

DOKTOR (PhD) ARBEIT

**WESTUNGARISCHE UNIVERSITÄT
FAKULTÄT FÜR LANDWIRTSCHAFTS- UND
LEBENSMITTELWISSENSCHAFTEN
MOSONMAGYARÓVÁR
INSTITUT FÜR TIERWISSENSCHAFTEN**

Leiter der Doktor Schule:

Dr. Schmidt János

Universitätsprofessor

Leiterin der Studien:

Kovacsné Dr. habil GÁAL Katalin

Institutsvorstand, Universitätsprofessorin

**NEUE METHODE ZUM NACHWEIS VON
KORTIKOSTERON IM EI UND ERFASSUNG VON
KORTIKOSTERON IM EIGELB UND BLUTPLASMA**

Von:

GYIMÓTHY – WILLMANN ILSE MARIA

Mosonmagyaróvár

2007

DOKTOR (PhD) ARBEIT

**WESTUNGARISCHE UNIVERSITÄT
FAKULTÄT FÜR LANDWIRTSCHAFTS- UND
LEBENSMITTELWISSENSCHAFTEN
MOSONMAGYARÓVÁR
INSTITUT FÜR TIERWISSENSCHAFTEN**

Leiter der Doktor Schule:

Dr. Schmidt János

Universitätsprofessor

Leiterin der Studien:

Kovacsné Dr. habil GÁAL Katalin

Institutsvorstand, Universitätsprofessorin

**NEUE METHODE ZUM NACHWEIS VON
KORTIKOSTERON IM EI UND ERFASSUNG VON
KORTIKOSTERON IM EIGELB UND BLUTPLASMA**

Von:

GYIMÓTHY – WILLMANN ILSE MARIA

Mosonmagyaróvár

2007

1. Einleitung

Das Thema „artgerechte Tierhaltung“ und die Prüfung neuer alternativer Haltungssysteme auf ihre Artgerechtheit gewinnen in der Legehennenhaltung, vor allem in Anbetracht des mit 01.01.2012 in Kraft tretenden Verbots der konventionellen Käfighaltung in der Europäischen Union zunehmend an Bedeutung. Ob eine Haltungsform den Anforderungen der Hennen entspricht, lässt sich anhand des verursachten Stresses nachvollziehen. Aus diesem Grund wird die Suche nach Parametern, die das Wohlbefinden und die Stressbelastung der Tiere objektiv und verlässlich erfassen, zunehmend forciert. Vor allem Methoden, die sich auf die Vorteile nicht invasiver Messverfahren zur Beurteilung der Stressbelastung konzentrieren, werden in diesem Zusammenhang bevorzugt um Stress verursachende invasive Probenentnahmen zu umgehen. Beim Huhn gelten Kortikosteron und seine Metaboliten unter Berücksichtigung des Gesundheitszustandes, als verlässliche Stressparameter und –indikatoren. Ihr Nachweis ist sowohl im Blutplasma als auch im Ei und Kot möglich.

Die Verwendung von Eiern zur Erfassung von länger andauerndem Stress bietet sich deshalb an, da Eier

Sammelproben darstellen, die die pulsatile und episodenhafte Exkretion von Kortikosteron und Verzerrungen, die durch eine invasive Probenentnahme wie zum Beispiel eine Blutabnahme entstehen, ausgleichen und die in der Zeit der Eiformation über 24 Stunden im Blut zirkulierenden Kortikosteronmengen widerspiegeln. Zudem stellen Eier ein stabiles Probenmaterial dar, da das Kortikosteron - anders als im Kot - im Ei nicht weiter verstoffwechselt wird.

2. Eigene Studien

2.1 Ziele

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine praxisnahe nicht invasive Methode des Stressnachweises bei Legehennen durch die Messung von Kortikosteron im Ei zu entwickeln, die Rückschlüsse auf eine Korrelation zwischen Blut- und Eikortikosteronwerten und einen Vergleich verschiedener Haltungssysteme (Käfighaltung versus naturnahe Freilandhaltung) ermöglicht. Ein weiteres Ziel war es, Kortikosterongehalte im Plasma und Eigelb miteinander zu vergleichen um festzustellen, ob eine Korrelation zwischen diesen Werten besteht. Auch diente Kortikosteron als Parameter, die Stressbelastung von Legehennen einheitlicher Herkunft und Aufzucht in verschiedenen Haltungsformen (naturnahe Freilandhaltung versus Käfighaltung) unter praxisrelevanten Voraussetzungen und unter Berücksichtigung ihres Gesundheitszustandes zu messen und zu vergleichen. Die Arbeit sollte es ermöglichen Schlussfolgerungen bezüglich der Stressbelastung und Tiergerechtigkeit der verglichenen Systeme zu ziehen, soweit der derzeitige Wissensstand es zulässt und es zukünftigen Handlungsbedarf aufzuzeigen.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es möglich ist, eine Methode zu entwickeln die sensibel genug ist, Kortikosteron im Eigelb nachzuweisen und somit den Beweis erbringt, dass Kortikosteron vom Blut ins Ei gelangt. Weiters wurde, bedingt durch die pulsatile Ausschüttung des Kortikosterons und seinen schnellen Anstieg im Blut in Stresssituationen, keine Korrelation zwischen den Blutkortikosteronspiegeln und den Spiegeln von Kortikosteron im Eigelb erwartet.

Weiters wurde postuliert, dass sich die Stressbelastung der Hühner in der naturnahen Freilandhaltung im Vergleich zu der Käfighaltung unterscheidet, vorausgesetzt, dass beide Haltungssysteme im Einklang mit den Mindestanforderungen der Europäischen Union sind. Hinsichtlich der Artgerechtigkeit beider Systeme wurde davon ausgegangen, dass Hühner in Käfigen einer größeren Stressbelastung ausgesetzt sind als Hühner in der naturnahen Freilandhaltung, da die Käfighaltung den Hühnern weniger Freiheit bietet, ihre angeborenen physiologischen Bedürfnisse im Sozial-, Nestbau-, Futteraufnahme-, Komfort-, Bewegungs- und Ruheverhalten auszuleben.

2.2 Material and Methode

2.2.1. Versuchstiere: Legehennen

Die Legehennen wurden in dem zur Westungarischen Universität, Fakultät für Landwirtschafts- und Lebensmittelwissenschaften, Institut für Tierzucht gehörenden Zuchtbetrieb in Mosonmagyaróvár gehalten. Als Untersuchungsmaterial wurden Tiere der Rasse „Gelbes ungarisches Huhn“ (Mosonmagyaróvár, Ungarn) verwendet. Diese Hennen befanden sich gemeinsam als einheitliche Herde bestehend aus insgesamt 6000 Hühnern bis zur 10. Woche in einem Aufzuchtstall in einer Besatzdichte von 12 Tieren/m² und ab der 11. Woche in einem Nachzuchtstall der Freilandhaltung gleich. Von der 11. bis zur 26. Lebenswoche wurden sie in einer Herde bestehend aus 1408 Tieren (1280 Hennen und 128 Hähne) in 32 Gruppen zu je 40 Hennen und 4 Hähnen in einer Besatzdichte von 1,2 Tieren/m² gehalten. Nach einer weiteren Selektion in der 26. Woche verringerte sich die Herdengröße auf 544 Tiere (480 Hennen und 64 Hähne), die wiederum in 32 Gruppen zu diesmal je 15 Hennen und 2 Hähnen (Geschwister) in einer Besatzdichte von 0,48 Tieren/m² gehalten wurden.

Im Alter von 45 Wochen wurden diese Hennen auf zwei unterschiedliche Haltungssysteme verteilt. Für den Versuch

wurden 20 Hennen in die Käfige, 20 Hennen in die naturnahe Freilandhaltung eingestallt. An keiner der Hennen wurden Eingriffe wie zum Beispiel das Touchieren der Schnäbel oder Stutzen der Flügel vorgenommen. Alle Legehennen erhielten dasselbe Futter und wurden gemäß Routineschema geimpft.

2.2.2. Die Käfighaltung

Die Käfigbatterien des Typs „HTK KHÜNE“ (Mosonmagyaróvár) waren ein etagig und fünfreihig (4 Käfige pro Reihe) angeordnet. In einem Käfig wurde je eine Henne gehalten, jeder Henne standen 2250 cm² zur Verfügung. Das Stallklima wurde mittels natürlicher Lüftung reguliert. Die Beleuchtung war ebenfalls natürlich (gesamte Fensterfläche: 5,4 m²), wobei die Beleuchtungsdauer im Zeitraum des Versuchs 14 Stunden pro Tag betrug.

2.2.3. Die naturnahe Freilandhaltung

Diese Haltung umfasste Bodenhaltung mit Auslauf (entwickelt und gebaut an der Westungarischen Universität, Fakultät für Landwirtschafts- und Lebensmittelwissenschaften, Mosonmagyaróvár) mit 20 an der Längsseite des Stalles angebrachten ein etagigen Falllegenestern (Typ: HTF 10, Holotrade KFt, Komárom) und 4 Sitzstangen pro Gruppe. Es wurden in der naturnahen Freilandhaltung insgesamt 544

Hühner (480 Hennen und 64 Hähne) in 32 Gruppen zu je 17 Tieren (15 Hennen und 2 Hähne) gehalten. Die Besatzdichte betrug 0,48 Tiere/m² nutzbare Stallfläche. Den Hennen stand zusätzlich täglich ein Freilandauslauf zur Verfügung (0,72 Tiere/m²), der nach einem 1,5 m breiten gepflasterten Übergangsbereich mit Sand eingestreut war. Ein Scharrraum stand den Hühnern nicht zur Verfügung. Die Lüftung war natürlich und wurde durch einen Abzugsventilator reguliert. Die Beleuchtung war durch eine künstliche Lichtquelle gewährleistet. Die Beleuchtungsdauer betrug 12 Stunden am Tag. Zusätzlich erhielten die Tiere Tageslicht.

2.2.4. Untersuchung des Gesundheitsstatus

Als klinische Parameter wurden an den Tagen 0, 2, 7 und 16 der jeweilige Zustand des Gefieders und der Krallen sowie die Beschaffenheit der Fußballen und etwaige Verletzungen der Kopfanhänge, der Kloake, der Ständer und der übrigen Körperteile ermittelt. Zur Beurteilung wurden 5 Legehennen jeder Haltungsform zeitgleich mit der Probeentnahme adspektorisch untersucht. Die Bewertung der Schädigungen erfolgte mittels eines Punktesystems in Anlehnung an Tauson et al. (1984) und Tauson (1986).

2.2.5. Hormonelle Blutuntersuchung - Kortikosteron

Es wurde in regelmäßigen Abständen in einem Zeitraum von 2,5 Wochen, beginnend unmittelbar nach der Umstallung an den Tagen 2, 7 und 16 von 5 Hühnern pro Gruppe von der Flügelvene 2 ml Blut entnommen. Tag 0 des Versuchs war der Tag der Umstallung. Es wurde daher an diesem Tag bewusst auf die Blutproben verzichtet, da die Tiere durch die Umstallung einen wesentlichen Stress erfuhren und die Aussage der Blutwerte im Sinne von Kontrollwerten verfälscht gewesen wäre.

Da Plasmakortikosteronspiegel innerhalb von 1 bis 2 Minuten nach einsetzen des Stressors (in diesem Fall Einfangen, Fixieren und Blutabnahme) steigen, wurde zudem darauf geachtet, dass die Zeitspanne vom Einfangen der Hühner bis zur Blutentnahme weniger als eine Minute betrug. Blutproben, die zur Untersuchung des Plasmakortikosterons dienen wurden in mit Na-EDTA beschichteten Röhrchen gesammelt, und anschließend zentrifugiert (2500g für 15 Minuten) um das Plasma von den Blutkörperchen zu trennen. Das Plasma wurde abpipettiert und bis zur Probenaufarbeitung in kleinen Eppendorf Röhrchen bei -20°C gelagert. Die Extraktion und das Enzym Immunoassay (EIA) zur Bestimmung des Plasmakortikosterons wurde an der Veterinärmedizinischen

Universität Wien am Institut für Biochemie gemäß der Methode von Palme und Möstl (1997) und Palme et al. (1999) durchgeführt.

2.2.6. Eisammlung und Untersuchung des Eigelbs auf Kortikosteron

Es wurden in regelmäßigen Abständen in einem Zeitraum von 2,5 Wochen, beginnend unmittelbar nach der Umstallung an den Tagen 0, 2, 7 und 16 von den selben 5 Hühnern pro Gruppe von denen auch Blut abgenommen wurde bzw. die klinisch untersucht wurden, tagesfrische Eier gesammelt. Diese wurden umgehend gekühlt und zur Analyse an die Staatliche Lebensmitteluntersuchungsanstalt in Budapest gebracht.

Die hier verwendete Methode, Kortikosteron im Eigelb nachzuweisen ist eine neu entwickelte Technik zur Erfassung der Stressbelastung von Legehennen. Sie beruht auf einer Messung des Kortikosterongehalts mittels HPLC-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography – Tandem Massspectrometry) nach einem speziellen Extraktionsverfahren.

Nach einer Homogenisierung and Trocknung wurden die Eigelbproben in einem Accelerated Solvent Extractor (ASE 200) zunächst einem Reinigungs-, dann einem Eluierungs- / Extraktionsverfahren unterworfen. Die extrahierten Proben

wurden in einem weiteren Schritt in einem Wasserbad bei 40°C mit Stickstoff eingeengt und es wurde ein interner Dexamethasonstandard hinzugefügt.

Die HPLC, bestehend aus SUPELCO Hypersil BDS C₁₈ als stationärer hydrophober Phase und einem Acetonitril und 0,005 M Ammoniumazetatgemisch gemäß zeitabhängigem Gradientenprogramm als mobiler Phase, diente zunächst der Trennung und Quantifizierung des Kortikosterons. Das Eluat der HPLC Säule wurde hiernach mittels Stickstoff als Trägergas und Helium als auxiliäres Gas in die Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) Interface und Ionenquelle eines MS/MS Systems gespeist.

In methodischen Vorversuchen wurden Daten bezüglich APCI – verwandten positiven und / oder negativen Ionisationsmodi für den bestätigten Nachweis von Kortikosteron und seinem internen Standard (ISTD) Dexamethason ermittelt. Gleichzeitig wurden die Kollisionsenergien dieser zwei Analyten zur Gewinnung von molekularen Ionen (M⁺) und verwandten Ionenfragmenten ermittelt. Auf der Basis dieser Versuche wurde der positive APCI Modus zum weiteren Nachweis von Kortikosteron gewählt.

Die ausgewählte Ionenmonitorisierung (selected ion monitoring) wurde im Scanmodus von 50 – 450 m/z durchgeführt.

Um die Quantifizierung von Kortikosteron zu erleichtern, wurde zu den Proben eine konstante Dexamethasonmenge hinzugefügt. Das Verfahren wurde zur Sicherstellung der Wiederholbarkeit (repeatability), Genauigkeit (accuracy) und Selektivität (selectivity) einem Validerungsprozess unterzogen. Hierbei konnten für Kortikosteron ein limit of detection (LOD) von 0,025 ppb und ein limit of quantification (LOQ) von 0,040 ppb festgestellt werden (Sas et al. 2006).

Die entwickelte Methode ist die erste bekannte funktionelle Methode auf HPLC-MS/MS - Basis die den zuverlässigen Nachweis von Kortikosteron im Eigelb ermöglicht.

3. Neue wissenschaftliche Erkenntnisse

Aus der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zum Nachweis von Kortikosteron im Ei und den durchgeführten Versuchen können die folgenden neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse abgeleitet werden:

1. Die entwickelte Methode basierend auf HPLC-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography – Tandem Massspectrometry) ist funktionell und mit einem limit of detection von 0,025 ppb und einem limit of quantification von 0,040 ppb sensibel genug, um auch sehr geringe Kortikosteronmengen nachweisen zu können. Die Stärke dieser Methode liegt unter anderem darin, dass sie Kortikosteron nicht nur an Hand seiner Masse (beziehungsweise seines Masse / Ladungsverhältnisses) sondern auch durch sein Fragmentierungsmuster identifiziert, ein viel genaueres und strengeres strukturelles Merkmal, das für jede Substanz einzigartig ist. Die entwickelte Methode ist die erste bekannte funktionelle Methode auf HPLC-MS/MS - Basis die den zuverlässigen Nachweis von Kortikosteron im Eigelb ermöglicht.

2. Die vorliegenden Resultate dieser Arbeit belegen, dass es mit der neu entwickelten Methode möglich ist, Kortikosteron im Eigelb mittels HPLC-MS/MS nachzuweisen und somit sowohl einen der bedeutendsten Stressparameter zu erfassen als auch den Beweis zu erbringen, dass Kortikosteron in das Ei gelangt und als stabiles Probenmaterial zur nicht invasiven Messung der Stressbelastung bei Legehennen herangezogen werden kann.
3. Ein Vergleich des Gesundheitsstatus der Hennen in den zwei Haltungsformen wies keine signifikanten Unterschiede auf. Zwar verschlechterte sich der Gefiederzustand der Hennen in der naturnahen Freilandhaltung im Verlauf des Versuchs – ein Ergebnis das eine erhöhte Federpickinzidenz vermuten lässt - doch nicht in einem signifikanten Ausmaß. Es konnte bei den Hennen in der Käfighaltung kein Federpickverhalten beobachtet werden, allerdings war dies bedingt durch die Einzelhaltung und die daraus resultierende fehlende Möglichkeit des sozialen Kontakts auch nicht zu erwarten. Die Ballen- und Krallengesundheit waren bei Hennen in naturnaher Freilandhaltung nicht in einem signifikanten Ausmaß besser als in der Käfighaltung, obwohl die Dauer des Versuchs zu kurz war um Rückschlüsse auf die Langzeitfolgen der Käfighaltung auf diese beiden Parameter zu erlauben.

4. Der Vergleich der Kortikosteronwerte im Blutplasma der Hennen in der naturnahen Freilandhaltung und in der Käfighaltung wies keine signifikanten Unterschiede auf. Die Mittelwerte des Plasmakortikosterons lagen in der Käfighaltung zwischen $0,850 \pm 0,336$ ng/ml und $2,100 \pm 0,780$ ng/ml, mit einem Gesamtmittelwert von $1,590 \pm 0,734$ ng/ml und weit gestreuten Einzelwerten von 0,53 ng/ml bis 3,81 ng/ml. In der naturnahen Freilandhaltung erstreckten sich die Mittelwerte des Plasmakortikosterons von $0,804 \pm 0,037$ ng/ml und $1,644 \pm 0,502$ ng/ml mit einem Gesamtmittelwert von $1,110 \pm 0,474$ ng/ml. Einzelwerte waren auch in dieser Haltungsform, wenn auch weniger, weit gestreut und rangierten zwischen 0,33 ng/ml und 2,90 ng/ml. Vergleicht man sowohl die gesamten als auch die für jeden Tag der Probenentnahme gesondert errechneten Plasmakortikosteron Mittelwerte der beiden Haltungsformen, so waren die Tagesmittelwerte, mit Ausnahme des Tag 2 der Probenentnahme in der Käfighaltung höher als in der naturnahen Freilandhaltung. Auch der Gesamtmittelwert des Plasmakortikosterons war in der Käfighaltung höher als in der naturnahen Freilandhaltung. Dennoch waren diese Unterschiede nicht als signifikant zu bewerten.
5. Der Vergleich der Kortikosteronwerte im Eigelb der Hennen in der naturnahen Freilandhaltung und in der Käfighaltung

wies keine signifikanten Unterschiede auf. Die Mittelwerte des Kortikosterons im Eigelb lagen in der Käfighaltung zwischen $0,133 \pm 0,093$ ppb und $0,209 \pm 0,143$ ppb, mit einem Gesamtmittelwert von $0,179 \pm 0,133$ ppb und Einzelwerten von $0,040$ ppb bis $0,668$ ppb. In der naturnahen Freilandhaltung erstreckten sich die Mittelwerte des Kortikosterons im Eigelb von $0,071 \pm 0,041$ ppb und $0,571 \pm 0,395$ ppb mit einem Gesamtmittelwert von $0,314 \pm 0,211$ ppb. Einzelwerte waren in dieser Haltungsform weiter gestreut als in der Käfighaltung und rangierten zwischen $0,040$ ppb und $1,361$ ppb. Die Hennen in der naturnahen Freilandhaltung wiesen, mit Ausnahme von Tag 2 der Probenentnahme, höhere Tagesmittelwerte des Kortikosterons im Eigelb auf und auch der Gesamtmittelwert des Kortikosterons im Eigelb war höher als in der Käfighaltung, doch waren diese Unterschiede nicht signifikant.

6. Ein Vergleich der Kortikosteronwerte im Eigelb und Plasma ergab, dass zwischen diesen Parametern in beiden Haltungsformen keine Korrelation besteht. Die Plasmakortikosteronwerte unterlagen bedingt durch die episodische und pulsatile Ausschüttung des Kortikosterons sowie den schnellen Anstieg in Folge eines Stressors (wie zB. Die Blutabnahme) einer großen Schwankungsbreite. Im Gegensatz dazu erlaubte das Eigelb eine nicht invasive

Langzeitmessung des Kortikosterons und spiegelte die Kortikosteronspiegel im Plasma über den Zeitraum der Eiformation (24 Stunden) wider. Die Eier stellten in diesem Zusammenhang Sammelproben dar, die Schwankungen und Verzerrungen, die im Zuge der invasiven Probengewinnung entstanden, ausglich.

7. Die Resultate der Kortikosteronmessungen im Blutplasma und Eigelb der Hennen wiesen darauf hin, dass sich die Stressbelastung der Hennen in der Käfig- und naturnahen Freilandhaltung nicht unterschied. Obwohl die Hypothese aufgestellt wurde, dass sich die Stressbelastung der Hennen in den beiden Haltungssystemen unterscheidet und eine erhöhte Stressbelastung der Hennen in der Käfighaltung erwartet wurde, konnte dies im Rahmen dieser Arbeit nicht verifiziert werden. In Anbetracht der Modifizierung beider Haltungssysteme und ihrer fehlenden Konformität mit den Vorgaben der Europäischen Union war diese Arbeit allerdings eher als der Vergleich einer „artgerechteren Käfighaltung“ mit einer „reduzierten Freilandhaltung“ anzusehen bei dem rückblickend eine signifikant höhere Stressbelastung der Käfighennen nicht wahrscheinlich war.

4. Liste der Publikationen zum Arbeitsthema

GYIMÓTHY, I.M. (2003): Übersicht: Stress in der Tierhaltung, Acta Agronomica Ovariensis, 45, 2, 213-222, 2003.

GYIMÓTHY, I.M. (2004): Stresstényezők és stresszválaszok a baromfitartásban, Magyar Állatorvosok Lapja, 126, 65-128, 2004/2, 101-106.

GYIMÓTHY, I.M. (2004): Gondolatok Selye János etikai felfogásáról a tudományban és a kutatásban, Magyar Állatorvosok Lapja, 126, 385-448, 2004/7, 439-440.

GYIMÓTHY, I.M. (2004): Übersicht: Stressparameter in der Hühnerhaltung, Acta Agronomica Ovariensis, 45, 2, 223-232, 2003.

GYIMÓTHY, I.M. (2004): Entwicklung neuer Methoden zur nicht invasiven Messung der Stressbelastung bei Hühnern, 17th IGN-Symposium – 11th FREILAND-Meeting, Vienna.

GYIMÓTHY, I.M., GÁAL, E. (2004): Non-invasive methods for the assessment and comparison of stress exposure in poultry kept in intensive and free range keeping systems, 30th scientific days 2004, Mosonmagyaróvár.

SAS, B., DOMANYI, G., GYIMOTHY, I., GAAL KOVACSNE, K., SÜTH, M. (2006): Influence of the type of management system on corticosterone transfer into eggs in laying hens. *Acta Veterinaria Hungaria* 54 (3), 343-352.

Österreichisches Parlament, 2003 bis heute

Expertin für Tierschutz mit Schwerpunkt Entwicklung und Etablierung eines neuen bundesweiten Tierschutzgesetzes in Österreich in Übereinstimmung mit den Vorgaben der Europäischen Union.

Beratendes Mitglied des österreichischen parlamentarischen Unterausschusses in den Bereichen Tierschutz und Haltungssysteme der landwirtschaftlichen Nutztiere.