

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der  
Veterinärmedizin  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Tierschutzwissenschaften und Tierhaltung  
(Leitung: Univ.-Prof. Jean-Loup Rault, PhD)

**Verhalten von Kälbern nach Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol unter die  
Hornknospe im Vergleich zur Enthornung mittels Brennstab**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Sophie Bramberger

Wien, im Februar 2021

**Betreuerin:**

Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Susanne Waiblinger

Institut für Tierschutzwissenschaften und Tierhaltung

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

**Begutachter:**

Priv.Doz. Dr. Johannes Lorenz Khol

Universitätsklinik für Wiederkäuer

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

(Universitätsklinik)

Veterinärmedizinische Universität Wien

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Tiere, Material, Methoden .....	4
2.1	Tiere, Haltung und Management .....	4
2.2	Studiendesign .....	5
2.3	Datenerhebung und Analyse .....	6
2.4	Datenaufbereitung und Statistik .....	9
3	Ergebnisse.....	12
3.1	Dauer Ohrenschlagen.....	12
3.2	Häufigkeit Kopfschütteln.....	13
3.3	Häufigkeit Kopfkratzen.....	14
3.4	Häufigkeit Schwanzbewegungen .....	15
3.5	Dauer Fellpflege .....	17
3.6	Dauer Liegen .....	18
3.7	Dauer Erkundungsverhalten.....	19
3.8	Dauer Spielverhalten nach Eingriff .....	20
4	Diskussion .....	23
	Schlussfolgerung .....	29
	Zusammenfassung .....	30
	Summary .....	31
	Literaturverzeichnis .....	32
	Abbildungsverzeichnis.....	36
	Tabellenverzeichnis .....	37
	Abkürzungen .....	38

Anhang 1: Alter und Geschlecht der Versuchskälber.....	39
Anhang 2: Aufstallung der Versuchskälber .....	40
Anhang 3: Ethogramm .....	41
Anhang 4: Beobachterabgleich.....	44
Anhang 5: Datenanalyse mittels linearen gemischten und allgemein linearen Modellen .....	45
Anhang 6: Grafische Darstellung der Variablen .....	51

## 1 Einleitung

Das Enthornen von Kälbern ist vor allem in Milchviehbetrieben, aber auch in der Rindermast seit Beginn der modernen Landwirtschaft und damit einer vermehrten Umstellung auf Laufstallhaltung eine routinemäßig eingesetzte Managementmaßnahme, um Verletzungen der Tiere und Betreuungspersonen zu vermeiden (Cozzi et al. 2015, Kahrer et al. 2008). Eine Umfrage von Cozzi et al. aus dem Jahr 2015 ergab, dass in Europa derzeit etwa 81 % der Milchrinder, 47 % der Mastrinder und 68 % der Rinder in Mutterkuhhaltung keine Hörner haben. Diese Tiere werden meist schon in den ersten Lebenswochen mittels Brennstab oder Ätzpaste enthornt, nur wenige sind genetisch bedingt bereits hornlos (Cozzi et al. 2015). In Österreich ist laut Tierschutzgesetz die Enthornung mittels Ätzpaste verboten, außerdem ist die Zerstörung der Hornanlage bei Kälbern seit 2017 nur mit Sedierung, Lokalanästhesie und einer postoperativ wirksamen Schmerzbehandlung erlaubt (1. Tierhaltungsverordnung 2004). Physiologische und Verhaltensreaktionen der Kälber auf eine solche Enthornung weisen jedoch darauf hin, dass diese Methoden mit Stress und Schmerzen für die Tiere verbunden sind, die auch durch Applikation von Lokalanästhetika vor dem Eingriff oder der Gabe von Nicht-Steroidalen Antiphlogistika nur zu einem gewissen Grad reduziert werden können (Cuttance et al. 2019, Faulkner und Weary 2000, Grondahl-Nielsen et al. 1999, Morisse et al. 1995, Sylvester et al. 2004). Um Schmerzen bei Tieren beschreiben zu können, können physiologische Parameter wie Cortisol im Blut oder die Herzfrequenz gemessen werden; Physiologische Parameter alleine reichen jedoch nicht aus, es sollte außerdem auch das Verhalten beobachtet und analysiert werden (Waiblinger 2012). Verhaltensweisen, die auf Schmerzen insbesondere bei der Enthornung hindeuten, sind unter anderem vermehrtes Kopfschütteln, Kopfkratzen, Ohrenschlagen und Schwanzschlagen (Molony und Kent 1997, Sylvester et al. 2004, Weary et al. 2006). Bei gewissen Individuen führt eine Enthornung nicht nur zu akutem Schmerz, sondern kann auch Auslöser für chronische Schmerzen sein (Casoni et al. 2019). Es stellt sich also nicht nur die Frage, ob enthornt werden soll, sondern vielmehr, welche Möglichkeiten der Enthornung oder welche Alternativen es gibt, diese Prozedur so schonend wie möglich durchzuführen, um die Schmerzen dabei zu minimieren.

Es gibt bereits Ansätze, auf Hornlosigkeit zu züchten. Das ist jedoch eher eine langfristige Lösung, da hierbei momentan noch der hohe Inzuchtfaktor Probleme bereitet und es außerdem

schwierig ist, zusätzlich zur Hornlosigkeit die aktuelle hohe Milchleistung beziehungsweise einen hohen Zuchtwert zu behalten (Windig et al. 2015).

Auf der Suche nach einer Alternative zur Enthornung mittels Brennstab wurde erstmals im Jahr 2014 in einer iranischen Studie an vier Kälbern gezeigt, dass die Injektion von Nelkenöl unter die Hornanlage das Hornwachstum verhindern kann (Molaei et al. 2014). Das ist wahrscheinlich auf das Eugenol zurückzuführen, das mit einer gewissen Variabilität zwischen 48 % und 88 % die Hauptkomponente von Nelkenöl ist (Chaieb et al. 2007). In einer anderen Studie wurde bereits 1978 gezeigt, dass 100 % Eugenol zelluläre Nekrosen an der Schleimhaut bei Mäusen und Ratten auslöst (Kozam und Mantell 1978). Eugenol wirkt nicht nur zytotoxisch, sondern auch antiinflammatorisch, antimikrobiell, antioxidativ, analgetisch und anästhetisch, aber auch gentoxisch; im Gegensatz dazu hat Isoeugenol als Isomer von Eugenol nicht nur eine höhere Zytotoxizität, sondern wirkt auch nicht gentoxisch (Atsumi et al. 2005, Kamatou et al. 2012, Munerato et al. 2005).

Im Vergleich zur Enthornung mittels Brennstab ist die Injektion von Nelkenöl initial weniger schmerzhaft, 48 Stunden nach der Behandlung zeigten Kälber jedoch nicht weniger Stress- und Schmerzverhalten als bei einer Enthornung mit Brennstab (Sutherland et al. 2018).

Da bisher nur die Effekte von Nelkenöl auf das Hornwachstum und das Wohlbefinden von Kälbern untersucht wurden, wird in der vorgelegten Diplomarbeit das Verhalten von Kälbern nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl), nach Injektion von Nelkenöl, nach Injektion von Isoeugenol, und nach Enthornung mittels Brennstab verglichen. Dabei wurden folgende Hypothesen untersucht:

- Nach Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol unter die Hornknospen zeigen die Kälber mehr Schmerzverhalten (wie Kopfschütteln, -kratzen, -scheuern oder Ohrenschielen) und weniger Spiel- und Komfortverhalten (wie Körperschütteln oder Fellpflege) als nach einer Injektion von NaCl.
- Nach Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol zeigen Kälber weniger Anzeichen für Schmerzen als nach Enthornung mittels Brennstab. Dabei wurde angenommen, dass in den Injektionsgruppen mehr Spiel- und Komfortverhalten und weniger Schmerzverhalten gezeigt wird als in der Gruppe, in der die Kälber mittels Brennstab enthornt wurden.

Diese Diplomarbeit ist Teil eines Kooperationsprojekts des Instituts für Tierschutzwissenschaften und Tierhaltung und der Universitätsklinik für Wiederkäuer der Veterinärmedizinischen Universität Wien. In diesem Projekt werden die Auswirkungen von Nelkenöl und Isoeugenol im Vergleich zu NaCl und Enthornung mit Brennstab auf Hornwachstum, Physiologie, Gesundheit und Verhalten bei Kälbern und Ziegen untersucht. Beim Projektteil zu den Effekten auf das Wohlergehen der Kälber, wurden Daten für zwei Diplomarbeiten und eine Doktorarbeit gesammelt. Die Doktorarbeit umfasst die Auswertung aller erhobenen und analysierten Daten, unter anderem die Messung der mechanisch nozizeptiven Schwelle und Infrarotmessungen an den Hornanlagen, Herzfrequenzvariabilität, und Verhaltensbeobachtung und -analyse mittels Direkt- und Videobeobachtung. Eine der Diplomarbeiten analysiert die Daten zur Herzfrequenzvariabilität und Herzfrequenz nach der Enthornung oder Injektion als schmerzanzeigende Parameter. Die hier vorgelegte Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Verhaltensbeobachtung und -auswertung anhand von Videos.

## 2 Tiere, Material, Methoden

### 2.1 Tiere, Haltung und Management

Die Datenerhebung für diese Diplomarbeit fand im Rahmen des Dissertationsprojekts von Frau Anna Juffinger (Institut für Tierschutzwissenschaften und Tierhaltung) im Zeitraum 25.07.2018 bis 24.04.2019 statt. In den Versuch waren insgesamt 40 Kälber einbezogen, 38 gehörten der Rasse Fleckvieh an, davon waren 11 weiblich, 26 männlich und 1 Zwicke, und zwei waren Fleckvieh-Braunvieh-Kreuzungen, je ein weibliches und ein männliches Kalb. Die Kälber waren zum Zeitpunkt des Eingriffs zwischen einem und fünf Tagen alt (Anhang 1, Tab. A 1). Die Kälber stammten aus der Nachzucht der VetFarm der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Je nachdem, wann die Geburt war und ob sie unter Supervision stattfand oder nicht, wurden die Kälber wie folgt versorgt:

- Bei Geburt untertags mit Supervision wurde das Kalb sobald wie möglich mit Kolostrum versorgt. Dieses wurde direkt von der Mutter in die Flasche hineingemolken und dem Kalb gegeben. In den Sommermonaten wurde das Kalb dann gleich in das Kälberiglu gebracht, im Winter erst, sobald das Kalb nach einigen Stunden trocken war.
- Bei Geburt nachts mit Supervision wurde das Kalb sobald wie möglich mit Kolostrum versorgt (siehe oben). Über Nacht wurde es in einer mobilen Kälberbox im Untersuchungsraum getrennt von der Mutter untergebracht, und am nächsten Tag, wenn das Kalb trocken war, kam es ebenfalls in das Kälberiglu nach draußen.
- Bei Geburt nachts ohne Supervision wurde, sobald es bemerkt wurde, die Mutter wieder abgemolken und es wurde versucht, das Kalb zu tränken. Wenn das Kalb trocken war, wurde es am nächsten Morgen hinaus in das Kälberiglu gebracht.

Es wurde also immer versucht, innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Geburt mindestens 2 Liter Kolostrum zu verabreichen. Eine routinemäßige Nabeldesinfektion fand nicht statt, nur falls der Nabel zu kurz abgerissen war, wurde er mehrmals mit Jod desinfiziert.

Innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt wurden den Kälbern Ohrmarken eingezogen und sie erhielten eine Vitamininjektion. Die Iglus waren mit Stroh eingestreut und hatten einen Auslauf mit Sicht- und Hörkontakt zu den anderen Kälbern (Anhang 2, Abb. A1, Abb. A2). In den ersten fünf Lebenstagen erhielten sie aus einem Eimer mit Saugnuckel dreimal täglich je 2 Liter

Kolostrum, anschließend zweimal täglich je 3 Liter pasteurisierte Vollmilch. Die Fütterungszeiten waren gegen 08:00 Uhr morgens, gegen 13:00 Uhr mittags und gegen 18:00 abends, allerdings waren diese vom Stallpersonal abhängig und davon, wie viel Arbeit sonst noch anfiel. Daher verschoben sich diese Zeiten teilweise auch um bis zu  $\pm$  eineinhalb Stunden. Heu und Wasser standen *ad libitum* in zwei Eimern an der Außenseite des Auslaufgitters mit Fressdurchlass zur Verfügung. Nach zehn bis vierzehn Tagen wurden die Kälber in die Gruppenhaltung umgestellt.

## 2.2 Studiendesign

Die Studie wurde von der Ethik- und Tierschutzkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien geprüft und befürwortet sowie in Übereinstimmung mit der Good Scientific Practice und unter Beachtung der einschlägigen nationalen Rechtsvorschriften durchgeführt. Die Tierversuchsgenehmigung (BMWFWD68.205/0049DWF/V/3b/16) wurde durch das Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft (BMWF) erteilt.

Die Kälber waren zu Versuchsbeginn (am Tag des Eingriffs) ein bis fünf Tage alt (Mittelwert  $\pm$  Std.-Abweichung:  $2.85 \pm 1.260$ ) und wurden randomisiert auf vier Behandlungsgruppen á 10 Kälber aufgeteilt:

- BS: Enthornung mittels Brennstab (Buddex, Albert Kerbl GmbH, Germany), mit vorhergehender Sedierung (0,1 mg/kg Xylazin (Sedaxylan 20 mg/ml, Eurovet Animal Health B.V., AE Bladel, Netherlands) i.m.) und Lokalanästhesie (5 ml Procainhydrochlorid (Procamidol 20 mg/ml, Richter Pharma AG, Wels, Austria) s.c. je Seite)
- NEL: Injektion von je 1,5 ml Nelkenöl (Syzgium aromaticum; 80.18 % eugenol, Herba Chemosan Apotheker-AG, Austria) unter die beiden Hornknospen
- ISO: Injektion von je 1,5 ml Isoeugenol (99 % isoeugenol, Merck KGaA, Germany) unter die Hornknospen
- NAEL: Injektion von je 1,5 ml NaCl (Kochsalz „Braun 0.9 % - Infusionslösung“, B. Braun Austria GmbH, Austria) unter die Hornknospen

Für die Injektionen wurde eine 16 G Nadel (BOVIVET 16G x 1-1/2“ 1.6 x 38 mm, Jørgen KRUISE A/S, Denmark) verwendet. Diese wurde von rostro-medial unter die Hornknospe

Richtung Ohrbasis eingeführt. Der Eingriff wurde von zwei Personen der Universitätsklinik für Wiederkäuer durchgeführt.

Für die Enthornung mittels Brennstab wurde zuerst der Brennstab angesteckt, das Kalb sediert, und sobald es ruhig lag lokal anästhesiert. Nach etwa fünf Minuten wurde geprüft, ob die lokale Anästhesie wirkte und der Brennstab heiß genug war. Dann wurde der Brennstab auf die Haut aufgesetzt, mit kreisenden Bewegungen und Druck herunter gebrannt, und schließlich die Hornanlage herausgehobelt.

Der Eingriff fand nach der morgendlichen Fütterung gegen 10 Uhr statt.

### 2.3 Datenerhebung und Analyse

Im Zuge des Gesamtprojekts wurden verschiedene Daten am Kalb erhoben. Es wurde die Herzfrequenz mittels Brustgurt gemessen, die Größe der Hornknospen bzw. Wundgrößen ausgemessen und es wurden Infrarotmessungen sowie Messungen der mechanisch nozizeptiven Schwelle (MNT-Messungen) im Bereich der Hornknospen durchgeführt sowie Direktbeobachtungen des Verhaltens (siehe Juffinger et al. 2021 submitted, Juffinger et al. in preparation). Für diese Diplomarbeit wurden Verhaltensbeobachtungen anhand von Videoaufnahmen durchgeführt und ausgewertet. Diese wurden mit einem festinstallierten Kamerasystem (Fa. Sanyo, 1/3“, VCC-HD2300P) mit dem Geovision System (GeoVision, Surveillance System V8.5.6) aufgenommen, das sowohl Tagesaufnahmen, als auch durch eine Infrarotfunktion (Infrarotscheinwerfer Fa. Microlight, IR-LED294S-90 (880nm, 90°)) Nachtaufnahmen ermöglicht. Dabei filmte eine Kamera jeweils zwei Kälber, und eine weitere Kamera die Umgebung, um etwaige Störungen aufzunehmen.

Pro Kalb wurden 20minütige Beobachtungen an vier verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, die so ausgewählt wurden, dass die anderen Manipulationen möglichst keinen Einfluss auf das Verhalten der Kälber hatten. Die Zeitpunkte wurden daher wie folgt ausgewählt:

- T0vm: am Tag des Eingriffs (T0), etwa fünf Minuten nach Ende der morgendlichen Fütterung
- T0nm: am Tag des Eingriffs fünf Minuten nach der letzten Manipulation (MNT-Messung, Gurtabnahme von Herzfrequenzmessung) sechs Stunden nach dem Eingriff
- T1vm: am Tag nach dem Eingriff (T1) mit gleichem Zeitabstand zur morgendlichen Fütterung wie bei T0vm

- T1nm: am Tag nach dem Eingriff zur gleichen Tageszeit wie an T0nm

Der Zeitplan der beiden Tage ist in Tab. 1 ersichtlich. Die erste Beobachtung an T0 ist als Baseline zu verstehen, da sie vor dem Eingriff stattfand, die anderen drei Beobachtungen fanden danach statt. Da sich die einzelnen Fütterungen und Manipulationen teilweise zeitlich etwas verschoben haben, wurden die einzelnen Kälber zu jeweils anderen Uhrzeiten beobachtet, ausgewählt nach dem oben genannten Schema.

Tab. 1: Zeitplan des Versuchsablaufs an T0 und T1

<b>Tag 0:</b>	
gegen 08:00 Uhr	Fütterung
08:00 Uhr	Herzfrequenz (HF)-Gurt anlegen
08:10-08:30 Uhr	Direktbeobachtung
<b>08:10-08:30 Uhr</b>	<b>Videobeobachtung T0vm</b>
09:10 Uhr	Region um Hornknospe ausrasieren und Messpunkte einzeichnen; anschließend MNT-Messung
09:50 Uhr	Infrarot-Aufnahme
10:00 Uhr	Eingriff, Direktbeobachtung Eingriff
15 min nach Eingriff	Infrarot, MNT, Horn- und Wundgröße
11:00 Uhr	Direktbeobachtung, Infrarot
12:00 Uhr	Direktbeobachtung, Infrarot, HF-Uhr wechseln
13:00 Uhr	Direktbeobachtung
gegen 13:00 Uhr	Fütterung (falls 3x tgl.)
14:00 Uhr	Direktbeobachtung
15:00 Uhr	Direktbeobachtung
16:00 Uhr	Direktbeobachtung, Infrarot, MNT, HF-Gurtabnahme
<b>ca. 16:30-16:50 Uhr</b>	<b>Videobeobachtung T0nm</b>
gegen 18:00 Uhr	Fütterung
19:00 Uhr	Direktbeobachtung, Infrarot, MNT
<b>Tag 1:</b>	
gegen 08:00 Uhr	Fütterung
08:00 Uhr	HF-Gurt anlegen
08:10-08:30 Uhr	Direktbeobachtung
<b>08:10-08:30 Uhr</b>	<b>Videobeobachtung T1vm</b>
08:35 Uhr	Infrarot, MNT, Horn- und Wundgröße
12:00 Uhr	Infrarot, HF-Uhr wechseln
gegen 13:00 Uhr	Fütterung (falls 3x tgl.)
16:00 Uhr	HF-Gurt abnehmen
<b>ca. 16:30-16:50 Uhr</b>	<b>Videobeobachtung T1nm</b>
gegen 18:00 Uhr	Fütterung

Die Auswertung verschiedener Verhaltensweisen (eingeteilt in Schmerz-, Spiel-, Komfort-, Erkundungs- und Basisverhalten; siehe verwendetes Ethogramm in englischer Sprache in Anhang 3, Tab. A 2) sowie des durch die Umgebungskamera aufgezeichneten Auftretens von Störungen (Menschen oder Fahrzeuge) und des Vorhandenseins von Fliegen erfolgte mittels der Beobachtungssoftware BORIS v.7.5.3 (Friard and Gamba, 2016). Vor der Kodierung der für diese Diplomarbeit ausgewählten Zeitpunkte fand ein Inter- und ein Intra-Beobachter-Abgleich mit Videos von anderen Zeitpunkten statt, die beide für alle Verhaltensweisen mit jeweils  $Kappa(2s) > 0.75$  abgeschlossen wurden (Anhang 4, Tab. A 3). Die Verhaltensbeobachtungen wurden von der Autorin der hier vorgelegten Diplomarbeit durchgeführt, die für die Behandlung verblindet war. Die Entblindung erfolgte erst nach Abschluss der statistischen Analyse der Daten.

#### 2.4 Datenaufbereitung und Statistik

Die mit der Beobachtungssoftware BORIS aufgezeichneten Daten wurden zur weiteren Bearbeitung in EXCEL (Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, USA) exportiert und mit den tierindividuellen Daten wie Ohrmarkennummer, Geschlecht, Geburtsdatum, Alter am Tag des Eingriffs und am Tag der Beobachtung, Datum des Eingriffs, sowie potentiellen Störvariablen (z.B. Umgebungstemperatur oder das Vorhandensein von Fliegen zum Zeitpunkt der jeweiligen Beobachtung) ergänzt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS (Version 25.0, IBM Corp., Armonk, NY). Zuerst wurde eine Korrektur auf die tatsächliche mögliche Sichtbarkeit der Verhaltensweisen vorgenommen. Dabei wurde der Zeitraum, in dem es nicht möglich war, eine bestimmte Verhaltensweise zu sehen, weil beispielsweise das Kalb zur Hälfte im Iglu war und dieser Bereich von der Kamera nicht aufgezeichnet werden konnte, von der gesamten beobachteten Zeit (20 min) abgezogen (ergab die tatsächlich beobachtete Zeit). Dann wurden die beobachteten Häufigkeiten und Dauern des jeweiligen Verhaltens wieder auf 20 Minuten hochgerechnet. Die Berechnung sah wie folgt aus: Häufigkeit bzw. Dauer des jeweiligen Verhaltens / tatsächlich beobachtete Zeit in s \* 1200s.

Für die Datenanalyse durch Modelle wurden nicht alle beobachteten Verhaltensweisen ausgewählt, sondern nur jene, von denen auf Grund früherer Studien erwartet wurde, dass sie

in Bezug auf Beantwortung der Fragestellung besonders aussagekräftig wären. Es wurden die schmerzanzeigenden Verhaltensweisen analysiert (Kopfschütteln, Kopfkratzen und Ohrenschlagen; außerdem Dauer Liegen), Verhaltensweisen, die auf Wohlbefinden des Kalbes hinweisen (Spielverhalten, Erkundungsverhalten, Fellpflege) und noch Schwanzbewegungen, da hier in der Literatur noch wenig beschrieben ist und es aber auch eventuell auf Schmerzen oder Unwohlsein hindeuten könnte.

Bei Verhaltensweisen, für die sowohl Häufigkeit als auch Dauer bestimmt wurde, wurde die Korrelation zwischen diesen beiden berechnet. Sofern der Korrelationskoeffizient über 0,85 war, wurde für diese Verhaltensweise nur mit der Dauer gerechnet. Es wurde davon ausgegangen, dass die Dauer insgesamt aussagekräftiger sein würde.

Die Verhaltensweisen wurden mit linearen gemischte Effekte Modellen (GLMM) untersucht mit den fixen Effekten Behandlung (BS, NEL, ISO, NACL), Beobachtung (T0vm, T0nm, T1vm, T1nm), Geschlecht (weiblich inklusive 1 Zwicke / männlich), das Vorhandensein von Fliegen (ja/nein) und allen Interaktionen, sowie dem Tier als Zufallseffekt. Als Kovariaten wurden das Alter in Tagen zum Zeitpunkt des Eingriffs und die Temperatur zum Zeitpunkt der Beobachtung in das Modell aufgenommen, ebenso die Interaktionen mit den anderen fixen Effekten. Die Modelle wurden schrittweise reduziert, indem zunächst nicht-signifikante dreifach-Interaktionen, danach nicht-signifikante zweifach-Interaktionen und anschließend auch Haupteffekte (sofern diese in keiner signifikanten Interaktion beteiligt waren) entfernt wurden. Die Interaktion Behandlung\*Beobachtung und der Haupteffekt Beobachtung wurden auch bei Nicht-Signifikanz im Modell behalten, da es für die Fragestellung relevant war; falls jedoch kein gültiges Modell angepasst werden konnte, dann wurde die Interaktion gegebenenfalls entfernt. Die Modellauswahl erfolgte zwischen Modellen, die die Modellvoraussetzungen erfüllten, mit dem Akaike-Informations-Kriterium, d.h. es waren teilweise auch nicht-signifikante Interaktionen in den Endmodellen vorhanden. Die Modellvoraussetzungen (Normalverteilung und Homoskedastizität der Residuen) wurden graphisch überprüft. Waren die Modellvoraussetzungen nicht erfüllt, wurden die Zielvariablen log-transformiert und die Modelle erneut gerechnet. Dies war der Fall für die Verhaltensweisen „Dauer Ohrenschlagen“, „Häufigkeit Kopfkratzen“, „Häufigkeit Schwanzbewegungen“, „Dauer Fellpflege“ und „Dauer Erkundungsverhalten“. Für die Variable „Dauer

Spielverhalten“ (zusammengefasste Variable aus „Dauer Kopfspiel“ und „Dauer Bewegungsspiel“) konnte auch nach Transformation kein gültiges Modell gerechnet werden. Daher wurden die Zeitpunkte nach dem Eingriff (T0nm, T1vm und T1nm) aggregiert. Für diese Variable „Dauer Spielverhalten nach Eingriff“ als Zielvariable wurde ein allgemeines lineares Modell (ANOVA) mit Behandlung, Geschlecht, Temperatur und Alter in Tagen zum Zeitpunkt des Eingriffs als Faktoren bzw. Kovariaten sowie Interaktionen. Post-hoc paarweise Vergleiche erfolgten mit Bonferroni-Korrektur. Die Modellselektion und Modellüberprüfung erfolgte wie bei den GLMM.

Für alle statistischen Tests wurde ein Alpha-Level von 0,05 für signifikante Ergebnisse und 0,1 für Tendenzen gewählt. Zur Beschreibung der Ergebnisse werden im Text die vom Modell geschätzten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ohne Rücktransformation dargestellt (sodass es bei log-transformierten Variablen zu negativen Werten kommt), die Graphiken basieren sofern nicht anders angegeben auf den Rohdaten und werden als Boxplots dargestellt.

### 3 Ergebnisse

Die Modellergebnisse mit Schätzwerten werden gesammelt in Tab. A 4 im Anhang 5 dargestellt. Abbildungen zum Auftreten der verschiedenen Verhaltensweisen je nach Behandlung und Beobachtungszeitpunkt sind im Anhang 6, Abb. A3 zu finden.

#### 3.1 Dauer Ohrenschlagen

Das Ohrenschlagen wurde signifikant von der Behandlung ( $p=0,018$ ), Beobachtung ( $p=0,003$ ), Temperatur ( $p=0,043$ ), Fliegen ( $p=0,000$ ), Behandlung\*Beobachtung ( $p=0,006$ ) und Behandlung\*Temperatur ( $p=0,011$ ) beeinflusst (Anhang 5, Tab. A 4). In der Behandlungsgruppe NEL schlugen Kälber signifikant weniger mit den Ohren als in der Gruppe BS ( $-0,106\pm 0,171$  und  $0,417\pm 0,119$ ,  $p=0,017$ ) und tendenziell weniger als in der Gruppe NACL ( $0,376\pm 0,217$ ,  $p=0,090$ ).

Zum Beobachtungszeitpunkt T1vm ( $-0,161\pm 0,135$ ) fand über alle Behandlungen hinweg weniger Ohrenschlagen statt als zu anderen Zeitpunkten (T0vm  $0,414\pm 0,087$ ,  $p=0,001$ ; T0nm  $0,241\pm 0,088$ ,  $p=0,014$ ; T1nm  $0,360\pm 0,106$ ,  $p=0,003$ ). Das Vorhandensein von Fliegen führte zu vermehrtem Ohrenschlagen, unabhängig von der Behandlungsgruppe (vorhanden:  $0,713\pm 0,133$ , nicht vorhanden:  $-0,286\pm 0,078$ ;  $p=0,000$ , Abb. 1).

Bei den Gruppen NACL, NEL und ISO war jeweils T0vm der Zeitpunkt mit dem meisten Ohrenschlagen ( $0,699\pm 0,214$ ,  $0,288\pm 0,175$  und  $0,445\pm 0,156$ ) und T1nm derjenige mit der zweitlängsten Dauer (NACL:  $0,490\pm 0,176$ , NEL:  $0,191\pm 0,280$ ), mit geringeren Werten an T0nm und T1vm für ISO ( $0,161\pm 0,151$  und  $0,198\pm 0,323$ ) und noch deutlicher für NEL ( $0,244\pm 0,225$  und  $-0,658\pm 0,297$ ), dagegen für NACL nur wenig Unterschied bei T0nm ( $0,414\pm 0,168$ ) und einem deutlich niedrigeren Wert als an den anderen Zeitpunkten nur an T1vm ( $-0,521\pm 0,257$ ). Im Gegensatz dazu zeigten Kälber der Gruppe BS am wenigsten Ohrenschlagen an T0vm ( $0,224\pm 0,141$ ), an den nachfolgenden Zeitpunkten jeweils mehr Ohrenschlagen mit dem Höchstwert an T0nm (T0nm  $0,633\pm 0,152$ , T1vm  $0,337\pm 0,181$ , T1nm  $0,473\pm 0,170$ , Anhang 6, Abb. A3).

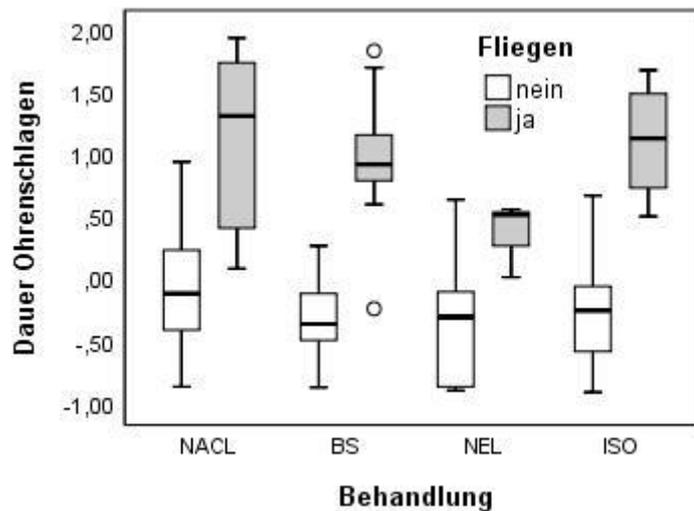


Abb. 1: Dauer Ohrenschlagen (log-transformiert) in Sekunden pro 20 min (Fliegen nein/ja: NACL n=13/10, BS n=19/9, NEL n=14/3, ISO n=16/4)<sup>1</sup>

### 3.2 Häufigkeit Kopfschütteln

Kopfschütteln wurde signifikant beeinflusst von Behandlung ( $p=0,042$ ), Fliegen ( $p=0,026$ ), Behandlung\*Fliegen ( $p=0,002$ ), Behandlung\*Temperatur ( $p=0,027$ ) und im Trend von Behandlung\*Beobachtung ( $p=0,097$ , Tab. A 4). Kälber in der Behandlungsgruppe ISO zeigten deutlich mehr Kopfschütteln ( $1,491 \pm 0,301$ ) als in den Gruppen NACL ( $0,476 \pm 0,308$ ,  $p=0,019$ ) und NEL ( $0,422 \pm 0,349$ ,  $p=0,020$ ).

Kälber der Gruppe NACL zeigten im Verlauf der Beobachtungen immer weniger Kopfschütteln (T0vm  $0,816 \pm 0,464$ , T0nm  $0,796 \pm 0,543$ , T1vm  $0,209 \pm 0,211$ , T1nm  $0,085 \pm 0,398$ ), in den Gruppen NEL und ISO wurde das Kopfschütteln innerhalb der ersten drei Beobachtungen immer weniger und stieg zum Zeitpunkt T1nm wieder an (Tab. A 4). In der Gruppe BS wurde an T0nm am häufigsten mit dem Kopf geschüttelt, danach sanken die Werte wieder, waren jedoch erst zum letzten Beobachtungszeitpunkt T1nm niedriger als zu Beginn an T0vm (Tab. A 4).

Bei Vorhandensein von Fliegen schüttelten die NACL-Kälber den Kopf nach Berücksichtigung der weiteren Faktoren deutlich weniger als Kälber der anderen drei Behandlungen, wobei ISO am häufigsten den Kopf schüttelte, gefolgt von BS und NEL. Wurden keine Fliegen registriert,

<sup>1</sup> NACL=Natriumchlorid-Kälber, BS=Brennstab-Kälber, NEL=Nelkenöl-Kälber, ISO=Isoeugenol-Kälber

trat Kopfschütteln bei NACL und BS gleich häufig auf und häufiger als bei ISO und NEL auf (Tab. A 4). In den Rohdaten ist diese Interaktion kaum ersichtlich (Abb. 2).

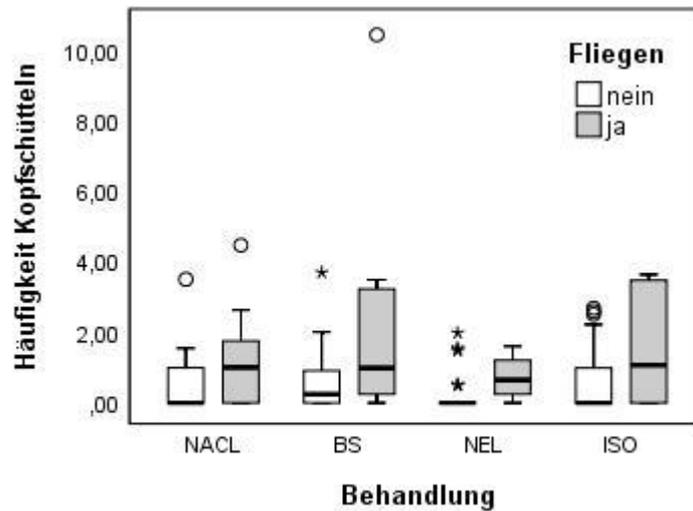


Abb. 2: Häufigkeit Kopfschütteln in Sekunden pro 20 min (Fliegen nein/ja: NACL n=12/26, BS n=11/28, NEL n=4/34, ISO n=6/34)<sup>2</sup>

### 3.3 Häufigkeit Kopfkratzen

Kopfkratzen wurde signifikant beeinflusst von Alter bei Behandlung ( $p=0,033$ ), Beobachtung ( $p<0,001$ ), Behandlung\*Beobachtung ( $p=0,033$ ) und Beobachtung\*Fliegen ( $p=0,004$ , Tab. A 4). Ältere Kälber kratzten sich häufiger am Kopf als jüngere (Abb. 3). Die Kälber zeigten unabhängig von der Behandlungsgruppe an den Nachmittagen signifikant mehr Kopfkratzen als an den Vormittagen ( $p<0,012$ ), und an T1nm signifikant mehr als an T0nm ( $p=0,044$ , T0vm  $0,020\pm 0,054$ , T0nm  $0,232\pm 0,056$ , T1vm  $0,062\pm 0,045$ , T1nm  $0,393\pm 0,062$ ).

In allen Gruppen kratzten sich die Kälber zum Zeitpunkt T1nm (NACL  $0,369\pm 0,112$ , BS  $0,315\pm 0,111$ , NEL  $0,318\pm 0,115$ , ISO  $0,572\pm 0,115$ ) am meisten den Kopf und an T0nm ( $0,252\pm 0,100$ ,  $0,281\pm 0,106$ ,  $0,216\pm 0,105$ ,  $0,180\pm 0,105$ ) am zweithäufigsten. Bei NACL, BS und NEL war der niedrigste Wert jeweils an T0vm ( $0,005\pm 0,081$ ,  $-0,035\pm 0,073$ ,  $-0,034\pm 0,089$ ), bei ISO an T1vm ( $-0,018\pm 0,080$ , Abb. A3). An den Nachmittagen zeigten alle Kälber bei Vorhandensein von Fliegen mehr Kopfkratzen, an den Vormittagen weniger (Abb. 4).

<sup>2</sup> NACL=Natriumchlorid-Kälber, BS=Brennstab-Kälber, NEL=Nelkenöl-Kälber, ISO=Isoeugenol-Kälber

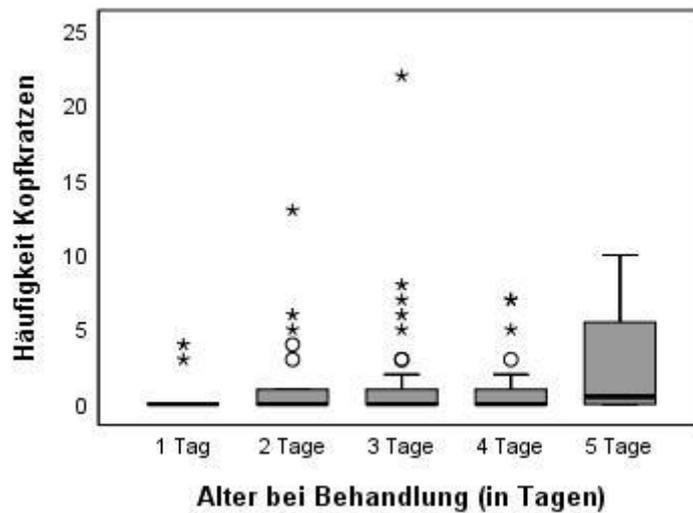


Abb. 3: Häufigkeit Kopfkratzen pro 20 min (1d n=32, 2d n=28, 3d n=48, 4d n=36, 5d n=16)

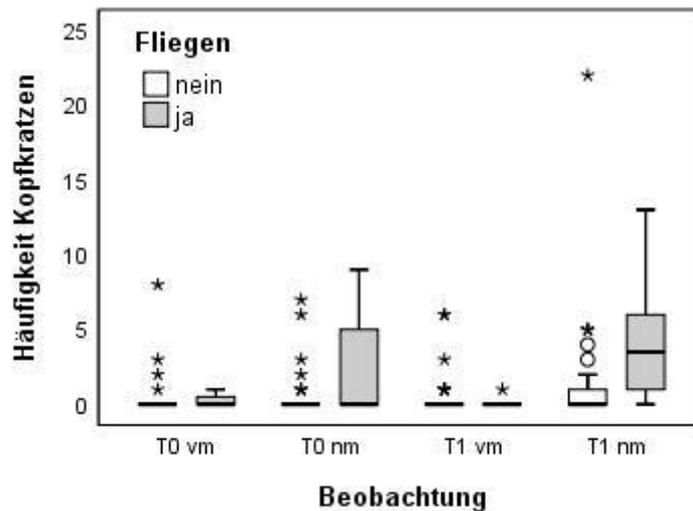


Abb. 4: Häufigkeit Kopfkratzen pro 20 min (Fliegen nein/ja: T0vm n=34/4, T0nm n=28/11, T1vm n=30/8, T1nm n=30/10)<sup>3</sup>

### 3.4 Häufigkeit Schwanzbewegungen

Schwanzbewegungen wurden signifikant beeinflusst von Behandlung ( $p=0,024$ ), Geschlecht ( $p=0,011$ ), Alter bei Behandlung ( $p<0,001$ ), Fliegen ( $p<0,001$ ), Behandlung\*Beobachtung ( $p=0,044$ ), Behandlung\*Alter ( $p=0,005$ ) und tendenziell von Behandlung\*Fliegen ( $p=0,080$ , Tab. A 4). Kälber der Gruppe BS zeigten die meisten Schwanzbewegungen ( $0,717\pm 0,096$ ),

<sup>3</sup> T0vm=Tag 0 Vormittag, T0nm= Tag 0 Nachmittag, T1vm=Tag 1 Vormittag, T1nm=Tag 1 Nachmittag

Kälber der Gruppe ISO die wenigsten ( $0,533\pm 0,134$ ). Männliche Kälber zeigten mehr Schwanzbewegungen als weibliche ( $0,759\pm 0,067$  und  $0,482\pm 0,090$ ). Das Vorhandensein von Fliegen führte zu signifikant mehr Schwanzbewegungen, insbesondere bei Kälbern der Behandlungsgruppen BS (vorhanden  $1,032\pm 0,164$ , nicht vorhanden  $0,402\pm 0,100$ ) und NEL (vorhanden  $1,250\pm 0,283$ , nicht vorhanden  $-0,005\pm 0,116$ ; Abb. 5).

Kälber der Behandlung NACL zeigten an den beiden Nachmittags-Beobachtungen mehr Schwanzbewegungen (T0nm:  $0,796\pm 0,205$ , T1nm:  $0,811\pm 0,156$ ) als an den beiden Vormittags-Beobachtungen (T0vm:  $0,469\pm 0,166$ , T1vm:  $0,357\pm 0,145$ ). Kälber der Behandlung BS zeigten an T1vm ( $0,926\pm 0,130$ ) und T1nm ( $0,883\pm 0,138$ ) mehr Schwanzbewegungen als an T0vm ( $0,561\pm 0,134$ ) und T0nm ( $0,499\pm 0,206$ ). In der Gruppe NEL wurden zu Beginn die meisten Schwanzbewegungen beobachtet (T0vm  $0,806\pm 0,191$ ), weniger an T1nm ( $0,653\pm 0,159$ ) und die wenigsten an T1vm ( $0,528\pm 0,192$ ) und T0nm ( $0,503\pm 0,211$ ). In der Gruppe ISO gab es kaum Unterschiede (T0vm  $0,527\pm 0,167$ , T0nm  $0,564\pm 0,213$ , T1vm  $0,587\pm 0,169$ , T1nm  $0,456\pm 0,161$ ; Tab. A 4, Abb. A3).

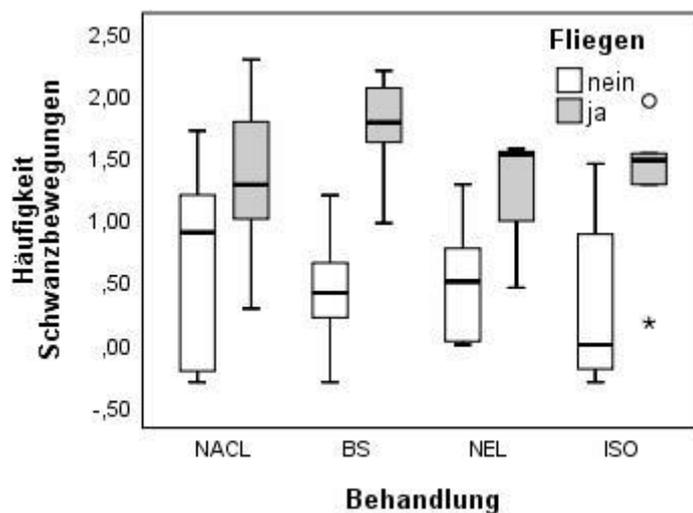


Abb. 5: Häufigkeit Schwanzbewegungen (log-transformiert) pro 20 min (Fliegen nein/ja: NACL n=9/10, BS n=13/9, NEL n=11/3, ISO n=20/5)<sup>4</sup>

<sup>4</sup> NACL=Natriumchlorid-Kälber, BS=Brennstab-Kälber, NEL=Nelkenöl-Kälber, ISO=Isoeugenol-Kälber

### 3.5 Dauer Fellpflege

Fellpflege wurde signifikant beeinflusst von Behandlung ( $p=0,003$ ), Alter bei Behandlung ( $p<0,001$ ), Temperatur ( $p=0,028$ ), Behandlung\*Alter ( $p=0,031$ ), Behandlung\*Temperatur ( $p=0,001$ ) und tendenziell von Behandlung\*Beobachtung ( $p=0,061$ , Tab. A 4). In den Behandlungsgruppen NACL ( $1,147\pm 0,159$ ) wurde mehr Fellpflege beobachtet als bei BS ( $0,646\pm 0,133$ ,  $p=0,22$ ) und NEL ( $0,354\pm 0,135$ ,  $p=0,001$ ). Auch Kälber der Gruppe ISO ( $1,049\pm 0,131$ ) zeigten signifikant mehr Fellpflege als Kälber der Gruppen BS und NEL ( $p=0,038$  und  $p=0,001$ ). Grundsätzlich zeigten ältere Kälber mehr Fellpflege als jüngere (Abb. 6). Ein Unterschied zwischen den Behandlungen war bei den jüngsten Kälbern am geringsten, bei älteren Kälbern dagegen deutlicher; entweder BS oder NEL zeigten jedoch in jedem Alter die kürzeste Dauer an Fellpflege, NACL oder ISO Kälber in unterschiedlichem Alter die längste (Abb. 7).

Während die Fellpflege bei den NACL-Kälbern eher gleichbleibend war oder leicht anstieg, lag bei den BS Kälbern ein deutlicher Einbruch sechs Stunden nach dem Eingriff vor mit fast keiner Fellpflege. Bei NEL sank die Fellpflege nach dem Eingriff (T0nm und T1vm) ebenfalls, und erreichte an T1nm wieder den Ausgangswert. Kälber der Gruppe ISO zeigten zu Beginn die wenigste Fellpflege (T0vm  $0,702\pm 0,258$ ), an T0nm die meiste ( $1,285\pm 0,129$ ) und dann kontinuierlich wieder weniger (T1vm  $1,129\pm 0,251$ , T1nm  $1,079\pm 0,289$ , Abb. A3).

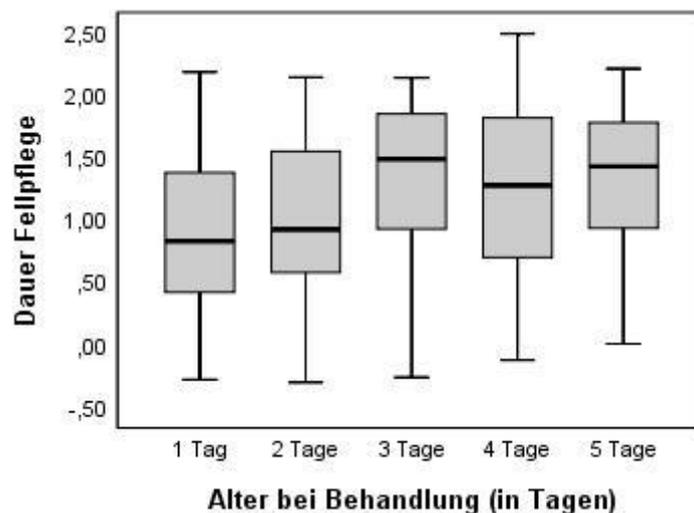


Abb. 6: Dauer Fellpflege (log-transformiert) in Sekunden pro 20 min (1d n=14, 2d n=15, 3d n=28, 4d n=27, 5d n=13)

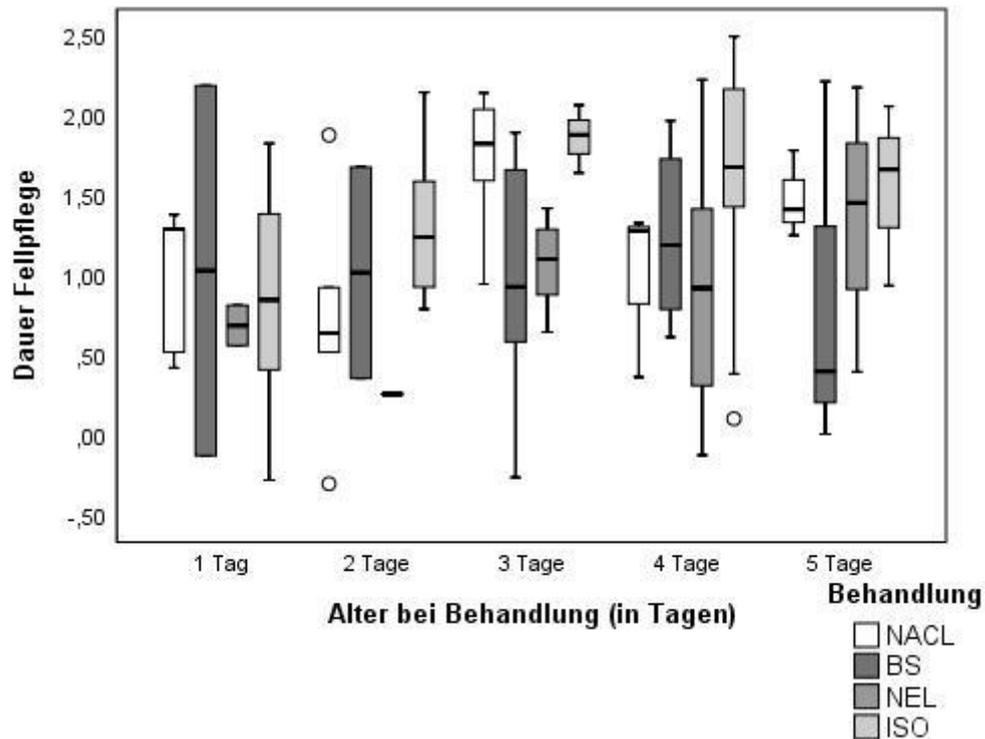


Abb. 7: Dauer Fellpflege (log-transformiert) in Sekunden pro 20 min (1d NACL n=5, BS n=2, NEL n=2, ISO n=5; 2d NACL n=5, BS n=2, NEL n=1, ISO n=7; 3d: NACL n=9, BS n=9, NEL n=7, ISO n=3; 4d: NACL n=3, BS n=6, NEL n=9, ISO n=9; 5d: NACL n=3, BS n=3, NEL n=4, ISO n=3)<sup>5</sup>

### 3.6 Dauer Liegen

Liegen wurde signifikant beeinflusst von Behandlung ( $p=0,023$ ), Alter bei Behandlung ( $p=0,038$ ), Temperatur ( $p=0,005$ ), Behandlung\*Alter ( $p=0,030$ ) und tendenziell von Behandlung\*Temperatur ( $p=0,079$ , Tab. A 4). Es gab weder eine signifikante Interaktion zwischen Behandlung und Beobachtungszeitpunkt noch einen Haupteffekt des Beobachtungszeitpunktes. Trotz signifikantem Haupteffekt der Behandlung erbrachten die paarweisen post-hoc Vergleiche der Behandlungsgruppen keinen Unterschied ( $p$ -Werte von 0,38 bis 0,83). Jüngere Kälber lagen mehr als ältere (Abb. 8).

<sup>5</sup> NACL=Natriumchlorid-Kälber, BS=Brennstab-Kälber, NEL=Nelkenöl-Kälber, ISO=Isoeugenol-Kälber

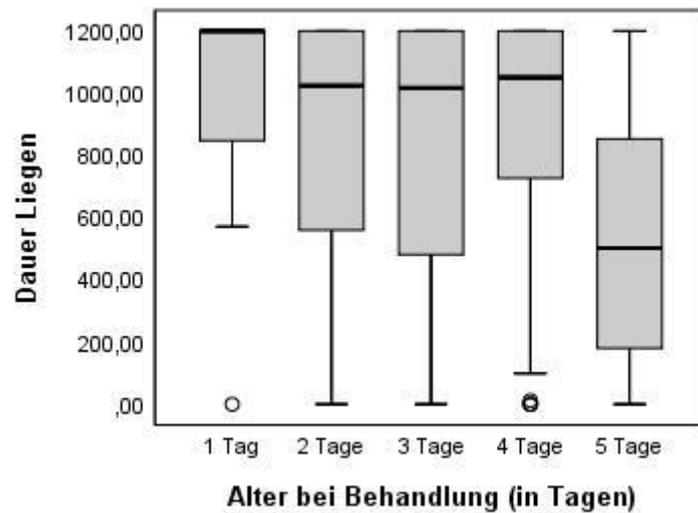


Abb. 8: Dauer Liegen in Sekunden pro 20 min (1d n=31, 2d n=24, 3d n=48, 4d n=36, 5d n=16)

### 3.7 Dauer Erkundungsverhalten

Erkundungsverhalten wurde signifikant beeinflusst von Behandlung ( $p=0,032$ ), Alter bei Behandlung ( $p=0,001$ ), Temperatur ( $p=0,004$ ), Behandlung\*Alter ( $p=0,029$ ) und Behandlung\*Temperatur ( $p=0,018$ , Tab. A 4). Auch hier gab es weder eine signifikante Interaktion zwischen Behandlung und Beobachtungszeitpunkt noch einen Haupteffekt des Beobachtungszeitpunktes. Kälber der Gruppe NACL zeigten am meisten Erkundungsverhalten ( $1,210 \pm 0,199$ ), gefolgt von BS ( $1,096 \pm 0,158$ ), NEL ( $1,083 \pm 0,188$ ) und ISO ( $1,026 \pm 0,183$ ). Bei älteren Kälbern wurde länger Erkundungsverhalten beobachtet als bei jüngeren (Abb. 9).

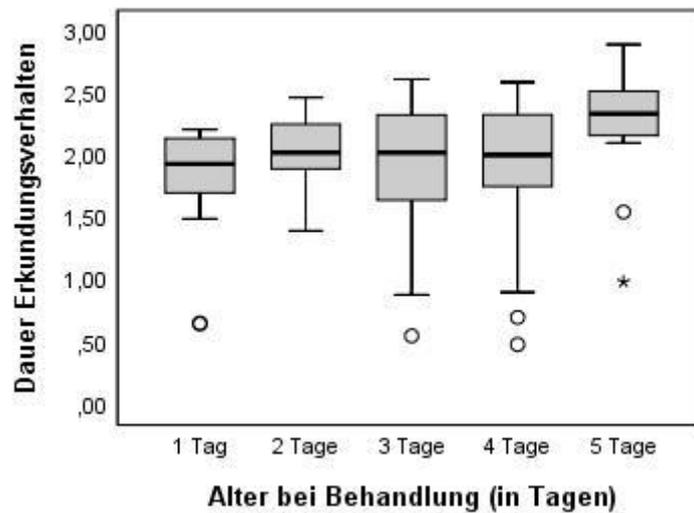


Abb. 9: Dauer Erkundungsverhalten in Sekunden pro 20 min (1d n=11, 2d n=13, 3d n=32, 4d n=21, 5d n=14)

### 3.8 Dauer Spielverhalten nach Eingriff

Das Spielverhalten nach dem Eingriff wurde signifikant beeinflusst von Behandlung ( $p=0,003$ ), Alter ( $p=0,050$ ) und Geschlecht\*Temperatur ( $p=0,018$ , Tab. A 4). Kälber der Behandlungsgruppe NEL spielten weniger als Kälber der Behandlung NACL ( $p=0,005$ ), ISO ( $p=0,031$ ) und BS ( $p=0,022$ , Abb. 10). Generell spielten die Kälber mehr, je älter sie waren (Abb. 11). Die Temperatur hatte in Abhängigkeit vom Geschlecht einen Einfluss auf das Spielverhalten der Kälber: männliche Kälber spielten länger bei kühlen Temperaturen und weibliche bei wärmeren (Abb. 12).

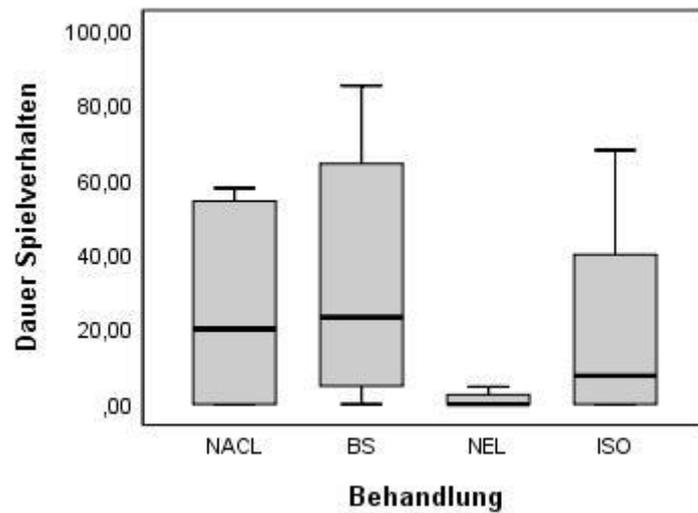


Abb. 10: Durchschnittliche Dauer Spielverhalten nach Eingriff in Sekunden pro 20 min (NACL n=10, BS n=41, NEL n=10, ISO n=10)<sup>6</sup>

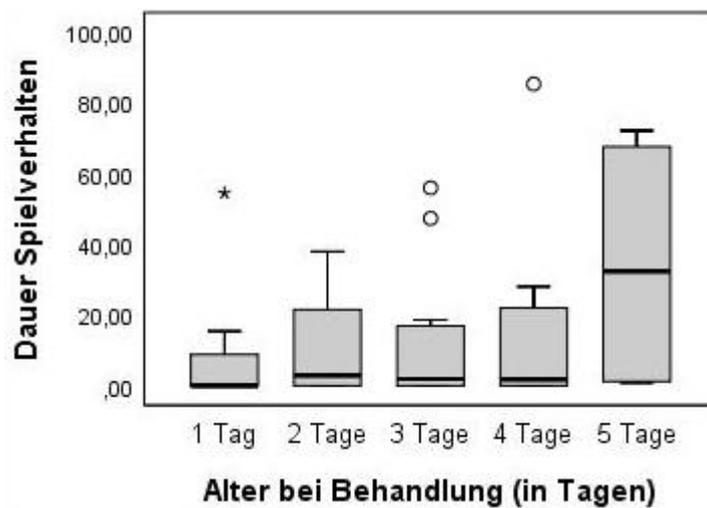


Abb. 11: Dauer Spielverhalten nach Eingriff in Sekunden pro 20 min (1d n=8, 2d n=7, 3d n=12, 4d n=9, 5d n=4)

<sup>6</sup> NACL=Natriumchlorid-Kälber, BS=Brennstab-Kälber, NEL=Nelkenöl-Kälber, ISO=Isoeugenol-Kälber

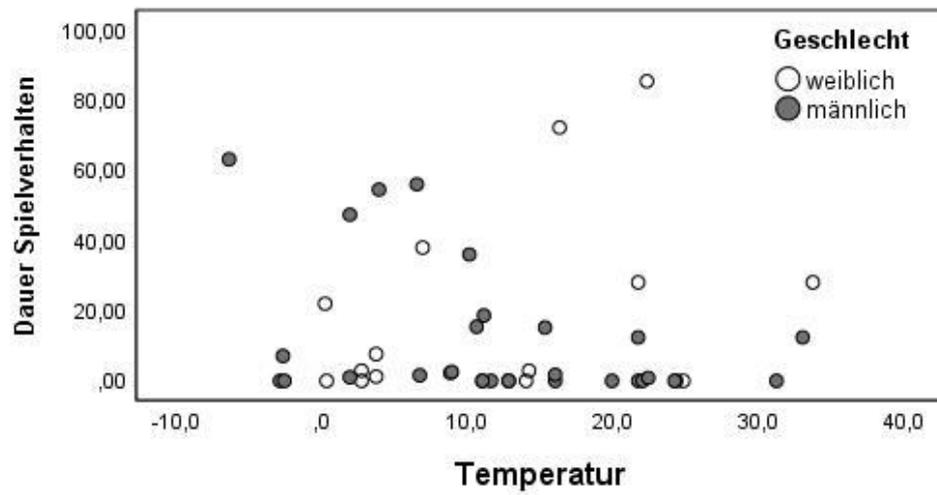


Abb. 12: Dauer des Spielverhaltens nach dem Eingriff in Sekunden pro 20 min bei unterschiedlichen Temperaturen in °C in Abhängigkeit vom Geschlecht

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse stützen unsere Hypothesen, dass die Kälber nach einer Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol weniger Anzeichen für Schmerzen zeigen als Kälber, die mittels Brennstab enthornt wurden, jedoch mehr als Kälber nach einer Injektion von NaCl. Kälber, denen Nelkenöl oder Isoeugenol unter die Hornknospen injiziert wurde, zeigten nach dem Eingriff weniger schmerzanzeigende Verhaltensweisen wie Ohrenschlagen, Kopfschütteln und Kopfkratzen und mehr Komfortverhalten wie Fellpflege als Kälber der Brennstab-Behandlung. Im Vergleich zu den Kälbern nach einer Injektion von NaCl verhielt es sich genau umgekehrt. Ausgenommen davon war das Spielverhalten, wobei dieses nur von den Nelkenöl-Kälbern weniger gezeigt wurde.

Als schmerzanzeigende Verhaltensweisen wurden in dieser Diplomarbeit Ohrenschlagen, Kopfschütteln und Kopfkratzen analysiert. Bereits in früheren Studien wurden diese Verhaltensweisen erhoben, da sie verlässlich auf Schmerzen insbesondere bei der Enthornung hindeuten (Molony und Kent 1997, Sylvester et al. 2004, Weary et al. 2006). Dabei stellte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Brennstab-Behandlung und den Injektions-Behandlungen dar. Bei allen drei Verhaltensweisen war der Wert bei der Brennstab-Behandlung an zumindest den beiden dem Eingriff folgenden Zeitpunkten (Kopfschütteln), bzw. an allen drei Zeitpunkten nach dem Eingriff (Ohrenschlagen, Kopfkratzen) höher als der Basiswert T0vm. Das deckt sich mit den Beobachtungen einer Studie von Faulkner und Weary (2000), bei der Kälber, die mit dem Brennstab enthornt wurden, 12 Stunden nach dem Eingriff signifikant mehr Ohrenschlagen, Kopfschütteln und Kopfreiben, und 24 Stunden nach dem Eingriff signifikant mehr Ohrenschlagen zeigten als die Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zur Brennstab-Behandlung zeigten die Kälber der Injektionsgruppen zum Zeitpunkt vor dem Eingriff mehr Ohrenschlagen als zu den Zeitpunkten nach dem Eingriff, was im Fall von Nelkenöl oder Isoeugenol eventuell auf die anti-inflammatorische und analgetische Wirkung (Kamatou et al. 2012) zurückzuführen ist. Es kann auch vermutet werden, dass die Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol zu einer anderen Art Schmerz führt als eine Brandwunde, und daher eine Injektion dieser Substanzen nicht zu vermehrtem Ohrenschlagen als schmerzanzeigendem Verhalten führt, sondern diese Schmerzen sich anders äußern. Auch

die Analyse des Kopfschüttelns legt eine analgetische Wirkung nahe: Anfangs verhielten sich die Nelkenöl- und Isoeugenol-Kälber ähnlich wie die der NaCl-Behandlung, die vor dem Eingriff am häufigsten den Kopf schüttelten und an den folgenden Zeitpunkten immer weniger, allerdings stieg der Wert bei den Kälbern der Nelkenöl- und Isoeugenol-Behandlung an T1nm wieder an. Diese Beobachtung deckt sich teilweise mit den Ergebnissen einer Studie von Sutherland et al. (2018), in der in den ersten beiden Tagen nach dem Eingriff kein signifikanter Unterschied beim Kopfschütteln zwischen der Nelkenöl-Behandlung und der Kontrollgruppe festgestellt werden konnte.

Dieser späte Anstieg der Kopfschüttel-Frequenz bei der Nelkenöl- und Isoeugenol-Behandlung an T1nm könnten eventuell auf die nicht mehr vorhandene analgetische Wirkung in Kombination mit einer erhöhten Sensibilität an der Injektionsstelle zurückzuführen sein. Bei der Auswertung der MNT-Daten aus der diesem Projekt angehörigen Dissertation wurde ebenfalls am Tag nach dem Eingriff bei der Nelkenöl- und Isoeugenol-Behandlung die höchste Berührungssensibilität gemessen (Juffinger et al. 2019). Auch das Vorhandensein von Fliegen könnte eine Rolle spielen, da es ja bei den drei Behandlungen Brennstab, Nelkenöl und Isoeugenol zu vermehrtem Kopfschütteln führte, und da Fliegen ja am Nachmittag häufiger waren als am Vormittag, würde das erklären, warum das Kopfschütteln erst am Nachmittag mehr wurde und nicht schon am Vormittag desselben Tages. Fliegen wurden im Modell zwar als Störfaktor berücksichtigt, allerdings kann ein letzter Rest in den Schätzwerten immer noch sichtbar sein. Insgesamt zeigten aber Kälber der Brennstab-Behandlung nach dem Eingriff mehr Kopfschütteln als die der Nelkenöl- und Isoeugenol-Behandlung. Diese Beobachtung machten auch Sutherland et al. (2018). Sie beschrieben, dass in den ersten beiden Stunden nach dem Eingriff die Kälber, die mit Brennstab enthornt wurden, mehr Kopfschütteln zeigten als Kälber der Kontrollgruppe und jene, denen Nelkenöl unter die Hornknospe injiziert wurde. Einige Studien konnten zeigen, dass neben Ohrensclagen auch das Kopfschütteln ein wichtiger Indikator für Schmerzen sein kann, insbesondere auch bei Enthornungen mittels Brennstab (Grondahl-Nielsen et al. 1999, Kahrer et al. 2008) oder Hornamputationen (Sylvester et al. 2004).

Beim Kopfkratzen verhielten sich Kälber der Behandlungen mit NaCl und Nelkenöl ähnlich zueinander, sie zeigten das Verhalten vermehrt an den beiden Nachmittagen und weniger an den Vormittagen. Das könnte auf ein vermehrtes Auftreten von Fliegen an den Nachmittagen

zurückzuführen sein, damit könnte das Kopfkratzen in diesen Fällen auch eine Abwehrbewegung gewesen sein und nicht unbedingt ein Anzeichen von Schmerzen. Auch wenn dieser Störfaktor im Modell mitberücksichtigt war, könnte noch ein gewisser Einfluss erkennbar sein. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass Tageszeit und Fütterung einen Einfluss auf das Kopfkratzen haben. Eventuell waren die Kälber morgens nicht so aktiv, da hier immer kurz nach der Fütterung, und am Nachmittag die meisten Kälber noch vor der Abendfütterung beobachtet wurden. Möglicherweise waren die Kälber hier schon hungrig, und Vieira et al. (2008) haben bei hungrigen Kälbern eine erhöhte Aktivität beobachtet. Im Gegensatz zu diesen beiden Behandlungen kratzten Kälber der Isoeugenol-Behandlung am ersten Nachmittag noch nicht deutlich mehr als an den Vormittagen, sondern erst am zweiten Nachmittag.

Aus der Auswertung der schmerzanzeigenden Parameter kann also geschlossen werden, dass die Enthornung mittels Brennstab für die Kälber zu jedem beobachteten Zeitpunkt nach dem Eingriff die schmerzhafteste Methode der getesteten war. Die Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol scheint in den ersten 24 Stunden nach dem Eingriff ähnlich schmerzhaft zu sein wie eine Injektion von NaCl, danach jedoch zu vermehrten Schmerzen zu führen. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Substanzen durchaus durch ihre reizende Wirkung (Sarrami et al. 2002) Irritationen und daher auch Schmerzen hervorrufen, die anfangs jedoch noch von der anästhetischen und analgetischen Wirkung (Chaieb et al. 2007, Kamatou et al. 2012) überdeckt werden und daher erst später zum Ausdruck gebracht werden. Diese Verhaltensauswertung deckt sich auch mit den Daten der MNT-Messung (Juffinger et al. 2019), bei der festgestellt wurde, dass Brennstab-Kälber ab 6 Stunden nach dem Eingriff bis 21 Tage nach dem Eingriff die höchste Berührungssensibilität aufwiesen. Nelkenöl-Kälber zeigten etwas mehr Sensibilität als Isoeugenol-Kälber, und bei den NaCl-Kälber wurde nur 15 Minuten nach der Injektion eine erhöhte Berührungssensibilität gemessen. Allerdings muss auch bedacht werden, dass eventuell die Temperatur insofern einen Einfluss auf das schmerzanzeigende Verhalten hatte, dass Kälte und Hitze die Schmerzen unterschiedlich beeinflussten. Beispielsweise würde Kälte die Brandwunden kühlen und daher eventuell Schmerzen lindern. Andererseits kann es auch sein, dass bei bestimmten Temperaturen die Sensibilität gesteigert wird, was wiederum zu vermehrten Schmerzäußerungen führen würde. Dieser Störfaktor wurde zwar in den Modellen berücksichtigt, ein Rest kann jedoch in den Schätzwerten noch sichtbar sein. Durch das relativ

große Zeitfenster, in dem die einzelnen Beobachtungen stattfanden, kann es natürlich auch zu Verfälschungen kommen. Bei einer Nachmittagsbeobachtung gegen 17 Uhr sind meistens noch mehr Fliegen vorhanden als zwei Stunden später. Auch die Fütterung kann einen großen Einfluss auf das Schmerzempfinden haben. Nelson und Panksepp (1998) beschrieben eine Freisetzung von endogenen Opioiden durch das Nuckeln bei Ratten. Das würde auch die Schmerztoleranz erhöhen und dementsprechend wären nach der Fütterung weniger schmerzanzeigende Verhaltensweisen zu beobachten. Da die Vormittagsbeobachtungen immer nach der morgendlichen Fütterung stattfanden und die Beobachtungen am Nachmittag meistens bereits vor der Abendfütterung, ist die Wirkung der endogenen Opiode bei den Vormittagsbeobachtungen viel stärker gegeben als am Nachmittag und kann dazu führen, dass die Kälber an den Vormittagen weniger schmerzanzeigendes Verhalten zeigen als später.

Als positiver Indikator für das Wohlbefinden der Kälber wurden die Verhaltensweisen Fellpflege, Erkundungsverhalten und Spielverhalten nach dem Eingriff analysiert. Diese Verhaltensweisen wurden bereits in früheren Studien analysiert, um auf ein gutes oder beeinträchtigtes Wohlbefinden von Kälbern, insbesondere im Zusammenhang mit einer Enthornung, schließen zu können (Faulkner und Weary 2000, Mintline et al. 2013, Morisse et al. 1995).

Hierbei stellte sich insbesondere bei den aktiven Verhaltensweisen (Spiel- und Erkundungsverhalten) ein großer Einfluss des Alters der Kälber heraus. Je jünger die Kälber waren, desto mehr Zeit verbrachten sie liegend und folglich zeigten sie daher weniger Spiel- und Erkundungsverhalten. Grund hierfür könnte sein, dass die Kälber an den ersten Lebenstagen noch von der Geburt erschöpft sind und daher mehr schlafen. Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen konnten ansonsten keine nennenswerten Unterschiede in der Dauer des Liegens und im Erkundungsverhalten beobachtet werden. Was jedoch auffiel, war, dass in der NaCl-Behandlung mehr Kälber im Alter von einem Tag waren als in den anderen drei Behandlungsgruppen (Anhang 1, Tab. A 1), und trotzdem nicht weniger Erkundungsverhalten gezeigt wurde als bei den anderen Behandlungen. Es wäre also möglicherweise bei gleicher Altersverteilung ein größerer Unterschied zu beobachten gewesen. Interessanterweise spielten Kälber der Nelkenöl-Behandlung über die drei Beobachtungen nach der Injektion hinweg viel weniger als Kälber der anderen Behandlungsgruppen, was auf ein

mangelndes Wohlbefinden schließen lassen könnte (Mintline et al. 2013). Spielen ist ein selbstbelohnendes Verhalten und bewirkt außerdem eine Endorphinausschüttung (Boissy et al. 2007), weswegen es auch sein könnte, dass Kälber spielen, um ihre Schmerzen etwas zu lindern. Hierzu wurde im Humanbereich bereits beobachtet, dass Kinder mithilfe von Spiel Ängste reduzieren und durch Spielverhalten auch die post-operative Schmerzwahrnehmung sinkt (Barnett und Storm 1981, Ullán et al. 2014). Sutherland et al. (2018) konnten in ihrer Studie am Tag des Eingriffs bei Brennstab-enthornten Kälbern weniger Spielverhalten beobachten als in der Kontrollgruppe. Kälber, die mit Nelkenöl behandelt wurden, zeigten weder am Tag des Eingriffs, noch am Folgetag signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Das deckt sich nicht mit den hier getätigten Beobachtungen und ist eventuell darauf zurückzuführen, dass die Nelkenöl-Kälber dieses Projekts häufig so starke Schwellungen um die Injektionsstelle entwickelten, dass auch die Augen betroffen waren und daher die Sicht beeinträchtigt war. Diese Beeinträchtigung könnte zu dem geringeren Auftreten von Spielverhalten beitragen. Bei der Fellpflege gab es bei der NaCl-Behandlung keine großen Schwankungen, die Kälber zeigten diese Verhaltensweise ziemlich konstant über die vier Beobachtungszeitpunkte. Das legt nahe, dass eine Injektion mit NaCl das Wohlbefinden der Kälber nicht weiter störte, und auch, dass Fellpflege in dieser Behandlungsgruppe scheinbar von keinen anderen äußeren Umständen beeinflusst wurde. Bei den Brennstab-Kälbern fiel auf, dass sie am ersten Nachmittag, also der ersten Beobachtung nach dem Eingriff, verminderte Fellpflege zeigten. Grund hierfür könnten Schmerzen sein, die das Wohlbefinden am Nachmittag nach der Enthornung am stärksten beeinträchtigten. Eine weitere mögliche Erklärung könnte eine eventuelle Restwirkung von Xylazin sein. In einer Studie von Morisse et al. (1995) wurde ebenfalls eine Abnahme der Fellpflege vier Stunden nach der Enthornung mittels Brennstab im Gegensatz zu vier Stunden vor dem Eingriff beschrieben. Faulkner und Weary (2000) hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Fellpflege zwischen den scheinbehandelten und tatsächlich enthornten Kälbern vor und nach dem Eingriff feststellen. Allerdings wurde in früheren Studien bei Nagern beschrieben, dass Fellpflege einerseits bei geringem Stress vermehrt gezeigt wird und Komfort ausdrückt, während es auch zu einer vermehrten Fellpflege aufgrund von erhöhtem Stress kommen kann (Kalueff und Tuohimaa 2004). Auch die Nelkenöl-Kälber zeigten nach dem Eingriff weniger Fellpflege, mit dem niedrigsten Wert am Vormittag des nächsten Tages. Interessanter Weise zeigten die Kälber der Isoeugenol-

Behandlung ein anderes Muster: Am Nachmittag nach dem Eingriff wurde mehr Fellpflege beobachtet als davor, danach blieb es etwa gleich hoch. Bei den Brennstab- und Nelkenöl-Kälbern kann angenommen werden, dass die Abnahme der Fellpflege nach dem Eingriff aufgrund von Schmerzen zustande kommt. Bei den Isoeugenol-Kälbern könnte die vermehrte Fellpflege nach dem Eingriff darauf hindeuten, dass diese Behandlung das Wohlbefinden weniger beeinträchtigt als eine Injektion von Nelkenöl oder die Enthornung mittels Brennstab. Es konnte somit gezeigt werden, dass das Wohlbefinden der Kälber, gemessen anhand der Fellpflege und des Spielverhaltens, aber auch anhand des schmerzanzeigenden Verhaltens wie Ohrenschielen, Kopfschütteln und Kopfkratzen, durch die Enthornung mittels Brennstab, als auch durch die Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol beeinträchtigt wird.

Zur Bewertung von Schwanzbewegungen gibt es erst wenige Studien. Sylvester et al. (2004) haben bei einem Vergleich der Verhaltensweisen enthornter Kälber mit einer Kontrollgruppe zusätzlich zu den bereits bekannten schmerzanzeigenden Verhaltensweisen Ohrenschielen und Kopfschütteln auch vermehrte Schwanzbewegungen am ersten Tag nach der Enthornung beobachtet. In der für diese Diplomarbeit getätigten Beobachtungen ist bei der NaCl-Behandlung aufgefallen, dass diese Kälber vermehrt an den Nachmittagen Schwanzbewegungen zeigten. Grund hierfür könnte sein, dass am Nachmittag mehr Fliegen vorhanden waren, und es sich bei den Schwanzbewegungen somit um Abwehrbewegungen handelte. Bei der Nelkenöl-Injektion sind die Schwanzbewegungen zu den Zeitpunkten nach Injektion geringer und nach Isoeugenol-Behandlung zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Beobachtungszeitpunkten. Bei der Brennstab-Behandlung wurden am Tag nach dem Eingriff vermehrt Schwanzbewegungen beobachtet. Das ist insofern interessant, da andere schmerzanzeigende Verhaltensweisen bereits am Nachmittag des ersten Tages vermehrt gezeigt wurden.

Insbesondere in Hinsicht auf das Liegeverhalten, bzw. den Wechsel zwischen Liegen und Stehen, wären längere Beobachtungszeiten oder die Nutzung von Akzelerometern von Vorteil gewesen. Durch die kurzen Beobachtungszeiten wurden viele Verhaltensweisen generell nur selten beobachtet, was die Analyse und Aussagekraft einschränkt. Da bei den Kälbern jedoch noch viele andere Messungen vorgenommen und sie dadurch oft manipuliert wurden, waren

die geeigneten Beobachtungszeiten sehr reduziert. Ein weiterer Punkt, der sich negativ auf die Datensammlung und daher auch auf die Auswertung auswirkt, war das Zeitmanagement am Betrieb. Es war leider nicht möglich, die Beobachtungszeiten für jedes Kalb zu denselben Zeiten mit genau denselben Abständen zu den Fütterungen und den anderen Manipulationen auszuwählen. Auch die Tatsache, dass es am Video nicht möglich war zu erkennen, ob eine Fliege Grund für eine Bewegung war oder nicht, und daher nicht die tatsächlichen Häufigkeiten bestimmter Verhaltensweisen abzüglich der Abwehrbewegungen aufgezeichnet werden konnten, kann sich auf das Ergebnis auswirken und es verfälschen.

### **Schlussfolgerung**

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol unter die Hornknospe weniger schmerzhaft ist als die Enthornung mittels Brennstab. Die Kälber scheinen dennoch mehr belastet zu sein als nach einer Injektion von NaCl, wobei hier bei Nelkenöl etwas stärkere Belastungen auftreten als bei Isoeugenol. Für eine endgültige Evaluierung müssen weitere Daten bzw. die restlichen Auswertungen dieses Projekts außerhalb dieser Diplomarbeit beachtet werden.

## **Zusammenfassung**

In dieser Diplomarbeit wurden die Auswirkungen einer Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol unter die Hornknospen auf das Verhalten von Kälbern untersucht, im Vergleich zur Injektion von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) oder einer Enthornung mittels Brennstab. Es wurde davon ausgegangen, dass eine Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol für die Kälber belastender und mit mehr Schmerzen verbunden ist als eine Injektion von physiologischer Kochsalzlösung, jedoch weniger Schmerzen verursacht und weniger belastend ist als eine Enthornung mittels Brennstab.

40 Fleckviehkälber im Alter von ein bis fünf Tagen wurden auf vier Behandlungsgruppen á 10 Kälber aufgeteilt: Enthornung mittels Brennstab (BS), Injektion von je 1.5 ml Nelkenöl (NEL), Isoeugenol (ISO) oder Kochsalzlösung (NACL) unter die Hornknospen. Verhaltensbeobachtungen wurden mittels Analyse von Videoaufnahmen durchgeführt zu vier Zeitpunkten á 20 Minuten, eine vor, drei nach dem Eingriff. Die Arbeit wurde als verblindete Studie durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS. Es wurden lineare gemischte Effekte Modelle und ein allgemeines lineares Modell gerechnet.

Die Interaktion Behandlung mit Zeitpunkt der Beobachtung war bei den meisten der beobachteten Verhaltensweisen signifikant. Die Enthornung mittels Brennstab führte zu mehr Schmerzverhalten als eine Injektion von Nelkenöl oder Isoeugenol. Eine Injektion von Isoeugenol löste erst nach mehr als 24 Stunden nach dem Eingriff mehr schmerzanzeigendes Verhalten aus als eine Injektion von Natriumchlorid. Nelkenöl-Kälber zeigten bereits am ersten Nachmittag weniger Spielverhalten als die Isoeugenol- und NaCl-Kälber. Nach mehr als 24 Stunden nach dem Eingriff zeigten Nelkenöl-Kälber zusätzlich vermehrt schmerzanzeigende Verhaltensweisen als NaCl-Kälber.

Unter alleiniger Berücksichtigung der Ergebnisse der Verhaltensauswertung kann man schließen, dass eine Enthornung durch eine Injektion von Nelkenöl und besonders Isoeugenol unter die Hornknospen eine schonendere; mit weniger Schmerzen verbundene Alternative gegenüber der aktuell gebräuchlichen Enthornung mittels Brennstab sein könnte. Für eine endgültige Beurteilung müssen jedoch weitere Daten Berücksichtigung finden, insbesondere auch eine gute Wirksamkeit der Injektionen, das Hornwachstum zu verhindern muss bestätigt werden, um als funktionierende Alternative in Betracht gezogen werden zu können.

## Summary

The objective of this master thesis was to investigate the effect of an injection of clove oil or isoeugenol under the horn buds on the behaviour of calves in comparison to an injection of sodium chloride (NaCl) or cautery disbudding. The hypothesis was that an injection of clove oil or isoeugenol would put more strain on the calves and be more painful than an injection of sodium chloride, but cause less pain and put less strain on them than cautery disbudding.

40 Simmental calves aged one to five days were allocated to four treatment groups á 10 calves: cautery disbudding (BS), injection of 1.5 ml clove oil (NEL), isoeugenol (ISO), or sodium chloride (NACL) under each horn bud.

Behavioural observations were conducted through analysis of video recordings at four times, 20 minutes each: one before, three after treatment. The observer was blinded towards the treatment. Statistical analysis was conducted with SPSS. It was computed with linear mixed effect models and an analysis of variance.

The interaction of treatment with the time of observation was significant for most of the observed behaviours. Cautery disbudding led to increased pain behaviour compared to an injection of clove oil or isoeugenol. An injection of isoeugenol caused more pain behaviour than sodium chloride not until more than 24 hours after the treatment. Clove oil-calves showed less play behaviour than isoeugenol- or NaCl-calves from the first afternoon on. After more than 24 hours after the treatment, the clove oil-calves also showed increased pain behaviour, and therefore seemed to be in more pain than the NaCl-calves.

Considering only the results of this behaviour analysis it can be concluded that disbudding through an injection of clove oil and especially isoeugenol under the horn buds can be a less painful alternative to the currently used cautery disbudding. For a final assessment other measurements have to be considered, especially the effectiveness of the injections to stop horn growth has to be confirmed to be able to be considered an alternative.

## Literaturverzeichnis

- Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K. 2005. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. *Toxicology in vitro*, 19(8):1025-1033.
- Barnett LA, Storm B. 1981. Play, pleasure, and pain: The reduction of anxiety through play. *Leisure Sciences*, 4(2):161-175.
- Boissy A, Manteuffel G, Jensen MB, Moe RO, Spruijt B, Keeling LJ, Winckler C, Forkman B, Dimitrov I, Langbein J. 2007. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & behavior*, 92(3):375-397.
- Bundesgesetz über den Schutz der Tiere (Tierschutzgesetz – TSchG), BGBl. 1 Nr. 118/2004, Artikel 2, v. 28.9.2004 idgF
- Casoni D, Mirra A, Suter M, Gutzwiller A, Spadavecchia C. 2019. Can disbudding of calves (one versus four weeks of age) induce chronic pain? *Physiology & behavior*, 199:47-55.
- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla- Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(6):501-506.
- Chua B, Coenen E, van Delen J, Weary DM. 2002. Effects of pair versus individual housing on the behavior and performance of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 85(2):360-364.
- Cozzi G, Gottardo F, Brscic M, Contiero B, Irrgang N, Knierim U, Pentelescu O, Windig J, Mirabito L, Eveillard FK. 2015. Dehorning of cattle in the EU Member States: A quantitative survey of the current practices. *Livestock science*, 179:4-11.
- Cuttance E, Mason W, Yang D, Laven R, McDermott J, Inglis K. 2019. Effects of a topically applied anaesthetic on the behaviour, pain sensitivity and weight gain of dairy calves following thermocautery disbudding with a local anaesthetic. *New Zealand veterinary journal*, 67(6):295-305.
- Faulkner P, Weary D. 2000. Reducing pain after dehorning in dairy calves. *Journal of dairy science*, 83(9):2037-2041.

- Grondahl-Nielsen C, Simonsen H, Lund JD, Hesselholt M. 1999. Behavioural, endocrine and cardiac responses in young calves undergoing dehorning without and with use of sedation and analgesia. *Veterinary journal* (London, England: 1997), 158(1):14-20.
- Jensen MB, Vestergaard KS, Krohn CC. 1998. Play behaviour in dairy calves kept in pens: the effect of social contact and space allowance. *Applied Animal Behaviour Science*, 56(2-4):97-108.
- Juffinger A, Schoiswohl J, Stanitznig A, Krametter-Frötscher R, Wittek T, Waiblinger S. 2021 submitted. Mechanical nociceptive threshold, tissue alterations and horn growth in calves after injection of isoeugenol or clove oil under the horn bud. *animals*.
- Juffinger A, Stanitznig A, Schoiswohl J, Krametter-Frötscher R, Wittek T, Waiblinger S. 2019. Verhalten und Schmerzsensitivität von Kälbern nach Injektion von Nelkenöl und Isoeugenol unter die Hornknospe mit dem Ziel der Verhinderung des Hornwachstums. 187-197.-51. *Internationale Tagung Angewandte Ethologie; NOV 28-30,2019; Freiburg im Breisgau, Germany. (ISBN: 978-3-945088-72-2).*
- Juffinger A, Stanitznig A, Schoiswohl J, Krametter-Frötscher R, Wittek T, Waiblinger S. in preparation.
- Kahrer E, Baumgartner W, Haller J, Windischbauer G, Troxler J. 2008. Vergleich zweier thermischer Enthornungsgeräte hinsichtlich der Schmerzbelastung von Kalbern und technischer Funktion. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 95(5):106.
- Kalueff AV, Tuohimaa P. 2004. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 13(3):151-158.
- Kamatou GP, Vermaak I, Viljoen AM. 2012. Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17(6):6953-6981.
- Kozam G, Mantell GM. 1978. The effect of eugenol on oral mucous membranes. *Journal of dental research*, 57(11-12):954-957.
- Mintline EM, Stewart M, Rogers AR, Cox NR, Verkerk GA, Stookey JM, Webster JR, Tucker CB. 2013. Play behavior as an indicator of animal welfare: Disbudding in dairy calves. *Applied Animal Behaviour Science*, 144(1-2):22-30.
- Molaei M, Azari O, Esmaeilzadeh S. 2014. Study of calves disbudding following injection of clove oil under horn bud. *Journal of Veterinary Research*, 69(4).

- Molony V, Kent J. 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *Journal of Animal Science*, 75(1):266-272.
- Morisse J, Cotte J, Huonnic D. 1995. Effect of dehorning on behaviour and plasma cortisol responses in young calves. *Applied Animal Behaviour Science*, 43(4):239-247.
- Munerato MC, Sinigaglia M, Reguly ML, de Andrade HHR. 2005. Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 582(1-2):87-94.
- Nelson EE, Panksepp J. 1998. Brain substrates of infant–mother attachment: contributions of opioids, oxytocin, and norepinephrine. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22(3):437-452.
- Sarrami N, Pemberton M, Thornhill M, Theaker E. 2002. Adverse reactions associated with the use of eugenol in dentistry. *British dental journal*, 193(5):257-259.
- Stilwell G, Lima MS, Broom DM. 2008. Comparing plasma cortisol and behaviour of calves dehorned with caustic paste after non-steroidal-anti-inflammatory analgesia. *Livestock Science*, 119(1-3):63-69.
- Sutherland MA, Larive J, Cave V, Zobel G. 2018. Behavioural and physiological responses to clove oil injected under the horn bud of calves. *Applied Animal Behaviour Science*, 204:29-36.
- Sylvester S, Stafford K, Mellor D, Bruce R, Ward R. 2004. Behavioural responses of calves to amputation dehorning with and without local anaesthesia. *Australian Veterinary Journal*, 82(11):697-700.
- Tierhaltungsverordnung 2004. Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über die Mindestanforderungen für die Haltung von Pferden und Pferdeartigen, Schweinen, Rindern, Schafen, Ziegen, Schalenwild, Lamas, Kaninchen, Hausgeflügel, Straußen und Nutzfischen. (1.Tierhaltungsverordnung). BGBl. II Nr. 485/2004 idgF.
- Ullán AM, Belver MH, Fernández E, Lorente F, Badía M, Fernández B. 2014. The effect of a program to promote play to reduce children's post-surgical pain: with plush toys, it hurts less. *Pain Management Nursing*, 15(1):273-282.

- Vieira ADP, Guesdon V, De Passille AM, von Keyserlingk MAG, Weary DM. 2008. Behavioural indicators of hunger in dairy calves. *Applied Animal Behaviour Science*, 109(2-4):180-189.
- Waiblinger S. 2012. Die Bedeutung der Veterinärmedizin für den Tierschutz. In: Grimm, H.; Otterstedt, C. (Hrsg.): *Das Tier an sich? – Disziplinen übergreifender Perspektiven für neue Wege im wissenschaftsbasierten Tierschutz* (pp. 172-197). Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht.
- Weary DM, Niel L, Flower FC, Fraser D. 2006. Identifying and preventing pain in animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 100(1-2):64-76.
- Windig JJ, Hoving-Bolink RA, Veerkamp RF. 2015. Breeding for polledness in Holstein cattle. *Livestock science*, 179:96-101.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Dauer Ohrenschlagen in Sekunden pro 20 min (Fliegen nein/ja: NACL n=13/10, BS n=19/9, NEL n=14/3, ISO n=16/4) .....	13
Abb. 2: Häufigkeit Kopfschütteln in Sekunden pro 20 min (Fliegen nein/ja: NACL n=12/26, BS n=11/28, NEL n=4/34, ISO n=6/34).....	14
Abb. 3: Häufigkeit Kopfkratzen pro 20min (1d n=32, 2d n=28, 3d n=48, 4d n=36, 5d n=16)	15
Abb. 4: Häufigkeit Kopfkratzen pro 20 min (Fliegen nein/ja: T0vm n=34/4, T0nm n=28/11, T1vm n=30/8, T1nm n=30/10).....	15
Abb. 5: Häufigkeit Schwanzbewegungen pro 20 min (Fliegen nein/ja: NACL n=9/10, BS n=13/9, NEL n=11/3, ISO n=20/5) .....	16
Abb. 6: Dauer Fellpflege in Sekunden pro 20 min (1d n=14, 2d n=15, 3d n=28, 4d n=27, 5d n=13).....	17
Abb. 7: Dauer Fellpflege in Sekunden pro 20 min (1d NACL n=5, BS n=2, NEL n=2, ISO n=5; 2d NACL n=5, BS n=2, NEL n=1, ISO n=7; 3d: NACL n=9, BS n=9, NEL n=7, ISO n=3; 4d: NACL n=3, BS n=6, NEL n=9, ISO n=9; 5d: NACL n=3, BS n=3, NEL n=4, ISO n=3).....	18
Abb. 8: Dauer Liegen in Sekunden pro 20 min (1d n=31, 2d n=24, 3d n=48, 4d n=36, 5d n=16).....	19
Abb. 9: Dauer Erkundungsverhalten in Sekunden pro 20 min (1d n=11, 2d n=13, 3d n=32, 4d n=21, 5d n=14) .....	20
Abb. 10: Durchschnittliche Dauer Spielverhalten nach Eingriff in Sekunden pro 20 min (NACL n=10, BS n=41, NEL n=10, ISO n=10) .....	21
Abb. 11: Dauer Spielverhalten nach Eingriff in Sekunden pro 20 min (1d n=8, 2d n=7, 3d n=12, 4d n=9, 5d n=4) .....	21
Abb. 12: Dauer des Spielverhaltens nach dem Eingriff in Sekunden pro 20 min bei unterschiedlichen Temperaturen in °C in Abhängigkeit vom Geschlecht .....	22
Abb. A1: Kälberiglus Gruppenansicht .....	40
Abb. A2: Kälberiglu Einzelansicht.....	40
Abb. A3: Verhalten der Kälber in Sekunden pro 20 min (Dauer) bzw. Frequenz pro 20 min (Häufigkeit) in Abhängigkeit von Behandlung und Beobachtungszeitpunkt.....	51

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zeitplan des Versuchsablaufs an T0 und T1 .....	8
Tab. A 1: Verteilung der Kälber in den Behandlungsgruppen nach Alter zum Zeitpunkt des Eingriffs und Geschlecht .....	39
Tab. A 2: Ethogramm, modified after Chua et al. (2002), Jensen et al. (1998), Stilwell et al. (2008) .....	41
Tab. A 3: Auswertung Intraobserververgleich .....	44
Tab. A 4: Ergebnisse der Datenauswertung der gemischten linearen Modelle zu "Dauer Ohrenschlagen", „Dauer Erkundungsverhalten“, „Dauer Liegen“, „Häufigkeit Kopfschütteln“, „Häufigkeit Kopfkratzen“, „Dauer Fellpflege“, „Häufigkeit Schwanzbewegungen“ und dem allgemeinen linearen Modell zu „Dauer Spielverhalten nach Eingriff“. <sup>1</sup> log-transformiert; <sup>2</sup> numerator/denominator .....	45

**Abkürzungen**

ANOVA	=	allgemeines lineares Modell / einfache Varianzanalyse
GLMM	=	lineares gemischte Effekte Modell
HF	=	Herzfrequenz
MNT	=	mechanisch-nozizeptive-Schwelle
NaCl	=	Natriumchlorid

### Anhang 1: Alter und Geschlecht der Versuchskälber

Tab. A 1: Verteilung der Kälber in den Behandlungsgruppen nach Alter zum Zeitpunkt des Eingriffs und Geschlecht

	NACL	BS	NEL	ISO	gesamt
männlich					27
1d	3	2	1	1	
2d	1	0	0	3	
3d	2	3	3	0	
4d	1	0	2	2	
5d	1	0	1	1	
weiblich					13
1d	0	0	0	1	
2d	1	1	1	0	
3d	1	1	1	1	
4d	0	2	1	1	
5d	0	1	0	0	

## Anhang 2: Aufstallung der Versuchskälber



Abb. A1: Kälberiglus Gruppenansicht



Abb. A2: Kälberiglu Einzelansicht

### Anhang 3: Ethogramm

Tab. A 2: Ethogramm, modified after Chua et al. (2002), Jensen et al. (1998), Stilwell et al. (2008)

	D/F <sup>1</sup>	Behavior	Definition
<b>headshaking</b> <i>Kopfschütteln</i>	F	pain	Rapid movements of the head around rostral-caudal axis. Headshakes separated by a clear stop are considered separate events. Headshakes during locomotor play are not coded as headshaking (see locomotor play).
<b>headscratching</b> <i>Kopfkratzen</i>	F	pain	Scratching any part of the head (excl. neck) with the rear leg. <b>Including attempts</b> (foot does not contact the head, but is lifted from ground and moved towards the head, at least tiptoe is in front of the caudal edge of the calf's shoulder blade). Event stops when leg touches the ground again.
<b>headrubbing</b> <i>Kopfscheuern</i>	D	pain	<b>Horn buds</b> are in contact with any object while moving head up and down or from one side to the other (from left to right side) (lasting > 1sec). Head rubs separated by > 3sec are considered separate events.
<b>earflicking</b> <i>Ohrenschlagen</i>	D	pain	<b>Rapid</b> movement of one or both of the ears. A separate earflicking event is considered to occur after a clear stop of the ear-movement beforehand.
<b>inert-lying</b>	D	pain	lying with muzzle on flank (modified after (Stilwell et al. 2008)
<b>locomotor play</b> <i>Bewegungsspiel</i>	D	play	Any movement apart from basic activities, including gallop (fast four-beat gait), leap (forelegs are lifted from the ground and moved upwards and forwards, during last phase hindlegs may be lifted from the ground), jumping (similar to leap, but only a movement upwards and not forwards), bucking (body ascends sharply from front to back, maybe including a kick), turning (calf turns around while leaping) and/or a combination of some or all of these behaviors. Also including movements similar headshaking. For a detailed description see (Jensen et al. 1998).
<b>head play object</b> <i>Kopfspiel</i>	D	play	Rubbing, pushing and butting the head in a playful manner and during standing against an object (including bars, hutch, floor/straw), modified after (Jensen et al. 1998).

Fortsetzung Tab. A2

	D/F	Behavior	Definition
<b>locomotion</b> <i>Bewegung</i>	D	basic	Movement of the calf's body by foot (at least one foot is in the air), including walking and running (modified by (Chua et al. 2002)). The calf takes <b>at least two steps</b> . Without behaviors described as locomotor play (see locomotor play).
<b>standing</b> <i>Stehen</i>	D	basic	Body position in which the limbs bear the bodyweight and the animal is stationary.
<b>lying</b> <i>Liegen</i>	D	basic	Sternal or lateral recumbency: sternum or flank are in contact with the ground and no weight is supported by any of the legs.
<b>self grooming</b> <i>Fellpflege</i>	D	comfort	Licking, scratching or rubbing its own coat with its mouth or leg but not on the head. A separate self-grooming event is considered to occur after a clear stop. Even short contacts of the calves muzzle with its coat are sufficient and will be coded as self grooming.
<b>body shaking</b> <i>Körperschütteln</i>	D	comfort	Calf shakes its whole body from head to tail, rotating about the rostro-caudal axis, behavior recorded only if occurring during standing.
<b>exploration</b> <i>Erkundungsverhalten</i>	D	exploration	Calf has muzzle (licking or nibbling) or almost muzzle contact (within 10cm from feature, sniffing) with environmental features, including feed, during standing or walking through the box or lying. The muzzle has to be at least partly visible.
<b>tailflicking</b> <i>Schwanzbewegung</i>	F	others	<b>Rapid</b> movement of the tail from one side to the other across the calf's hindquarters (not counted during play), one event consists of the tail moving from one side (e.g. left) to the other side (e.g. right) and back again. If the calf is lying the movement from the ground to one side and back again to the ground is counted as one event.
<b>inside</b>	D	others	At least the calf's front 1/3 (from the calf's nose to the caudal edge of its shoulder blade) or the whole body is inside of the hutch.

Fortsetzung Tab. A2

	D/F	Behavior	Definition
partly concealed		others	Parts of the calf are not visible, subdivided and coded as: both ears not visible, one ear not visible, tail not visible, not visible.
<b>both ears not visible</b>	D	others	The calf's ears are not visible, therefore behaviors (e.g. headshaking, headrubbing, head play object, earflicking) including these parts of the calf's body can't be seen and therefore are not recorded (to count as visible, at least the ear tags of both ears must be visible).
<b>one ear not visible</b>	D	others	At least one ear of the calf is completely visible (either the complete left or the complete right ear), behaviors that can't be seen clearly are not recorded.
<b>tail not visible</b>	D	others	The calf's tail is not visible, therefore behaviors including these parts of the calf's body can't be seen and therefore are not recorded.
<b>not visible</b>	D	others	No body part of the calf is visible, therefore behaviors can't be seen and are not recorded.
disturbances		others	Disturbances caused by vehicles, humans or flies, which could be seen in an additional camera filming the surrounding.
<b>vehicle visible</b>	D	others	A vehicle passes near the calf's hutch and may affect the calf's behavior.
<b>humans visible</b>	D	others	One or more humans may stay or walking by close to the calf and may affect the calf's behavior. It starts when human is visible in camera for surrounding and last until human leaves the area next to the calf hutches (not visible in the surrounding camera anymore). If only the leaving of the human is visible, it is supposed that the human has been next to the calf the whole time and therefore human visible is coded from the beginning until the human is not visible in the surrounding camera. If the experimenter is visible in the surrounding camera, but is sitting or if there is at least one additional calf hutch between the experimenter and the observed calf, this is <b>not</b> coded as humans visible.
<b>flies visible</b>		others	At least one fly is visible on or near the calf and may affect the calf's behavior. Only counted as visible or not visible for each video.

<sup>1</sup> Behaviors with a D are coded as durations, behaviors with a F are coded as frequencies.

#### Anhang 4: Beobachterabgleich

Tab. A 3: Auswertung Intraobserverabgleich

<b>Verhaltensweise</b>	<b>Kappa (2s)</b>	<b>Kappa (1s)</b>
Bewegung	0,79	0,83
Stehen	0,91	0,90
Liegen	0,99	0,99
Bewegungsspiel	0,82	0,85
Kopfschütteln	0,86	0,95
Kopfkratzen	1	1
Ohrenschlagen	0,75	0,65
Schwanzbewegungen	0,76	0,61
Fellpflege	0,81	0,69
Erkundungsverhalten	0,79	0,79

### Anhang 5: Datenanalyse mittels linearen gemischten und allgemein linearen Modellen

Tab. A 4: Ergebnisse der Datenauswertung der gemischten linearen Modelle zu "Dauer Ohrenschlagen", „Dauer Erkundungsverhalten“, „Dauer Liegen“, „Häufigkeit Kopfschütteln“, „Häufigkeit Kopfkratzen“, „Dauer Fellpflege“, „Häufigkeit Schwanzbewegungen“ und dem allgemeinen linearen Modell zu „Dauer Spielverhalten nach Eingriff“. <sup>1</sup> log-transformiert; <sup>2</sup> numerator/denominator

	Geschätzte Mittelwerte ± Std.-Fehler der Behandlungen					GLMM / ANOVA		
	NACL	BS	NEL	ISO	gesamt	F	Df <sup>2</sup>	P
<b>Dauer Ohrenschlagen<sup>1</sup></b>								
Behandlung	0,270±0,133	0,417±0,119	-0,106±0,171	0,272±1,147		3,641	3/55,843	0,018
Behandlung*Beobachtung						3,465	9/27,051	0,006
T0vm	0,699±0,214	0,224±0,141	0,288±0,175	0,445±0,156				
T0nm	0,414±0,168	0,633±0,152	-0,244±0,225	0,161±0,151				
T1vm	-0,521±0,257	0,337±0,181	-0,658±0,297	0,198±0,323				
T1nm	0,490±0,176	0,473±0,170	0,191±0,280	0,285±0,203				
Beobachtung						5,901	3/25,135	0,003
T0vm					0,414±0,087			
T0nm					0,241±0,088			
T1vm					-0,161±0,135			
T1nm					0,360±0,106			
Temperatur						4,280	1/54,819	0,043
Fliegen						37,320	1/54,291	0,000
nein					-0,286±0,078			
ja					0,713±0,133			
Behandlung*Fliegen						1,885	3/43,186	0,146
nein	-0,195±0,173	-0,342±0,123	-0,433±0,161	-0,175±0,163				
ja	0,736±0,256	1,176±0,187	0,221±0,353	0,720±0,239				
Behandlung*Temperatur						4,139	3/50,098	0,011

<i>Fortsetzung Tab, A4</i>	NACL	BS	NEL	ISO	gesamt	F	Df	P
<b>Häufigkeit Kopfschütteln</b>								
Behandlung	0,476±0,308	1,195±0,265	0,422±0,349	1,491±0,301		2,979	3/43,510	0,042
Behandlung*Beobachtung						1,737	9/68,905	0,097
T0vm	0,816±0,464	1,093±0,402	0,619±0,519	2,127±0,442				
T0nm	0,796±0,543	1,656±0,536	0,350±0,528	1,327±0,514				
T1vm	0,209±0,211	1,315±0,193	0,216±0,355	1,070±0,268				
T1nm	0,085±0,398	0,717±0,342	0,501±0,369	1,439±0,357				
Fliegen						5,156	1/71,100	0,026
nein					0,588±0,135			
ja					1,204±0,258			
Behandlung*Fliegen						5,471	3/65,110	0,002
nein	0,846±0,274	0,847±0,249	0,320±0,269	0,337±0,270				
ja	0,107±0,486	1,544±0,386	0,523±0,642	2,644±0,533				
Behandlung*Temperatur						3,272	3/61,256	0,027

<i>Fortsetzung Tab, A4</i>	NACL	BS	NEL	ISO	gesamt	F	Df	P
<b>Häufigkeit Kopfkratzen<sup>1</sup></b>								
Behandlung	0,158±0,058	0,204±0,057	0,126±0,062	0,220±0,059		0,588	3/40,997	0,626
Behandlung*Beobachtung						2,291	9/44,766	0,033
T0vm	0,005±0,081	-0,035±0,073	-0,034±0,089	0,145±0,079				
T0nm	0,252±0,100	0,281±0,106	0,216±0,105	0,180±0,105				
T1vm	0,008±0,075	0,253±0,073	0,004±0,088	-0,018±0,080				
T1nm	0,369±0,112	0,315±0,111	0,318±0,115	0,572±0,115				
Alter bei Behandlung						4,936	1/32,394	0,033
Beobachtung						10,250	3/50,504	0,000
T0vm					0,020±0,054			
T0nm					0,232±0,056			
T1vm					0,062±0,045			
T1nm					0,393±0,062			
Beobachtung*Fliegen						4,920	3/52,118	0,004
	T0vm	T0nm	T1vm	T1nm				
nein	0,077±0,036	0,139±0,059	0,127±0,041	0,215±0,063				
ja	-0,036±0,102	0,325±0,094	-0,003±0,082	0,572±0,108				

<i>Fortsetzung Tab, A4</i>	NACL	BS	NEL	ISO	gesamt	F	Df	P
<b>Häufigkeit Schwanzbewegungen<sup>1</sup></b>								
Behandlung	0,608±0,116	0,717±0,096	0,622±0,143	0,533±0,134		3,772	3/23,643	0,024
Behandlung*Beobachtung						2,114	9/53,794	0,044
T0vm	0,469±0,166	0,561±0,134	0,806±0,191	0,527±0,167				
T0nm	0,796±0,205	0,561±0,134	0,503±0,211	0,564±0,213				
T1vm	0,357±0,145	0,926±0,130	0,528±0,192	0,587±0,169				
T1nm	0,811±0,156	0,883±0,138	0,653±0,159	0,456±0,161				
Geschlecht						7,870	1/19,953	0,011
weiblich					0,482±0,090			
männlich					0,759±0,067			
Alter bei Behandlung						20,051	1/21,285	0,000
Fliegen						29,029	1/88,408	0,000
nein					0,288±0,054			
ja					0,952±0,111			
Behandlung*Fliegen						2,339	3/73,818	0,080
nein	0,482±0,120	0,402±0,164	-0,005±0,116	0,275±0,095				
ja	0,735±0,184	1,032±0,164	1,250±0,283	0,792±0,237				
Behandlung*Alter						5,684	3/21,218	0,005

<i>Fortsetzung Tab, A4</i>	NACL	BS	NEL	ISO	gesamt	F	Df	P
<b>Dauer Fellpflege<sup>1</sup></b>								
Behandlung	1,147±0,159	0,646±0,133	0,354±0,135	1,049±0,131		6,556	3/19,062	0,003
Behandlung*Beobachtung						1,978	9/51,091	0,061
T0vm	1,030±0,283	0,705±0,260	0,546±0,270	0,701±0,258				
T0nm	1,018±0,160	0,091±0,140	0,279±0,134	1,285±0,129				
T1vm	1,173±0,271	0,836±0,247	0,115±0,259	1,129±0,251				
T1nm	1,368±0,305	0,951±0,295	0,477±0,293	1,079±0,289				
Alter bei Behandlung						20,879	1/17,183	0,000
Temperatur						5,722	1/18,492	0,028
Behandlung*Alter						3,710	3/17,463	0,031
Behandlung*Temperatur						8,523	3/18,352	0,001
<b>Dauer Liegen</b>								
Behandlung	847,308±82,196	868,749±69,266	901,799±78,223	945,152±74,908		3,862	3/22,711	0,023
Behandlung*Beobachtung						0,947	9/55,934	0,493
T0vm	805,699±145,446	963,064±132,602	848,680±149,037	1021,771±141,199				
T0nm	899,678±142,052	1081,986±140,850	1010,185±133,176	858,940±130,316				
T1vm	908,653±139,206	614,250±125,280	883,876±145,051	1042,898±138,373				
T1nm	775,200±134,450	815,697±126,870	864,455±126,421	857,000±122,317				
Alter bei Behandlung						4,856	1/22,137	0,038
Temperatur						9,134	1/31,393	0,005
Behandlung*Alter						3,562	3/23,078	0,030
Behandlung*Temperatur						2,514	3/28,269	0,079

<i>Fortsetzung Tab, A4</i>	NACL	BS	NEL	ISO	gesamt	F	Df	P
<b>Dauer Erkundungsverhalten<sup>1</sup></b>								
Behandlung	1,210±0,199	1,096±0,158	1,083±0,188	1,026±0,183		3,442	3/24,762	0,032
Geschlecht						0,273	1/24,020	0,606
weiblich					1,053±0,157			
männlich					1,156±0,108			
Alter bei Behandlung						15,321	1/25,034	0,001
Beobachtung						1,406	3/54,466	0,251
T0vm					1,004±0,158			
T0nm					0,908±0,169			
T1vm					1,170±0,151			
T1nm					1,335±0,170			
Temperatur						9,260	1/34,500	0,004
Behandlung*Alter						3,542	3/23,767	0,029
Behandlung*Temperatur						3,806	3/37,769	0,018
<b>Dauer Spielverhalten nach Eingriff</b>								
Behandlung	1,042±0,203	0,883±0,194	0,031±0,194	0,834±0,193		5,585	3/32	0,003
Alter bei Behandlung						4,140	1/32	0,050
Geschlecht*Temperatur						6,210	1/32	0,018

## Anhang 6: Grafische Darstellung der Variablen

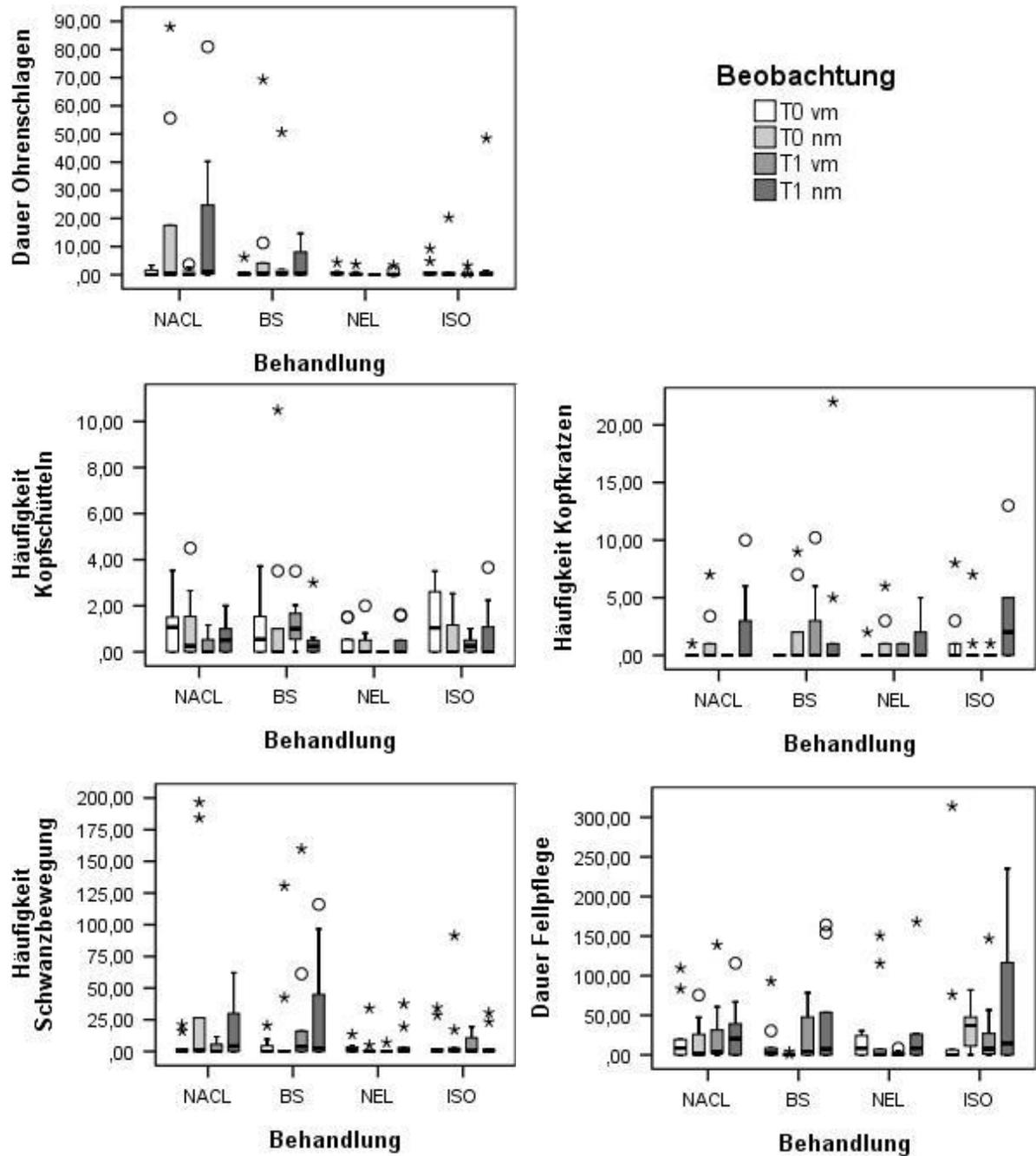
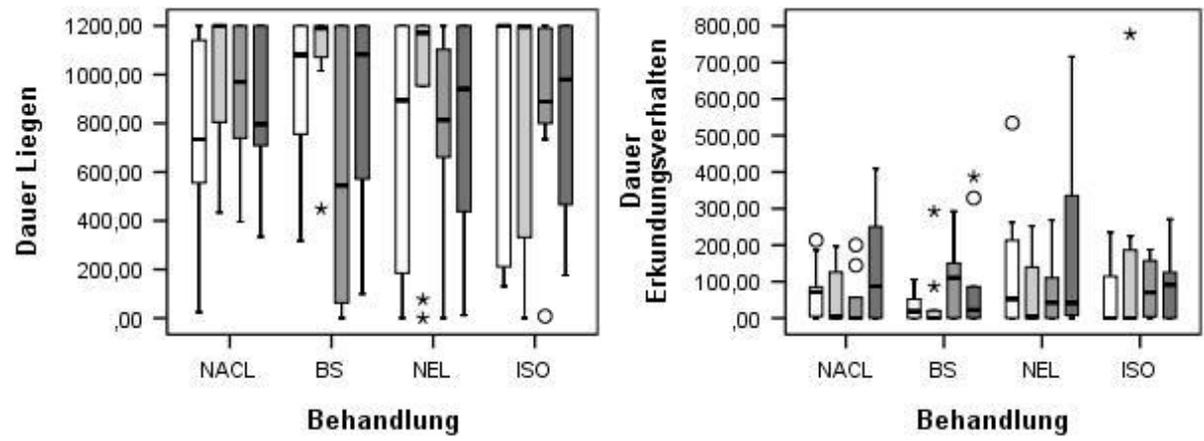


Abb. A3: Verhalten der Kälber in Sekunden pro 20 min (Dauer) bzw. Frequenz pro 20 min (Häufigkeit) in Abhängigkeit von Behandlung und Beobachtungszeitpunkt



Fortsetzung Abb. A3