



Regina Wald, Isabel Hennig-Pauka, Miriam Viehmann, Erich Möstl

Speichelcortisolmessung bei Absetzferkeln nach zwei Stressoren

Die Abwesenheit von „Stress“ gilt als Grundvoraussetzung für das Wohlbefinden von Tieren. Die Speichelcortisolkonzentration ist als Parameter zur Bemessung von Belastungssituationen des Schweins anerkannt und bietet ohne weitere Extraktion die Möglichkeit, das freie, also biologisch aktive Cortisol zu bestimmen.

► Gesundheit, Leistung und Wohlbefinden sind eng mit einer möglichst großen Freiheit von Stressoren verknüpft. Im Organismus ist der Anstieg der Cortisolkonzentration bei Belastungen daran beteiligt, den Körper in die Lage zu versetzen, den Stressor zu überwinden. Die Cortisolbestimmung kann daher eine Beurteilung ermöglichen, ob und in welchem Umfang sich die Haltungsbedingungen und Routineeingriffe als Belastung für unsere Nutztiere erweisen (Schönreiter et al., 1999; Martin und Crump, 2002).

Schweine gelten als sehr stressempfindliche Tiere. Als Stressindikator eignet sich neben den für Herdenuntersuchungen in der Erhebung zu zeitaufwendigen, klinischen Parametern (z. B. Herzfrequenz) ebenfalls die Cortisolkonzentration im Blut. Allerdings ist die Blutentnahme ihrerseits ebenfalls ein Stressor. Aus diesem Grund sind belastungsarme oder belastungsfreie Methoden vorzuziehen. Da ein kleiner Anteil der Cortisolmenge aus dem Blut in den Speichel übertritt, ist die Cortisolkonzentration im Speichel bei vielen Spezies als Parameter zur Messung von Belastungssituationen anerkannt und bietet den Vorteil einer nichtinvasiven Beprobung (Cook et al., 1996; Möstl et al., 1999; Mormède et al., 2007).

In einer Studie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien wurde untersucht, ob die Cortisolbestimmung aus Speichel auch bei Absetzferkeln eine praxisrelevante Methode sein kann, um akute Belastungen nachzuweisen. Ziel war es, zwei definierte Stressoren in der Schweineproduktion („Zusammengruppierung“ und „Kastration“) durch ein geeignetes Probenmedium und eine aussagekräftige Messmethode zu erfassen und die Probenentnahme hinsichtlich ihrer Praxistauglichkeit zu bewerten.

Das Glucocorticoid Cortisol

Cortisol stellt das vorwiegende Glucocorticoid bei Schweinen dar. Glucocorticoide sind Steroidhormone und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Metabolismus, der Immunantwort und des Herz-Kreislauf-Systems. Das Monitoring des Hypothalamus-Hypophysen-Regelkreises (Hypothalamus-Pituitary-Axis, HPA) ist ein wertvoller Indikator, da der aus Belastungen resultierende erhöhte Cortisolspiegel die in der Schweinehaltung wichtigen Leistungsparameter wie „Fruchtbarkeit“, „tägliche Zunahme“ und „Fleischqualität“ beeinträchtigen kann (Martin und Crump, 2002; Binke, 2003).

Cortisol als Biomarker für die Stressantwort

Evaluierung von „Stress“

Die Stressantwort stellt einen physiologischen Mechanismus zur Überwindung von Belastungen dar. Für das Ausmaß der Stressantwort spielen die individuelle Bewertung des Stressors und bereits

gemachte Erfahrungen sowie die Genetik eine Rolle. Nahrungswise versucht man beim Tier die Stressantwort über Verhaltensbeobachtungen und die Erfassung von physiologischen oder endokrinen Parametern zu quantifizieren. Hierbei ist der Anstieg der Hormonkonzentration der Sympathikus-Nebennieren-Achse (Katecholamine) und der HPA von besonderem Interesse (Ekkel et al., 1996; Moberg, 2000). Die Messung der Katecholamine ist nur schwer möglich: Sie werden, vorrangig bei akutem Stress, sehr schnell in das Blut sezerniert, haben eine Halbwertszeit im Sekundenbereich und sind sowohl in Urin- als auch in Speichelproben relativ instabil, was spezielle Lagerungs- und Probenversandbedingungen erforderlich macht. Dadurch ist das Ausmaß der Katecholaminbildung nur indirekt, zum Beispiel über die Messung der Konzentration der Vanillinmandelsäure (ein Abbauprodukt der Katecholamine) im Urin, möglich. Surrogatparameter für die Katecholaminkonzentration, die im Speichel gemessen werden können, sind die Aktivität der α -Amylase, die Konzentration des sauren Glykoproteins Chromogranin A oder die Konzentration des Immunglobulins A (Gröschl, 2008).

Bestimmung von Cortisol bei Schweinen

In den letzten beiden Jahrzehnten wurden geeignete Probenmedien zur Cortisol(metaboliten)messung bei vielen Tierarten immer besser erforscht. Blut wird zur Cortisolbestimmung häufig verwendet. Um den circadianen Cortisolverlauf im Plasma zu erfassen, sind mehrmalige Blutentnahmen nötig, da sich die Konzentration innerhalb von wenigen Minuten verändern und sich die individuelle ultradiane Rhythmik als Störgröße auswirken kann. Allerdings ist eine mehrmalige tierindividuelle Blutentnahme in Produktionsbetrieben mit einer Störung im Betriebsablauf verbunden. Es ist zu beachten, dass die Manipulation am Tier, beispielsweise durch Verwendung einer Oberkieferschlinge zur Fixierung, und die Blutentnahme selbst Stressoren sind. Folglich bieten nichtinvasive Methoden zur Probenentnahme diverse Vorteile. Es wurden daher verschiedene Verfahren zur nichtinvasiven Probenentnahme zur Messung von Cortisol bzw. von Cortisolmetaboliten entwickelt (Möstl und Palme, 2002).

Die Cortisolquantifizierung im Haar gilt derzeit bei verschiedenen Tierarten als Langzeit-Parameter für Stress. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Cortisol bei einigen Spezies wie Mensch oder Hund auch in der Haut gebildet werden kann. Beim Schwein sind den Autoren keine Untersuchungen über die Cortisolsynthese im Integument bekannt. Die Messung der Cortisolkonzentration in der Milch ist auf laktierende Tiere beschränkt. Die Entnahme von Urin- und Speichelproben erfordert eine Gewöhnung an den Beprobungsvorgang, da das Tier auch hierfür geringfügig manipuliert werden muss (Möstl und Palme, 2002; Ouschan et al., 2013). >>



>> In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Schweine radioaktiv markiertes Cortisol zu 93 % über den Urin ausscheiden. Es wird empfohlen, für Harnanalysen immer auch das Cortisol-Kreatinin-Verhältnis zur Standardisierung der Werte zu berechnen, da die Cortisolkonzentration von der Wasseraufnahme, dem Harnvolumen sowie der Nierenfunktion abhängt. Die einzige nichtinvasive Methode, die keinen direkten Mensch-Tier-Kontakt erfordert und zusätzlich eine Post-hoc-Analyse ermöglicht, ist die bereits bei einigen Tierarten durchführbare Messung von Cortisol(metaboliten) in den Faeces. Die Glucocorticoide werden in der Leber metabolisiert und in wasserlösliche Formen umgewandelt. Die Ausscheidung erfolgt teilweise auch über die Galle. Im Gastrointestinaltrakt werden diese Stoffe von bakteriellen Enzymen weiter abgebaut bzw. dekonjugiert. Daher sind bei vielen Tierarten fast ausschließlich die Metaboliten des Cortisols



Abbildung 1: Cortisol-Salivette® der Firma Sarstedt: Zentrifugenröhrchen mit darin enthaltenem Einhängegefäß und Kunstfaserrolle.



Abbildung 2: Die Hierarchie bei einer Neugruppierung domestizierter Schweine wird durch Rangordnungskämpfe geklärt. Der Unterlegene flüchtet, was eine Stressreaktion des Organismus bedingt.



Abbildung 3: Zur Speichelgewinnung wurde den Ferkeln eine Cortisol-Salivette®-Watterolle an einer Fasszange nach Allis angeboten (durch ein den Tieren dafür bekanntes Gitter). Für eine ausreichende Durchtränkung der Watterolle mit Speichel konnten die Ferkel so lange sie wollten darauf kauen.

im Kot nachzuweisen. Für die Tierart Schwein konnte wegen der langen Darmpassagezeit (\emptyset 48 Stunden), in der die Bakterien die Möglichkeit haben, Cortisol zu metabolisieren, noch kein anerkannter, zuverlässiger Assay zur Messung der Cortisolmetaboliten entwickelt werden. Im Gegensatz zu anderen Spezies wurden bei Schweinen nach Verabreichung von radioaktivem Cortisol nur 7 % der Radioaktivität in den Faeces nachgewiesen (zum Vergleich: Schafe 28 %, Pferde 41 % und Katzen 82 %). Grundsätzlich wird mit der Konzentration von Cortisol bzw. von Cortisolmetaboliten im Kot die mittlere Cortisolproduktion während einiger Stunden widergespiegelt. Eine Zuordnung zu kurzzeitigen Belastungen ist nur eingeschränkt möglich, da Änderungen in der Futterzusammensetzung oder Durchfallerkrankungen die Darmpassagezeit der Ingesta verkürzen und somit der Zeitraum der Belastung nicht ermittelt werden kann (Palme et al., 1996; Möstl und Palme, 2002).

Im Blut wird Cortisol größtenteils von einem Transportprotein gebunden. Allerdings kann nur die freie, biologisch aktive Form in Zellen diffundieren und an zytoplasmatische Rezeptoren binden. Da das Transportprotein zu groß ist, um durch die Speicheldrüsenmembran zu diffundieren, korreliert die Konzentration des Speichelcortisols mit der Konzentration von freiem Cortisol im Blut signifikant positiv und entspricht etwa 5–10 % der Gesamtcortisolkonzentration (freies sowie proteingebundenes Cortisol) im Blutplasma. Nach einer Belastung folgt der Anstieg der Cortisolkonzentration im Speichel der im Blut mit zweiminütiger Verzögerung und ist unabhängig von der Speichelflussrate sowie der oralen Kontamination (z. B. durch Futterpartikel) (Cook et al., 1996; Martin und Crump, 2002; Mormède et al., 2007).

Die Gewinnung von Speichelproben bei Schweinen erfolgt durch das Bekauen einer saugfähigen Matrix und der anschließenden Zentrifugation des eingespeichelten Materials. Nicht jede saugfähige Matrix ist für die Cortisolbestimmung geeignet, da manche Materialien Cortisol binden. Der wiedergewonnene Speichel zeichnet sich durch eine gute Lager- und Transportfähigkeit aus (Mormède et al., 2007; Gröschl, 2008).

Speichelcortisolbestimmung nach Umgruppierung und Kastration

In einer Untersuchung der Universitätsklinik für Schweine in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biochemie der Veterinärmedizinischen Universität Wien wurden die Auswirkungen der Umstallung und Umgruppierung sowie der Kastration unter Anästhesie und Analgesie auf zehn männliche Absetzferkel im Alter von 21 Tagen untersucht. Um den Einfluss der individuellen Variationen der Cortisolkonzentration zu minimieren, fungierte jedes Tier als seine eigene Kontrolle (Touma und Palme, 2005). Dazu wurden dreimal täglich, um 7, 15 und 22 Uhr, tierindividuelle Speichelproben mittels einer Salivette® (Sarstedt AG & Co., D) gesammelt (Abb. 1) und ein kompetitiver Enzymimmunoassay (EIA) zur Cortisolbestimmung eingesetzt. Zwei seit Versuchsbeginn getrennte Ferkelgruppen mit jeweils fünf Tieren wurden am dritten Tag zusammengestellt und fünf Tage später unter Allgemeinanästhesie (Azaperon, 2 mg/kg KG i. m., und Ketamin, 10 mg/kg KG i. m.) und Analgesie (Meloxicam, 4 mg/kg KG i. m.) kastriert.

Ergebnisse

Nach der Umstallung und Umgruppierung war ein 1,7-facher Cortisolanstieg im Speichel messbar, welcher für 24 Stunden anhielt. Zum ersten Beprobungszeitpunkt nach der Zusammenstellung wiesen die beiden von den Autoren als dominant wahrgenommenen >>

>> Tiere die höchsten Cortisolkonzentrationen auf [Abb. 2](#). Das rangniedrigste Tier reagierte zunächst nicht auffallend, ihm ist aber der höchste Cortisolwert 24 Stunden nach der Umgruppierung zuzuordnen. 48 Stunden nach Stressoreinwirkung wurde der niedrigste Medianwert des Versuchs ermittelt.

Nach der Kastration im dargestellten Versuch wurde ein 21-facher Anstieg in den ersten sechs Stunden post operationem beobachtet. Die Cortisolkonzentration sank im Gegensatz zum Stressor „Umstallung“ in kürzerer Zeit wieder auf das Ausgangsniveau ab.

Diskussion

Die meisten Rankämpfe unter Schweinen finden in den ersten beiden Stunden nach Zusammenstallung statt (Hoy, 2005). Nach 48 Stunden sollte die Rangfolge geklärt sein und stabil bleiben. Zusätzlich wird bei ranghohen Ferkeln eine stärkere Cortisolausschüttung als Reaktion auf einen Stressor vermutet. Diese Annahmen bestätigten sich ebenfalls im vorliegenden Versuch. In einer Studie von Colson et al. (2012) konnten anhand von Speichelcortisolbestimmungen unterschiedliche Gewichtungen in der Stressauswirkung von „Absetzen“, „Umgruppieren“ und „Umstallen“ getroffen werden: „Absetzen“ oder eine veränderte Umgebung alleine scheinen Ferkel weniger zu belasten als die genannten Maßnahmen in Kombination mit der Konfrontation neuer Artgenossen, bei der die soziale Hierarchie völlig neu geklärt werden muss (Hoy, 2009).

Die Kastration von Ferkeln ohne wirksame Betäubung ist in Österreich seit 2004 laut der 1. Tierhaltungsverordnung in der Anlage 5 2.10 (BGBl. II Nr. 485/2004) für Tiere, die älter als sieben Tage sind, verboten. Seit 1. Januar 2011 gilt eine freiwillige Branchenvereinbarung zur Ferkelkastration unter Schmerzausschaltung in jedem Alter, an der Bio Austria und der Verband österreichischer Schweinebauern teilnehmen. In Deutschland ist bis zum 31. Dezember 2019 eine Betäubung für das Kastrieren von unter acht Tage alten männlichen Schweinen nicht zwingend vorgeschrieben (BGBl. I S. 1206, 1313). Es konnte bereits von Schönreiter et al. (1999) gezeigt werden, dass die Konzentration des Speichelcortisols nach der Kastration signifikant anstieg, wofür unter anderem der postoperative Wundschmerz verantwortlich gemacht wurde. Der schnelle Abfall der Cortisolkonzentration im hier beschriebenen Versuch ist unter Berücksichtigung des möglichen Einflusses der Schmerztherapie bzw. der geringen Studiengröße zu interpretieren.

In Bezug auf die Speichelprobenentnahme bleibt festzuhalten, dass die Salivetten®-Watterollen auch von den doch relativ jungen Tieren sehr gut angenommen wurden und die Ferkel gerne auf den Watterollen kauen ([Abb. 3](#)). Grundsätzlich erwies sich an jedem Versuchstag die nächtliche Probenentnahme in der Schlafphase der Ferkel als langwieriger. Weitere Probleme bei der tierindividuellen Beprobung waren sich vordrängende, dominante Tiere. In insgesamt 4,4 % der Proben war die gesammelte Speichelmenge für die anschließende Untersuchung zu gering. Dies traf insbesondere für die Proben des Kastrationstages zu. Ein geringes Speichelvolumen kann möglicherweise auch durch das Lebensalter der Tiere bedingt sein, denn mit steigendem Alter und damit größerer Körpermasse der Ferkel wurden überwiegend ausreichende Speichelmenge für die Analyse gewonnen.

Fazit

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Speichelprobenentnahme trotz diverser zu berücksichtigender Faktoren bei der Beprobung (Desinteresse oder Ablenkung, Dominanz einzelner Tiere, geringes Speichelvolumen aufgrund des Alters) als nichtinvasives und belastungsarmes Probenentnahmeverfahren bei jungen Schweinen vielversprechend ist. Der verwendete Assay konnte die typische circadiane Cortisolrhythmik mit einem morgendlichen Anstieg und einem Abfall zum Abend sowie beide Stressoren detektieren: Die Cortisolkonzentrationserhöhung war nach der Kastration deutlich kürzer ausgeprägt als nach der Umgruppierung der Ferkel. Die nichtinvasive Messung von Cortisol in Speichelproben bietet die Möglichkeit, Aufstallungs- und Managementveränderungen sowie Eingriffe an Tieren zu evaluieren und >>



>> mithilfe dieser Parameter auf ihre Nachhaltigkeit zu überprüfen. Der Einsatz der Speichelcortisol Diagnostik ist besonders für eine Bewertung neuer Stalleinrichtungen und Beschäftigungsobjekte im Hinblick auf das Tierwohl geeignet. Auch lassen sich bestimmte Eingriffe an Tieren sowie deren Modifikation im Hinblick auf ein verbessertes Tierwohl bewerten (z. B. Vakzination unter Verwendung unterschiedlicher Adjuvanzen, Kürzen der Schwänze, Abschleifen der Eckzähne). Der Nachweis von Belastungen durch Stress könnte ebenfalls helfen, für jeden Betrieb individuell einen optimalen Absetzzeitpunkt festzustellen oder nach Tiertransporten ausreichende Ruhezeiten festzulegen. In der Veterinärmedizin wird die Speichelcortisolbestimmung derzeit bereits bei der Evaluierung von Operationsmethoden eingesetzt. Solche Beurteilungen anhand eines objektiven Parameters könnten das Verständnis und die Akzeptanz der Verbraucher für die Schweinehaltung verbessern. ●

Literatur

Binke R (2003): Vom Muskel zum Fleisch. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach* 42 162: 347–354.

Colson V, Martin E, Orgeur P, Prunier A (2012): Influence of housing and social changes on growth, behaviour and cortisol in piglets at weaning. *Physiol Behav* 107: 59–64.

Cook NJ, Schaefer AL, Lepage P, Jones SM (1996): Salivary vs. serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Can J Anim Sci* 76: 329–335.

Ekkel ED, Dieleman SJ, Schouten WGP, Portela A, Cornélissen G, Tielen MJM, Halberg F (1996): The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiol Behav* 60: 985–989.

Gröschl M (2008): Current status of salivary hormone analysis. *Clinical Chemistry* 54: 1759–1769.

Hoy S (2009): Verhalten der Schweine. In: Hoy S (Hrsg.), *Nutztierethologie*. Eugen Ulmer KG, Stuttgart, 105–139.

Martin PA, Crump MH (2002): The Adrenal Gland. In: Pineda MH (ed.), *McDonald's Veterinary Endocrinology & Reproduction*. Wiley-Blackwell, 5th ed., Ames, IA, 165–181.

Moberg GP (2000): Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. In: Moberg GP, Mench JA (eds.), *The biology of animal stress*. CABI Publishing, 1st ed., NY, 123–146.

Mormède P, Andanson S, Aupérin B, Beerda B, Guémené D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, Van Reenen CG, Richard S, Veissier I (2007): Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* 92: 317–339.

Möstl E, Messmann S, Bagu E, Robia C, Palme R (1999): Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *J Vet Med Austria* 46: 621–631.

Möstl E, Palme R (2002): Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* 23: 67–74

Ouschan C, Kuchar A, Möstl E (2013): Measurement of cortisol in dog hair: a noninvasive tool for the diagnosis of hypercortisolism. *Vet Dermatol* 24: 428–431, e93–94.

Palme R, Fischer P, Schilddorfer H, Ismail MN (1996): Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science* 43: 43–63

Schönreiter S, Huber H, Lohmüller V, Zanella AJ, Unshelm J, Henke J, Erhardt W (1999): Salivary cortisol as a stress parameter in piglets. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 27: 175–179.

Touma C, Palme R (2005): Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Ann N Y Acad Sci* 1046: 54–74.

Korrespondenzadresse: Regina Wald, Universitätsklinik für Schweine, Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, 1210 Wien, Österreich, regina.wald@gmx.at