $Y_{MAX}$ ) and for the time point of the maximum concentration ( $T_{MAX}$ ) of the cortisol concentration in blood and tear fluid and of the concentration of cortisol metabolites in feces and Pearson correlations (p-values) between body fluids/faeces within AUC,  $Y_{MAX}$  and  $T_{MAX}$  during/after sham foot trimming in 10 German Holstein cows.

|  | Fläche unter der Kurve (AUC) | Maximale Konzentration ( $Y_{MAX}$ ) | Zeit der maximalen Konzentration ( $T_{MAX}$ ) |
|--|------------------------------|--------------------------------------|--|
| Blutserum (ng/ml) <sup>1</sup>         | 49,0 $\pm$ 3,0               | 63,1 $\pm$ 4,2                       | 55,8 $\pm$ 2,5                                 |
| Tränenflüssigkeit (ng/ml) <sup>1</sup> | 4,8 $\pm$ 0,4                | 7,2 $\pm$ 0,7                        | 62,1 $\pm$ 3,6                                 |
| Kot (ng/g) <sup>2</sup>                | 240 $\pm$ 37                 | 336 $\pm$ 51                         | 588,0 $\pm$ 23,3                               |
| Korrelation Blut/Tränenflüssigkeit     | 0,66 (0,04)                  | 0,75 (0,01)                          | 0,58 (0,08)                                    |
| Korrelation Blut/Kot                   | 0,35 (0,32)                  | 0,30 (0,41)                          | -0,17 (0,63)                                   |
| Korrelation Tränenflüssigkeit/Kot      | 0,54 (0,10)                  | 0,45 (0,19)                          | -0,20 (0,58)                                   |

<sup>1</sup> AUC,  $Y_{MAX}$  und  $T_{MAX}$  berechnet durch Polynomregression, AUC dividiert durch 80

<sup>2</sup> AUC berechnet nach der Trapezregel dividiert durch 180

Die KoB fiel von Tag 1 zu Tag 4 deutlich ab ( $p < 0,01$ ; ► **Abb. 4a**, ► **Tab. 3**), stieg anschließend zu Tag 5 hin an, um zu Tag 6 erneut abzufallen und zu Tag 7 anzusteigen. Daraufhin verringerte sie sich bis zu ihrer niedrigsten Konzentration an Tag 9 und stieg an Tag 10 erneut leicht an (► **Abb. 4**, ► **Tab. 55**). Die KoS zeigte den gleichen Verlauf (► **Abb. 4a**). Die KoTr hatte an Tag 10 ihren Minimalwert, was den einzigen Unterschied zum Verlauf der KoB-Kurve darstellte (► **Abb. 4b**). Die Kurven von KoM und KoB differierten (► **Abb. 4c**). Der Verlauf der KoK zeigte einige Parallelen zu dem der KoB (► **Abb. 4d**). Bei der KoB ( $p < 0,01$ ), der KoTr ( $p = 0,01$ ) und der KoK ( $p < 0,01$ ) wurden an Tag 10 niedrigere Werte als an Tag 1 nachgewiesen (► **Tab. 3**). Ein signifikanter Anstieg der KoB ( $p = 0,03$ ), sowie der KoK ( $p < 0,01$ ) war von Tag 4 zu Tag 5 zu verzeichnen (► **Tab. 3**).

Für die Tage 1–10 ergaben sich bei der Betrachtung der Korrelationen der Kortisol(metaboliten)konzentration der verschiedenen Matrizes mit der KoB, gemessen am selben Tier, geringe bis mittlere positive und negative Korrelationen, wovon wenige tendenziell oder signifikant waren (► **Tab. 4**).

Für die LSM der Studientage (Tag 1–10) ergaben sich deutlich positive Korrelationen (► **Tab. 4**) zwischen der KoB und der KoS ( $r = 0,85$ ;  $p = 0,002$ ) sowie zwischen der KoB und KoTr ( $r = 0,86$ ;  $p = 0,002$ ). Zwischen den LSM der KoB und der KoM bzw. der KoB und der KoK an den Studientagen wurden deutlich geringere Korrelationen geschätzt ( $r = 0,21$  bzw.  $0,52$ ; ► **Tab. 4**).

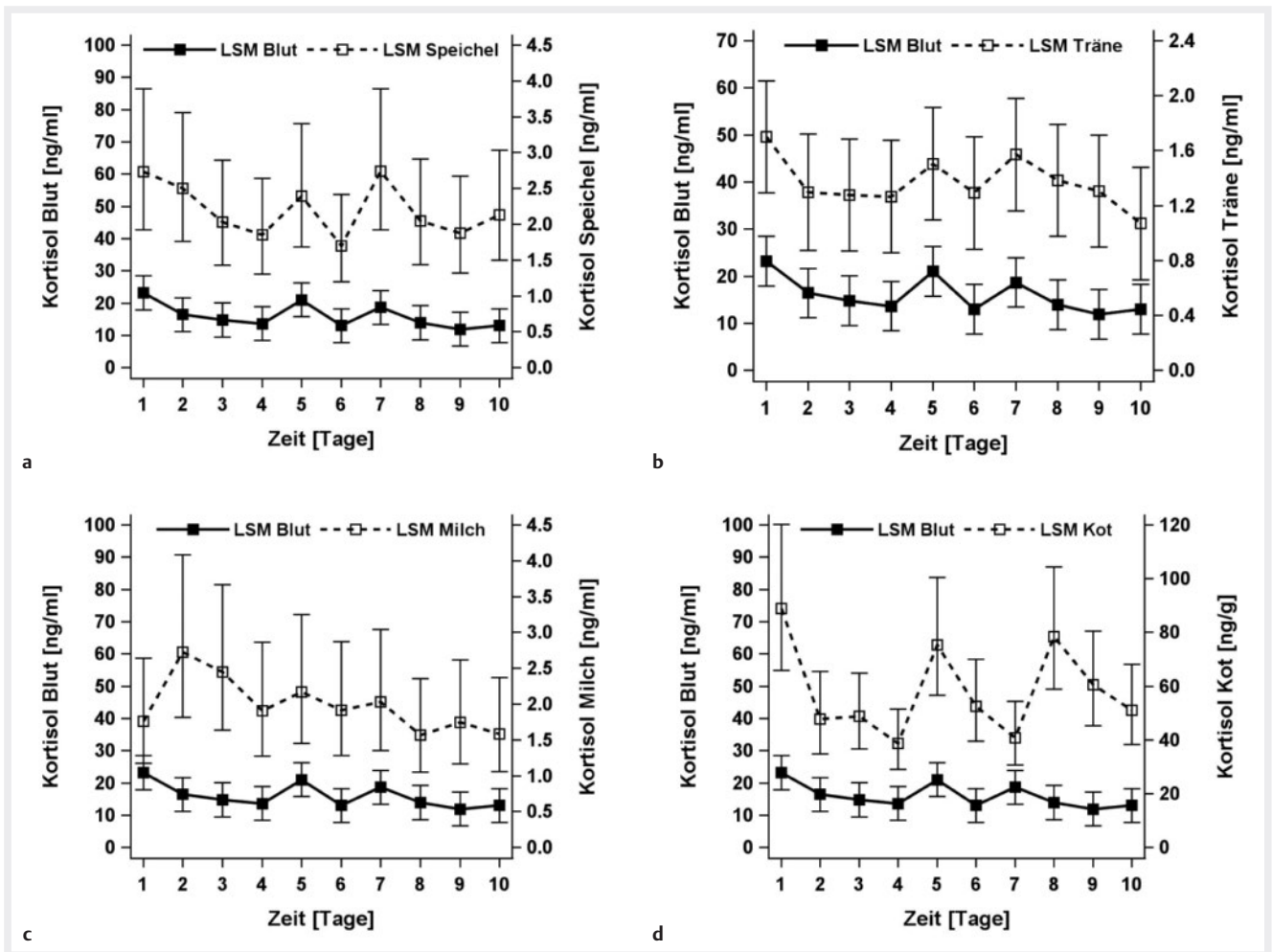
## Diskussion

**Studiendesign** In der vorliegenden Arbeit wurde die KoB mit der KoS, KoTr, KoM sowie KoK bei Kühen verglichen, während in früheren Studien nur ein Vergleich einzelner Matrizes erfolgte [9][11][24][31][32][33][34][35]. Als Stressmodell wurde die sKB gewählt, da das Verbringen und die Fixation von Kühen in einem Klauenbehandlungsstand mit Stress und einer Erhöhung der Kortisolkonzentration im Blut verbunden ist [6][7][8]. Für eine Klauenpflege im Durch-

treibestand wurden in anderen Untersuchungen  $15,9 \pm 4,4$  Minuten benötigt [6], für einen chirurgischen Eingriff an der Klaue (Klaunenamputation oder Gelenkresektion) im Mittel 55 Minuten [36]. Somit erscheint die gewählte Behandlungszeit von 30 Minuten als realistisch. Sie umfasst neben dem Zeitaufwand für die Diagnostik an der Zehe das Setzen der RIVA mit der Wartezeit bis zum Wirkungseintritt, die Defektversorgung und das Anbringen eines Klotzes und Verbands.

Für die Entnahme der Speichelproben war die Fixation des Kopfes und das Öffnen des Mauls der Kühe durch den Untersucher notwendig. Gerade bei sehr schreckhaften Tieren kann es zu stärkeren Abwehrbewegungen kommen. Sind die Tiere jedoch im Fanggitter fixiert, stellt die beschriebene Speichelprobengewinnung nach Ansicht der Autoren eine für den Untersucher sichere, nicht invasive Methode dar. Die Gewinnung von Tränenflüssigkeit war bei allen Kühen durch eine Person möglich und führte in keinem Fall zu einer Augenerkrankung. Um ein Anmelken und Einschleßen der Milch zu verhindern, wurden die Milchproben beim routinemäßigen Melken entnommen. Dies stellte eine einfache Probenentnahme ohne zusätzliche Risiken für den Untersucher dar. Ein Vorteil der Messung von Kortisolmetaboliten im Kot liegt in der Probengewinnung, die ohne Tierkontakt erfolgen kann und nicht invasiv ist [13][37][38]. Bei Gruppenhaltung in Laufställen besteht allerdings die Gefahr einer Kontamination der Proben mit anderen Kotrückständen, weshalb hier eine rektale Kotentnahme erfolgen sollte. Diese war in der vorliegenden Studie immer durch eine Person und ohne Fixation der Tiere durchführbar.

**Vergleich der Werte mit Literaturangaben** Die bestimmten mittleren Kortisol- bzw. Kortisolmetabolitenkonzentrationen der untersuchten Matrizes sind mit den Angaben anderer Autoren vergleichbar und somit plausibel [6][7][8][9][11][12][31][33][34][35][37][39].



▶ **Abb. 4** Verlauf der Kortisolkonzentration (Least Square Means [LSM] mit 95%-Konfidenzintervall) in Blutserum (a–d), Speichel (a), Tränenflüssigkeit (b) und Milch (c) sowie Kortisolmetabolitenkonzentration (LSM mit 95%-Konfidenzintervall) im Kot (d) vor (Tag 1–4) und nach (Tag 5–10) der simulierten Klauenbehandlung bei 10 Deutsch-Holstein-Kühen. Quelle: © M. Heinrich.

▶ **Fig. 4** Cortisol concentrations (least square means [LSM] with 95% confidence interval) in blood (a–d), saliva (a), tear fluid (b) and milk (c) as well as concentrations of cortisol metabolites in feces (d) (LSM with 95% confidence interval) before (days 1–4) and after (days 5–10) sham foot trimming in 10 German Holstein cows. Source: © M. Heinrich.

▶ **Tab. 3** Differenzen der Least Square Means (LSM) (mit p-Werten, multipler t-Test) der Kortisolkonzentration in Blutserum, Speichel, Tränenflüssigkeit und Milch sowie Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot für den paarweisen Vergleich der Tage 4 und 1, 10 und 1 sowie 5 und 4 bei 10 Deutsch-Holstein-Kühen.

▶ **Table 3** Differences of least square means (LSM) (with p-values, multiple t-test) concentration of cortisol in blood serum, saliva, tear fluid, milk and concentration of cortisol metabolites in feces respectively of pairwise comparisons between days 4 and 1, days 10 and 1 as well as days 5 and 4 in 10 German Holstein cows.

| Differenz       | Kortisolkonzentration (ng/ml) |                          |                   |                          | Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot <sup>1</sup> (ng/g) |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|---|
|                 | Blut                          | Speichel <sup>1</sup>    | Tränenflüssigkeit | Milch <sup>1</sup>       |   |
| Tag 4 zu Tag 1  | -9,6 (<0,01)                  | 0,68 <sup>2</sup> (0,12) | -0,43 (0,08)      | 1,08 <sup>2</sup> (0,77) | 0,43 <sup>2</sup> (<0,01)                                   |
| Tag 10 zu Tag 1 | -10,2 (<0,01)                 | 0,78 <sup>2</sup> (0,31) | -0,63 (0,01)      | 0,90 <sup>2</sup> (0,69) | 0,57 <sup>2</sup> (<0,01)                                   |
| Tag 5 zu Tag 4  | 7,11 (0,03)                   | 1,29 <sup>2</sup> (0,21) | 0,24 (0,33)       | 1,14 <sup>2</sup> (0,52) | 1,95 <sup>2</sup> (<0,01)                                   |

<sup>1</sup> Prüfung, ob der Quotient der Mediane von 1 verschieden ist

<sup>2</sup> Schätzung für den Quotienten der Mediane

► **Tab. 4** Pearson-Korrelationen (mit p-Werten) zwischen den Kortisolkonzentration der Matrices Blutserum, Speichel, Tränenflüssigkeit und Milch sowie der Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot vor (Tag 1–4) und nach (Tag 5–10) der simulierten Klauenbehandlung sowie zwischen den Least Square Means (LSM) an den Prüftagen 1–10 geschätzt (n = 10 Kühe).

► **Table 4** Pearson correlations for the relationships between cortisol concentrations in blood, saliva, tear fluid and milk and concentrations of cortisol metabolites in feces on before (days 1–4) and after (days 5–10) sham foot trimming and between the estimated least square means (LSM) on days 1–10 (n = 10 cows).

| Korrelation                     | Tag 1          | Tag 2          | Tag 3           | Tag 4           | Tag 5           | Tag 6           | Tag 7          | Tag 8          | Tag 9           | Tag 10          | Tag 1–10        |
|---------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Blutserum/<br>Speichel          | 0,32<br>(0,38) | 0,15<br>(0,68) | 0,35<br>(0,33)  | –0,04<br>(0,91) | 0,02<br>(0,96)  | 0,39<br>(0,26)  | 0,22<br>(0,54) | 0,26<br>(0,47) | 0,44<br>(0,21)  | 0,55<br>(0,098) | 0,85<br>(0,002) |
| Blutserum/<br>Tränenflüssigkeit | 0,75<br>(0,01) | 0,61<br>(0,08) | 0,30<br>(0,4)   | 0,39<br>(0,26)  | –0,35<br>(0,32) | 0,56<br>(0,09)  | 0,18<br>(0,62) | 0,54<br>(0,11) | 0,27<br>(0,45)  | 0,26<br>(0,47)  | 0,86<br>(0,002) |
| Blutserum/Milch                 | 0,53<br>(0,12) | 0,19<br>(0,6)  | –0,11<br>(0,76) | –0,05<br>(0,9)  | –0,35<br>(0,32) | –0,01<br>(0,98) | 0,00<br>(0,99) | 0,34<br>(0,34) | –0,03<br>(0,93) | 0,62<br>(0,06)  | 0,21<br>(0,57)  |
| Blutserum/Kot                   | 0,24<br>(0,51) | 0,58<br>(0,08) | –0,55<br>(0,10) | –0,44<br>(0,20) | –0,42<br>(0,23) | –0,22<br>(0,54) | 0,22<br>(0,56) | 0,58<br>(0,08) | –0,13<br>(0,7)  | 0,55<br>(0,098) | 0,52<br>(0,13)  |

**Kortisolkonzentration während der sKB** Zwischen der KoB und KoTr während einer sKB ließ sich eine Korrelation nachweisen. Auch während des Ablegens von Kühen auf einen Kippstand konnte eine Korrelation zwischen diesen Parametern festgestellt werden [31]. Aufgrund dieser Korrelationen ist die Tränenflüssigkeit als geeignete Matrix anzusehen, um die Stressantwort während eines stressauslösenden Ereignisses zu erfassen.

Bei der letzten Kotprobenentnahme nach der sKB (Minute 660) ergaben sich die höchsten Werte der KoK. In anderen Studien wurden die maximalen Konzentrationen der Kortisolmetaboliten 9–12 Stunden nach dem Stressreiz ermittelt [6][13][37]. In der vorliegenden Studie kann nicht beurteilt werden, ob es sich bei der Messung zu Minute 660 um die maximale KoK handelte oder ob es einen weiteren Anstieg gab. Um diese Fragestellung beantworten zu können, müssten weitere Entnahmezeitpunkte für die Bestimmung der KoK gesetzt werden. Zwischen der KoB und der KoK zeigten sich zu mehreren Zeitpunkten tendenzielle Korrelationen, doch waren bei Betrachtung der AUC der beiden Matrices keine Korrelationen feststellbar. Palme et al. [13] beobachteten nach der Applikation von ACTH bei Kühen signifikante Korrelationen der beiden Matrices allgemein, aber nicht beim Vergleich der Basalkonzentrationen. Andere Untersucher stellten bei Kühen eine positive Korrelation zwischen basaler KoB und basaler KoK fest [40]. Bei der vorliegenden Stichprobengröße und dem Probendesign reflektiert die KoK 8–11 Stunden nach einem stressauslösenden Ereignis die KoB während dieses Ereignisses nur tendenziell.

Der Vergleich zwischen KoTr und KoK wies zu einigen Zeitpunkten signifikante Korrelationen auf (► **Tab. 54**). Bei der Betrachtung von AUC,  $Y_{MAX}$  und  $T_{MAX}$  konnten jedoch keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden. In der Literatur gibt es dazu aktuell keine Vergleiche (pubmed, Februar 2020, Suchbegriffe: cortisol, tear, fecal cortisol metabolite). In der vorliegenden Arbeit wurden somit erstmals beide Matrices miteinander verglichen und signifikante Korrelationen aufgezeigt. Weitere Arbeiten mit dem Fokus auf diesen Matrices sollten folgen, um diese Korrelationen weiter zu beschreiben.

**Kortisolkonzentration vor und nach der sKB** Die KoB wies an Tag 4 (morgentliche Beprobung vor der sKB) signifikant geringere Werte auf als an Tag 1. Dies belegt eine Gewöhnung der Kühe an den Umgang mit dem Untersucher. Über niedrigere Kortisolkonzentrationen im Blut nach wiederholtem Handling von Kühen berichtet auch Andrade et al. [41]. In Studien zur Evaluierung von Stress sollte daher eine Gewöhnungsphase für die Tiere von einigen Tagen eingeplant werden.

Einen Tag nach der sKB (Tag 5) waren die KoB und KoK im paarweisen Vergleich zu Tag 4 signifikant erhöht. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Autoren, die in der Untersuchung Kipp- oder Durchtreibbestände verwendeten [6][8]. An Tag 7 gab es einen tendenziellen Anstieg der KoB im Vergleich zu Tag 6. Der Studienplan sah vor, dass die Versuchstage stets auf die gleichen Wochentage fielen. Somit war Tag 7 immer der Tag, an dem die Klauenpfleger die Routinebehandlung im Betrieb durchführten. Die Versuchskühe standen in der unmittelbaren Umgebung der Klauenstrecke. Nach Ansicht der Autoren waren die Anwesenheit und die Arbeit der Klauenpfleger für die erhöhten Kortisolkonzentrationen verantwortlich. Andere Untersucher stellten keinen Anstieg der KoB fest, wenn bei Nachbartieren im Stall eine Klauenpflege durchgeführt wurde [8]. Anders als in unserer Studie wurden diese Kühe aber nicht 3 Tage zuvor einer stressauslösenden Situation wie der sKB unterzogen. Des Weiteren ist zu bedenken, dass die im Untersuchungsbetrieb anwesenden Klauenpfleger keine Klauenpflege durchführen, wie in besagter Arbeit [8], sondern Behandlungen von unkomplizierten Klauendefekten.

**Vergleich der Matrices vor und nach der sKB** Der Verlauf der KoB wird durch den Verlauf der KoS gut widerspiegelt. Negro et al. [32] ermittelten bei Kühen nach dem Melken eine signifikante Korrelation zwischen KoB und KoS. Unter Berücksichtigung eines Zeitversatzes von 10 Minuten ergab sich auch in anderen Studien an Kühen eine Korrelation der Kortisolkonzentration in den Matrices Blut und Speichel [3][33]. Die KoS und KoTr stellen den Verlauf der KoB vor und nach einem stressauslösenden Ereignis gut dar. Die Verwendung dieser Matrices stellt somit eine zuverlässige Alternative zur Erfassung der Kortisolreaktion im Blut dar.



Der Verlauf der KoK vor und nach der sKB zeigte keine signifikante Korrelation zur KoB. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Verlaufskurve der KoK die Verlaufskurve der KoB mit einem Zeitversatz von 10 Stunden widerspiegelt [13]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kotprobe immer morgens nach der Blutprobenentnahme gewonnen und die gemessene Konzentration spiegelt somit den Kortisolwert ca. 10 Stunden vorher wider. Damit könnte eine fehlende Korrelation durch das Probenentnahmedesign erklärt werden.

Der Verlauf der KoM ergab keine signifikante Korrelation zum Verlauf der KoB. In mehreren Publikationen wird über eine Korrelation der beiden Matrizes berichtet [11][34][35][42]. In einer Studie zu Einflussfaktoren auf die KoM bei Kühen konnte dagegen keine Korrelation zwischen der KoM und der KoB aufgezeigt werden [43]. Die KoM gilt als guter Indikator zur Erfassung einer Stresssituation, die bis zu 2 Stunden vor der Milchprobenentnahme stattgefunden hat. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Milchprobenentnahme jeweils 5–6 Stunden nach der Blutentnahme. Ein in der Zwischenzeit aufgetretenes unbekanntes Stressereignis könnte die KoM beeinflusst haben. In der Studienplanung wurde bewusst entschieden, die Milchproben im Melkstand zu entnehmen, um ein unnötiges Anmelken ohne anschließendes Leermelken zu verhindern. Der gewählte Zeitpunkt der Probengewinnung kann für die fehlende Korrelation der beiden Matrizes verantwortlich sein und sollte in weiteren Arbeiten überprüft werden.

#### FAZIT FÜR DIE PRAXIS

Die durchgeführte sKB im Durchtreibbestand stellt für Kühe einen akuten Stressreiz dar. Die dadurch ausgelösten Änderungen der KoB werden durch die KoTr gut widerspiegelt. Des Weiteren gibt es deutlich positive Korrelationen zwischen KoS und KoB sowie KoTr und KoB für den Zeitraum Tag 1–10. Bei der KoM und KoK zeigten sich nur teilweise Korrelationen zur KoB, wofür die Zeitpunkte der Probenentnahme verantwortlich sein könnten. Dabei ist vor allem der Zeitversatz zwischen stressauslösendem Ereignis und dem Anstieg der Kortisolkonzentration in der jeweiligen Matrix zu berücksichtigen. Nach den Resultaten der Studie ist es möglich, auf eine invasive Blutentnahme zur Bestimmung der Kortisolkonzentration zu verzichten und stattdessen die Matrizes Tränenflüssigkeit und Speichel zu nutzen. Ferner zeigte die Studie, dass der tägliche besonnene Umgang mit den Kühen bei den Tieren durch Gewöhnung an den Menschen und die Manipulationen eine geringere Stressantwort induziert, was dem Tierwohl gerecht wird.

#### Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

#### Danksagung

Wir danken dem Wirtschaftshof Sachsenland e. G. für die bereitwillige, vertrauensvolle Überlassung der Kühe und insbesondere Frau Mandy Rupsch für ihre Unterstützung während der Studie. Ein besonderer Dank gilt den beteiligten Klauenpflegern der Genossenschaft Klauenpfleger eG Sachsen.

#### Literatur

- [1] Alam MG, Dobson H. Effect of various veterinary procedures on plasma concentrations of cortisol, luteinising hormone and progesterone in the cow. *Vet Rec* 1986; 118 (1): 7–10. doi:10.1136/vr.118.1.7
- [2] Li F, Shah AM, Wang Z et al. Effects of Land Transport Stress on Variations in Ruminal Microbe Diversity and Immune Functions in Different Breeds of Cattle. *Animals (Basel)* 2019; 9 (9): 599. doi:10.3390/ani9090599
- [3] Hernandez CE, Thierfelder T, Svennersten-Sjaunja K et al. Time lag between peak concentrations of plasma and salivary cortisol following a stressful procedure in dairy cattle. *Acta Vet Scand* 2014; 56 (1): 61. doi:10.1186/s13028-014-0061-3
- [4] Mitchell G, Hattingh J, Ganhao M. Stress in cattle assessed after handling, after transport and after slaughter. *Vet Rec* 1988; 123 (8): 201–205. doi:10.1136/vr.123.8.201
- [5] Munksgaard L, Simonsen HB. Behavioral and pituitary adrenal-axis responses of dairy cows to social isolation and deprivation of lying down. *J Anim Sci* 1996; 74 (4): 769–778
- [6] Pesenhofer G, Palme R, Pesenhofer RM et al. 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 Mschr* 2006; (93): 288–294
- [7] Rizk A, Herdtweck S, Meyer H et al. Effects of xylazine hydrochloride on hormonal, metabolic, and cardiorespiratory stress responses to lateral recumbency and claw trimming in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 240 (10): 1223–1230. doi:10.2460/javma.240.10.1223
- [8] Sixt A, Stanek C, Möstl E. Der Einfluss verschiedener Methoden der Klauenkorrektur auf den Plasmakortisolspiegel bei der Milchkuh. *Wien Tierarztl Mschr* 1997; 84 (7): 181–188
- [9] Monk CS, Hart KA, Berghaus RD et al. 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
- [10] Otovic P, Hutchinson E. Limits to using HPA axis activity as an indication of animal welfare. *ALTEX* 2015; 32 (1): 41–50. doi:10.14573/altex.1406161
- [11] Termeulen SB, Butler WR, Natzke RP. Rapidity of cortisol transfer between blood and milk following adrenocorticotropin injection. *J Dairy Sci* 1981; 64 (11): 2197–2200. doi:10.3168/jds.S0022-0302(81)82829-9
- [12] Mormede P, Andanson S, Auperin B et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* 2007; 92 (3): 317–339. doi:10.1016/j.physbeh.2006.12.003
- [13] Palme R, Robia C, Messmann S et al. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wien Tierarztl Mschr* 1999; 86 (7): 237–241
- [14] Hopster H, van der Werf JT, Erkens JH et al. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *J Anim Sci* 1999; 77 (3): 708–714

- [15] Zalkovic P, MacLean MA, Ambrose DJ. A simple procedure to secure an indwelling jugular vein catheter to the neck of cattle for repeated blood sampling. *Can Vet J* 2001; 42 (12): 940–942
- [16] Palme R. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare* 2012; 21 (3): 331–337. doi:10.7120/09627286.21.3.331
- [17] Müller H, Heinrich M, Mielenz N et al. A. Evaluation of arterial digital blood flow using Doppler ultrasonography in healthy dairy cows. *BMC Vet Res* 2017; 13 (1): 162. doi:10.1186/s12917-017-1090-8
- [18] Müller H, Heinrich M, Mielenz N et al. Evaluation of arterial digital blood flow in dairy cows with claw horn disruption lesions using Doppler ultrasonography. *J Dairy Sci* 2019; 102 (10): 9213–9223. doi:10.3168/jds.2018-15882
- [19] Nechanitzky K, Starke A, Vidondo B et al. Analysis of behavioral changes in dairy cows associated with claw horn lesions. *J Dairy Sci* 2016; 99 (4): 2904–2914. doi:10.3168/jds.2015-10109
- [20] Dirksen G, Gründer HD, Stöber M, Hrsg. Die klinische Untersuchung des Rindes. 3. Aufl. Berlin, Hamburg: Enke; 2012
- [21] Toussaint Raven E. Structure and functions of the Claw (Chapter 1) and Trimming (Chapter 3). In: Toussaint Raven E, ed. *Cattle Footcare and Claw Trimming*. 1st ed. Ipswich: Farming Press; 1985: 13–34, 75–94
- [22] Antalovsky A. Technika mistni nitrozilni anestezije na distalnih castech koncetin u skotu (Technik der intravenösen lokalen Schmerzausschaltung im distalen Gliedmaßenbereich beim Rind). *Vet Med* 1965; 7: 413–420
- [23] Abraham G, Gottschalk J, Ungemach FR. Evidence for ototopical glucocorticoid-induced decrease in hypothalamic-pituitary-adrenal axis response and liver function. *Endocrinology* 2005; 146 (7): 3163–3171. doi:10.1210/en.2005-0080
- [24] Palme R, Möstl E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Z Säugetierk* 1997; 62: 192–197
- [25] Roy J. SAS for Mixed Models. *J Biopharmaceut Statistics* 2007; 17 (2): 363–365. doi:10.1080/10543400601001600
- [26] Maddala GS. *Limited-Dependent and Qualitative Variables in Econometrics*. New York: Cambridge University Press 1983
- [27] Nagelkerke NJD. A Note on a General Definition of the Coefficient of Determination. *Biometrika* 1991; 78 (3): 691–692. doi:10.1093/biomet/78.3.691
- [28] Connolly J. Developing Multisite Dynamic Models of Mixed Species Plant Communities. *Annals of Botany* 2001; 88 (4): 703–712. doi:10.1006/anbo.2001.1481
- [29] Piepho H-P. Data Transformation in Statistical Analysis of Field Trials with Changing Treatment Variance. *Agron J* 2009; 101 (4): 865–869. doi:10.2134/agronj2008.0226x
- [30] Kenward MG, Roger JH. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics* 1997; 53 (3): 983–997.
- [31] Khraim N. Effects of dexamethasone and training on the hypothalamic-pituitary-adrenal response on mild stress challenge in dairy cows [Dissertation]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2011
- [32] Negro JA, Porcionato MA, Passille AM de et al. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *J Dairy Sci* 2004; 87 (6): 1713–1718. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73324-X
- [33] Riek A, Schrader L, Zerbe F et al. Comparison of cortisol concentrations in plasma and saliva in dairy cattle following ACTH stimulation. *J Dairy Res* 2019; 1–4. doi:10.1017/S0022029919000669
- [34] Tinh NC, Yoshida C, Long ST et al. Adrenocortical response in cows after intramuscular injection of long-acting adrenocorticotrophic hormone (tetracosactide acetate zinc suspension). *Reprod Domest Anim* 2011; 46 (2): 296–300. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01666.x
- [35] Verkerk GA, Phipps AM, Carragher JF et al. Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cow. *Animal Welfare* 1998; (7): 77–86
- [36] Starke A, Heppelmann M, Beyerbach M et al. Septic arthritis of the distal interphalangeal joint in cattle: comparison of digital amputation and joint resection by solar approach. *Vet Surg* 2007; 36 (4): 350–359. doi:10.1111/j.1532-950X.2007.00257.x
- [37] Palme R, Robia C, Baumgartner W et al. Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolite concentrations. *Vet Rec* 2000; 146 (4): 108–109. doi:10.1136/vr.146.4.108
- [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] Schwinn A-C, Knight CH, Bruckmaier RM et al. Suitability of saliva cortisol as a biomarker for hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation assessment, effects of feeding actions, and immunostimulatory challenges in dairy cows. *J Anim Sci* 2016; 94 (6): 2357–2365. doi:10.2527/jas.2015-0260
- [40] Hopster H, Bruckmaier RM, van der Werf JTN et al. Stress responses during milking; comparing conventional and automatic milking in primiparous dairy cows. *J Dairy Sci* 2002; 85 (12): 3206–3216. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74409-3
- [41] Andrade O, Orihuela A, Solano J et al. Some effects of repeated handling and the use of a mask on stress responses in zebu cattle during restraint. *Appl Anim Behav Sci* 2001; 71 (3): 175–181. doi:10.1016/S0168-1591(00)00177-5
- [42] Gwazdauskas FC, Paape MJ, McGilliard ML. Milk and plasma glucocorticoid alterations after injections of hydrocortisone and adrenocorticotropin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1977; 154 (4): 543–545
- [43] Sgorlon S, Fanzago M, Guiatti D et al. Factors affecting milk cortisol in mid lactating dairy cows. *BMC Vet Res* 2015; 11: 259. doi:10.1186/s12917-015-0572-9