

DOKTOR (PhD) ARBEIT

Gyimóthy – Willmann Ilse Maria

MOSONMAGYARÓVÁR

2007

DOKTOR (PhD) ARBEIT

Gyimóthy – Willmann Ilse Maria

MOSONMAGYARÓVÁR

2007

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

*Doktor Schule für biologische, technologische, ökologische,
fütterungsrelevante- und ökonomische Aspekte in der
Tierproduktion
(Az állati termék-előállítás biológiai, technológiai, ökológiai,
takarmányozási és ökonomiai kérdései doktori iskola)*

Leiter der Doktor Schule:

Dr. Schmidt János
Universitätsprofessor

Programm für Tierproduktionsleistungsveredlung und Haltungstechnologie
(Az állati terméktermelés nemesítési és tartástechnológiai
vonatkozásai program)

Programmleiterin:

Kovácsné Dr. habil Gaál Katalin
Institutsleiterin, Universitätsprofessorin

Themenleiterin:

Kovácsné Dr. habil Gaál Katalin
Institutsleiterin, Universitätsprofessorin

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

Von:

Gyimóthy – Willmann Ilse Maria

Mosonmagyaróvár
2007

Als Begutachter schlage ich die Annahme vorliegender Arbeit vor (ja / nein)

Erster Begutachter (Dr.) ja / nein

(Unterschrift)

Zweiter Begutachter (Dr.) ja / nein

(Unterschrift)

Die Kandidatin hat in der öffentlichen Diskussion der Arbeit % erreicht.

Mosonmagyaróvár,

**Leiter der
Jury**

Qualifikation des Doktor (PhD) Diploms

**EDT
Präsident**

Inhaltsverzeichnis

1. ABSTRACT	6
2. EINLEITUNG	8
3. LITERATURÜBERSICHT	14
3.1 GESCHICHTE UND ENTWICKLUNG DES HAUSHUHNS	14
3.2 HAUPTGRUPPEN DER HÜHNERRASSEN	15
3.3. DAS GELBE UNGARISCHE HUHN	16
3.4 VERHALTENSKUNDE DER HÜHNER UND EMPFEHLUNGEN DES EUROPA RATES	22
3.5 HALTUNGSTECHNOLOGIEN – ENTWICKLUNG UND VERGLEICH	28
3.5.1 Käfighaltung	29
3.5.2 Ausgestaltete Käfighaltung	31
3.5.3 Bodenhaltung	33
3.5.4 Volierenhaltung.....	36
3.5.5 Ökologische Geflügelhaltung / Freilandhaltung.....	38
3.6 STRESSOREN	41
3.7 STRESSPHYSIOLOGIE	42
3.8 STRESSPARAMETER UND METHODEN DES STRESSNACHWEISES ...	55
3.8.1. Verhaltensänderungen und -störungen	55
3.8.2. Physiologische Stressparameter	57
3.8.3. Pathologische Stressparameter	67
4. MATERIAL UND METHODE	70
4.1 BESCHREIBUNG DER HENNEN	70
4.2 BESCHREIBUNG DER KÄFIGHALTUNG.....	72
4.3 BESCHREIBUNG DER NATURNAHEN FREILANDHALTUNG	72
4.4 PROBENENTNAHMEN UND UNTERSUCHUNG DES GESUNDHEITSTATUS	73
4.5 HORMONELLE BLUTUNTERSUCHUNGEN – KORTIKOSTERON	76

4.6 EISAMMLUNG UND UNTERSUCHUNG DES EIGELBS AUF KORTIKOSTERON.....	77
5. ERGEBNISSE	85
5.1 GESUNDHEITSTATUS IM VERLAUF	85
5.2 KORTIKOSTERON IM PLASMA	91
5.3 KORTIKOSTERON IM EIGELB	92
5.4 KORTIKOSTERON IN PLASMA UND EIGELB – VERGLEICH DER HALTUNGSFORMEN UND DER BEIDEN PARAMETER	94
6. DISKUSSION.....	98
7. NEUE WISSENSCHAFTLICHE ERKENNTNISSE.....	121
8. ZUSAMMENFASSUNG	127
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	130
10. DANKSAGUNG	167

1. Abstract

As modern animal keeping systems continue to gain importance, objective means for determining their adequacy in relation to animal well-being are becoming increasingly necessary. Methods focusing on the benefit of non invasive stress measurement are preferred, since disturbances arising through the stress inflicted by sampling itself are avoided. In laying hens, corticosterone and its metabolites are suitable tools for measuring stressload. The preliminary aim of this thesis was to develop a practicable method for the detection of corticosterone in the egg. Furthermore, a comparison of the well-being and stress exposure of laying hens kept in free range and cage keeping systems was made on the basis of the hen's health status and the results of corticosterone measurements in both the bloodplasma and the egg. In this respect, a correlation between blood and egg corticosterone levels was searched for. 20 hens each were transferred to a caged- and free range keeping system. Determination of health status and egg sampling were performed on days 0, 2, 7 and 16 of the trial. Bloodsamples were taken on days 2, 7 and 16 and corticosterone levels were determined by EIA. Corticosterone in egg yolk was measured by the new method based on HPLC-MS/MS that was developed in the course of this thesis. It can be stated that this method is functional and sensitive enough to

enable the detection and measurement of minute corticosterone amounts, identifying corticosterone not only by its mass and mass / charge ratio, but also according to the fragmentation pattern of its ions. Measurements showed that corticosterone is transferred to the egg yolk, providing a sample material which can be used for the non invasive assessment of stress load. In summary, the method for detection of corticosterone developed in the course of this thesis is the first known functional method based on HPLC-MS/MS that enables the reliable detection of corticosterone in the egg yolk.

Comparing the health status, corticosterone values in the bloodplasma and corticosterone values in the egg yolk, no significant differences could be determined when comparing hens kept in the caged- and free range system. In addition, there was no correlation between corticosterone levels measured in the bloodplasma and the egg yolk in both keeping systems. In summary, it can be stated that the results of corticosterone measurements in plasma and egg yolk do not indicate a difference in the stress experienced by hens kept in cages and free range keeping systems in comparison.

2. Einleitung

Die artgerechte Tierhaltung und die objektive Beurteilung der Stressbelastung gewinnen, vor allem durch die Entwicklung neuer, moderner Tierhaltungssysteme im Nutztierbereich zunehmend an Bedeutung. Insbesondere die Käfighaltung von Legehennen stellt sowohl für viele Konsumenten als auch für Produzenten ein tierschutzrechtliches Problem dar. Nicht zuletzt aus diesem Grunde, folgte der Gesetzgeber mit dem Verbot der konventionellen Käfighaltung ab 2012 (Richtlinie 1999/74/EG des Rates der Europäischen Union vom 19.07.1999) diesem Trend in der Geflügelhaltung – weg von intensiven Haltungssystemen und hin zu alternativen, tiergerechteren Haltungssystemen.

So wird der Umstieg auf alternative Systeme im Legehennensektor gesetzlich vorgeschrieben. Vom ökonomischen Aspekt ist bei diesem Umstieg zwar anfänglich mit finanziellen Einbußen zu rechnen, diese gleichen sich aber durch den höheren Marktwert der produzierten Eier und die bessere Legeleistung (Roth 2004) der Hennen aus. Auch in Zuchtbetrieben sind stressfreiere und artgerechtere Haltungsformen von finanziellem Vorteil, da es am Beispiel der japanischen Wachtel wissenschaftlich erwiesen ist, dass gestresste Muttertiere schwächere, weniger überlebensfähige

Küken produzieren und sich eine wesentlich höhere Mortalitätsrate abzeichnet als bei artgerecht gehaltenen Tieren (Hayward und Wingfield 2004).

Doch, wer garantiert, dass ein alternatives Haltungssystem den Hennen wirklich gerecht wird und ihrem Wohlbefinden zu Gute kommt?

Tiergerechtigkeit folgt nicht dem Alles-oder-Nichts-Prinzip und kann nur vergleichend bewertet werden. Wissenschaftlich absicherbar ist nur eine Beurteilung entlang eines Kontinuums von sehr wenig bis sehr tiergerecht (Broom 1991).

So wird bei der Beurteilung der Tiergerechtigkeit eines Haltungssystems die Wahrscheinlichkeit eingeschätzt, mit der sich Hennen unter den gegebenen Haltungsbedingungen wohl befinden oder Stress, Schmerzen, Leiden oder Schäden erfahren. Doch Wohlbefinden ist nicht allein die Abwesenheit von Stress, Schmerzen, Leiden oder Schäden, sondern kann als das Ausmaß der Auseinandersetzungsfähigkeit oder Adaptationskapazität an die Umwelt definiert werden (Knierim 2001). Die Beurteilung erfolgt anhand von Parametern, die direkt oder indirekt Auskunft über das psychische Befinden, die Stressbelastung und den körperlichen Zustand der Tiere geben (Fraser und Broom 1990; Knierim 1998).

Es ist biologisch begründet davon auszugehen, dass das Risiko für Beeinträchtigungen der Befindlichkeit und des körperlichen Zustandes sowie ein Anstieg in der Stressbelastung umso größer ist, je mehr sich die Hennen an das System anpassen müssen und je eingeschränkter die Möglichkeiten sind, ihr natürliches Verhalten auszuüben (Staack und Knierim 2003).

Nicht zuletzt deshalb ist es unabdingbar, Haltungssysteme unter Berücksichtigung sowohl ethologischer als auch gesundheitlicher und ökonomischer Aspekte zu evaluieren und Parameter zu schaffen, die Rückschlüsse auf den Gesundheits- und sonstigen körperlichen und psychischen Zustand sowie auf die Stressbelastung der Hennen erlauben.

Auf der Suche nach wissenschaftlich fundierten und objektiven Messverfahren, die Aufschluss über das Wohlbefinden und die Stressbelastung von Hennen geben, stellt die nicht invasive Stressmessung, bei der Störfaktoren bedingt durch den Stress der Probenahme umgangen werden, eine neue Herausforderung dar.

Bei Hühnern dienen unter anderem Kortikosteron und seine Metaboliten zur Erfassung der Stressbelastung. Doch warum wählt man Kortikosteron in der Wissenschaft als primären Stressindikator? Kortikosteron ist vor allem was die Erfassung der chronischen Stressbelastung betrifft der am häufigsten verwendete und verlässlichste Parameter. Pauschal könnte man

sagen: erhöhte Stressbelastung ist gleich erhöhtes Kortikosteron. Zudem ist es die chronische Form von Stress, bedingt durch persistierende Stressoren oder die Summe von immer wieder kehrenden – auch akuten – Einzelstressoren, die die Gesundheit der Hühner negativ beeinflusst. Es kommt zu einer Immunsuppression, kardiovaskulären Erkrankungen, gastrointestinalen Ulzera, lymphatischen Involutionen, einem Muskel- und Knochenabbau, einer Abnahme der Produktionsleistung und durch die erhöhten Kortikosteronspiegel in Zuchteiern zu schwächeren Küken mit einem geringeren Entwicklungspotential.

Die Verwendung von Kortikosteron bietet sich nicht zuletzt deshalb an, da dieses Hormon sowohl im Blutplasma, als auch im Ei und Kot nachweisbar ist. Das Ei als Probenmaterial zum Nachweis von Kortikosteron heranzuziehen ist deshalb vorteilhaft, da es im Vergleich zu Blutproben keine Momentaufnahme sondern eine Sammelprobe darstellt, die wesentlich stabiler ist als der Kot. Das im Blut zirkulierende Kortikosteron gelangt in der Zeit der Eiformation über einen Zeitraum von ca. 24 Stunden in das Ei und spiegelt somit die Stressbelastung über diesen Zeitraum wider (Downing und Bryden 2002).

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, 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. Weiters werden Aspekte der Gesundheit und der Stressbelastung von Legehennen in den zwei oben genannten Haltungssystemen untersucht und diskutiert. Kortikosterongehalte im Plasma und Eigelb werden miteinander verglichen um festzustellen, ob eine Korrelation zwischen diesen Werten besteht. Auch soll Kortikosteron als Parameter dienen, 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. Es werden Schlussfolgerungen bezüglich der Stressbelastung und Tiergerechtheit der verglichenen Systeme gezogen, soweit der derzeitige Wissensstand es zulässt und es wird zukünftiger Handlungsbedarf aufgezeigt

Es wird 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 wird, 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 wird 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 ist anzunehmen, 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.

3. Literaturübersicht

3.1 Geschichte und Entwicklung des Haushuhns

Die Vorfahren der Haushühner stammen in erster Linie aus Asien. Besonders das bis heute in Indien lebende rebhuhnartige Bankivahuhn (*Gallus gallus* L.) wird als Vorfahre unserer Haushühner angesehen (Sterbetz 1979). Manche Quellen besagen, dass Hühnerdarstellungen in Ägypten sogar schon aus der Zeit 4400 v. Chr. existieren. In diesem Zusammenhang wurden Hühner erst als Kulttiere, später wegen ihres Fleisches und in jüngerer Zeit auch wegen ihrer Eier gehalten.

Die Entwicklung des Haushuhns wie wir es kennen begann Tonfiguren zufolge vor etwa 4000 Jahren im südostasiatischen Raum. Die Verbreitung des Haushuhns in der ganzen Welt sowie die Domestikation bewirkten allerdings vielfältige Veränderungen im äußeren Erscheinungsbild. So unterscheiden wir Zwergrassen (0,75kg) und Riesenrassen (5,5kg), sowie Hühner mit verschiedenen Farbschlägen, Nackthälsen, befiederten Beinen und Zehen, Federhauben, mehrfachen, kleinen und großen Kämmen, steilen und mehr waagrechten Körperhaltungen (Matolcsi 1975; Peitz und Peitz 2002).

3.2 Hauptgruppen der Hühnerrassen

Klassifiziert man Hühnerrassen gemäß ihrer Verwendung unterscheidet man zwischen den so genannten Legerassen (z.B. Italiener) mit leichtem Körperbau (Hennen: 2-2,5 kg Körpergewicht), geringem Bruttrieb, weißschaligen Eiern und einer Eiproduktion von ungefähr 200 Eiern im Jahr, den Fleischrassen (z.B. Cochins oder Dorkings) mit massigem Körper (Hennen: 3-4,5 kg Körpergewicht), zuverlässigem Bruttrieb und gelb- bis braunschaligen Eiern und den Zweihühnerrassen, die in ausreichendem Maße sowohl Ei- als auch Fleischlieferanten sind (z.B. Sussex und Wyandotten). Diese Rassen zeichnen sich durch ihren kräftigen Körper (Hennen: bis 3 kg Körpergewicht), meist zuverlässigen Bruttrieb sowie ihre überwiegend braunschaligen Eier aus und liegen bei einer Eiproduktion von ungefähr 180 Eiern im Jahr (Stern 2001).

Grundsätzlich erfolgt eine Differenzierung zwischen bodenständigen Landrassen, die sich weiters in den Mittelmeertyp (z.B. Italiener, Leghorn), den nordwesteuropäischen Typ (z.B. Rheinländer) und den asiatischen Typ (z.B. Wyandotten, New Hampshire, Australorps) gliedern, Zwerggrassen, wo zwischen verzweigten Rassen (z.B. Zwerg- Welsumer) mit einem Körpergewicht von etwa 1kg und einer Legeleistung von 180 Eiern pro Jahr und

eigenständigen kleinen Rassen oder Urzweigen (z.B. Seidenhuhn) mit einem Körpergewicht von 1 kg und einer Legeleistung von 120 Eiern pro Jahr unterschieden wird, und Hybridzuchtungen. Bei den heute verbreiteten Hybridzuchtungen spricht man nicht mehr von Rassen sondern von Linien und unterscheidet zwischen braunen und weißen Hybridhühnern, die durch Kreuzungen (vorwiegend mit Leghorn) in einer Generation Hochleistungen erbringen. Die einseitige Züchtung auf ein Produktionsmerkmal (Eier oder Fleischgewinnung) hin bedingt, dass zum Beispiel die Legeleistung der Legehybriden mit 260 Eiern pro Jahr die der Landrassen bei weitem übertrifft (Stern 2001).

3.3. Das gelbe ungarische Huhn

Die Herkunft des ungarischen Huhns ist nicht genau bekannt. Winkler (1921) und Bakoss (1931) nehmen an, dass die Vorfahren dieser Rasse aus Asien stammen und erst Ende des neunten Jahrhunderts in das karpatische Becken gebracht wurden. Aus diesem „antiken ungarischen Huhn“ wurden durch Einkreuzungen mehrerer orientalischer und mediterraner Rassen die heute bekannten ungarischen Hühnerrassen. Das ungarische Huhn gehört seit dem Mittelalter zu den bodenständigen Landrassen Ungarns, ist in den Farben gelb, weiß, gesperbert

und in Rebhuhnfarbe bekannt und wurde vor allem wegen seiner exzellenten Fleischqualität, die von seinem ausgeprägten Schartrieb herrührt, und seiner Robustheit bevorzugt. Diese Rasse bildet die Grundlage für die in diesem Jahrhundert begonnene Zuchtarbeit. Es folgte Anfang 1930 zunächst die Einkreuzung mehrerer ausländischen Kulturrassen durch Bálint Báldy und seine Kollegen (Institut für Kleintierforschung in Gödöllő), deren Ziel es war, das Erscheinungsbild der ungarischen Hühnerrassen zu vereinheitlichen und ihre Ei- sowie Fleischproduktion zu verbessern. Im Zuge des zweiten Weltkrieges wurde die Mehrheit dieser Hühner umgebracht. Dank des Einsatzes und der systematischen Zuchtarbeit von Bálint Báldy, Béla Lacza, Alfréd Suschka in Gödöllő sowie Ferenc Biskup und László Beke in Mosonmagyaróvár wurden die ungarischen Hühnerrassen allerdings nicht nur bewahrt sondern auch propagiert (Biskup und Beke, 1951; Báldy 1954). Vor allem ab 1953 steht an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Westungarischen Universität in Mosonmagyaróvár die Rein- und Erhaltungszucht der Rasse sowie die Genkonservierung im Mittelpunkt (siehe Abb. 1). Es wird bei den ungarischen Hühnerrassen zwischen dem gelben, dem weißen und dem gesprenkelten ungarischen Huhn unterschieden, die allerdings alle sehr eng miteinander verwandt sind.

Das Prinzip zur Konservierung der Rasse des gelben ungarischen Huhns, wie in Mosonmagyaróvár durchgeführt, beruht auf den Zuchtauswahlmethoden nach Lerner, ausgearbeitet an der Universität in Kalifornien. Es werden in der Selektion nicht nur die Leistung jedes Individuums, sondern auch die Leistung der Familien berücksichtigt.

Die in dieser Studie verwendeten Hennen stammen aus den 32 Elite Stämmen – bestehend aus je zwei Hähnen (Geschwister) und fünfzehn Legehennen – die die Erhaltung der Rasse gewährleisten und zur Reinzucht herangezogen werden.

Zuchtprogramm zur Erhaltung der Rasse des gelben ungarischen Huhns

Das Zuchtprogramm beginnt mit der Pedigreebrut zu Frühlingsanfang. Im Alter von 10 Wochen befinden sich die Hühner in einer Vorzuchtanlage und es wird eine Selektion nach den Kriterien des Charakters, der Entwicklung, Körpermasse und der Konstitution der Hühner durchgeführt. Die für die Zucht geeigneten Tiere werden an eine Nachzuchtanlage, die einer naturnahen Freilandhaltung gleicht, überstellt. Im Herbst erfolgen die Wiedereinstellung und eine nochmalige Selektion nach den bereits oben angeführten Gesichtspunkten, wobei diesmal auch die Jahresleistung der Elterntiere berücksichtigt wird.

Die Auswahl der Hähne und Zusammensetzung der einzelnen Stämme bestehend aus zunächst 40 Legehennen und 4 Hähnen erfolgt nach der Aufnahme in das Herdenbuch und der Ausarbeitung eines Zuchtplanes im Alter von 20 Wochen. Die Eier aus den Fallnestern werden gesondert gesammelt und gewogen und bilden die Grundkriterien zur Auswahl der zwei Hähne und der fünfzehn Elite- Legehennen die ab der 26. Lebenswoche für die Weiterzucht verwendet werden.

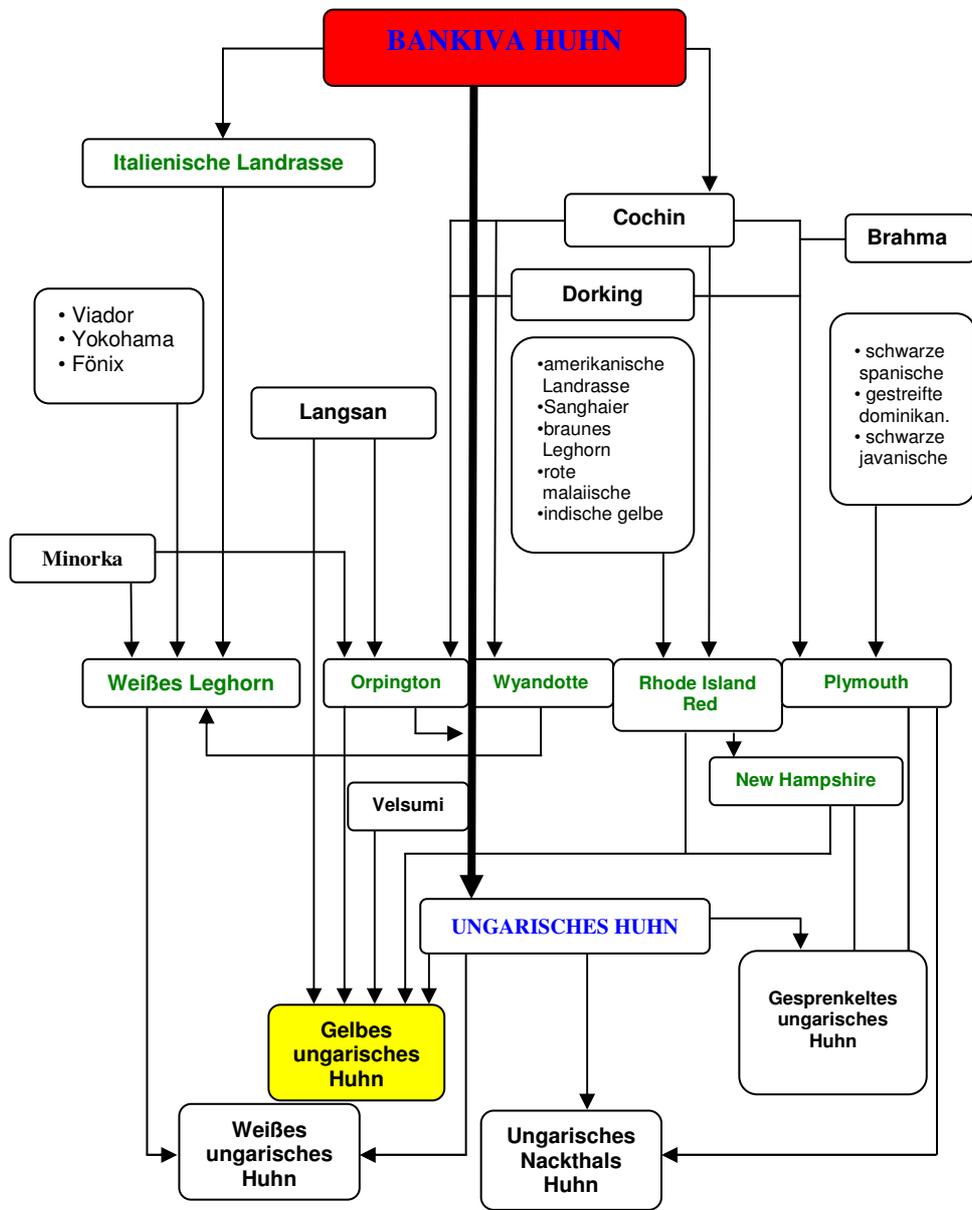
Exterieur des ungarischen gelben Huhns

Das gelbe ungarische Huhn zeichnet sich durch seinen kleinen runden Kopf, seinen gelben kurzen gekrümmten Schnabel, seine ausdrucksstarken orange-roten hellen Augen, seinen mittelgroßen, aufrechten blutroten Einzelkamm, sein fast federloses Gesicht, seine große ovale Ohrscheibe, seinen großen ovalen Kehllappen, seinen dicht befiederten Hals, seinen mittelgroßen, zylindrischen Rumpf, seine runde, breite und prominente Brust, seinen hohlen Rücken mit horizontalem Rückenprofil, seine großen eng an den Körper anliegenden Flügel, seinen aufrechten geschlossenen und relativ großen Schwanz, seine mittelgroßen gelben Ständer und Zehen, seine stolze, misstrauische Haltung und seine dichte aber eng anliegende Fiederung aus. Die Hennen dieser Rasse erreichen im Schnitt ein Körpergewicht von 2,1 kg, sind strahlend gelb und die Federn des unteren Halses weisen braune oder schwarze

Spitzen auf, während die Schwanzfedern zur Gänze braun oder schwarz gefärbt sind. Ihre jährliche Legeleistung beträgt 210 Eier mit einem Gewicht von ungefähr 58,7 g. Die Hähne haben eine durchschnittliche Körpermasse von 2,6 kg, sind ähnlich gefärbt, haben allerdings einen etwas dunkleren Hals, Flügel und Rücken und grün-schwarze Sichelfedern (Szalay, 2002, Kovácsné Gaál 2004).

Abb. 1

Die Entstehung des Ungarischen Huhns (Bögge et al. 1964)



3.4 Verhaltenskunde der Hühner und Empfehlungen des Europa Rates

Die Gesamtheit aller Lebensäußerungen eines Tieres bezeichnet man als Verhalten. Hierunter fallen besonders Bewegungen, Körperstellungen und Lautäußerungen. Man unterscheidet zwischen angeborenem Verhalten (Instinktverhalten) und erlerntem Verhalten sowie Normalverhalten und Verhaltensstörungen, wobei das angeborene Verhalten für das Überleben von großer Bedeutung und Tierart spezifisch ist. Es besteht für die Hühner, wie auch für andere Tiere, ein innerer, stets wiederkehrender Trieb, ihre angeborenen Verhaltensweisen auszuführen, zu deren Auslösung bestimmte Schlüsselreize notwendig sind die aktiv von den Hühnern aufgesucht werden. Durch die triebkonsumierende Endhandlung (als Verhaltensform erkennbar) wird der bestehende Trieb vermindert. Diesen Ablauf bezeichnet man als angeborenen Auslösemechanismus (AAM). Fehlen die entsprechenden Schlüsselreize, kommt es zu einem so genannten „Triebstau“ und in der Folge zu Verhaltensstörungen (Sambraus 1978; Bogner und Grauvogl 1984).

Das erlernte Verhalten dient der Feinabstimmung. Beispiele hierfür sind die Anpassung an den Lebensraum (z.B. die Suche nach Futter- und Wasserstellen, Vermeiden von Feinden u.s.w.)

und die Eingliederung in ein Sozialgefüge (z.B. Hackordnung) (Sambraus 1978; Bogner und Grauvogl 1984).

Als normales oder natürliches Verhalten bezeichnet man das Verhalten eines gesunden Huhnes in seiner natürlichen Umgebung. Erhebliche Abweichungen vom Normalverhalten, das heißt Verhaltensstörungen, werden vor allem durch Erschöpfung der Anpassungsfähigkeit an die Umwelt oder durch Krankheit hervorgerufen.

Man unterscheidet zwischen quantitativen und qualitativen Abweichungen vom Normalverhalten:

Quantitative Abweichungen werden häufiger (z.B. Aggressionen, Fluchtbereitschaft), seltener (z.B. Futtersuche in der Käfighaltung) oder gar nicht (z.B. Flattern in der Käfighaltung) ausgeführt wohingegen qualitative Abweichungen Verhaltensweisen darstellen, die in einer normalen Umgebung nicht vorkommen. Dies sind Handlungen an inadäquaten Ersatzobjekten (z.B. Sandbaden in der Futterrinne des Käfigs), Leerlaufhandlungen ohne adäquates Objekt (z.B. Ersatzscharren auf dem Gitterboden des Käfigs), gleichförmig wiederholte Handlungen (Stereotypien) u.s.w.

Werden Verhaltensstörungen beobachtet, ist davon auszugehen, dass das Huhn gestresst ist und nicht artgerecht gehalten wird (Fölsch 1981).

Hühner weisen in einer artgerechten Haltung einen charakteristischen Tagesablauf auf und man beobachtet bei artgerecht gehaltenen Hennen sechs bestimmte Verhaltensfunktionskreise:

Nahrungsaufnahmeverhalten

Dieser Verhaltensfunktionskreis ist der häufigste und umfasst das Gehen, Erkunden, Scharren sowie vielfältige Pickaktivitäten wie Ziehen, Reißen, Hacken und Bearbeiten veränderbarer Nahrungsbestandteile mit dem Schnabel (Dawkins 1989; Dawkins und Hardie 1989). Zu diesem Grundbedürfnis heißt es in der Empfehlung in Bezug auf Haushühner der Art *Gallus gallus*, die der Ständige Ausschuss des Europäischen Übereinkommens zum Schutz von Tieren in der landwirtschaftlichen Tierhaltung angenommen hat, unter anderem: „Haushühner haben bei der Futteraufnahme das typische Verhalten des Bankiva Huhns beibehalten, das aus Picken, Scharren, gefolgt von Futteraufnahme besteht. Wenn auch das Ausmaß des beibehaltenen Pick- und Scharrverhaltens bei den Hybridrassen unterschiedlich ist, so ist es immer noch vorhanden (Savory et al. 1978; Fölsch 1981) und kann, wird es unmöglich gemacht, auf Artgenossen umorientiert werden und in Verletzungen oder sogar Kannibalismus resultieren.“

Fortbewegungsverhalten

Die Fortbewegung nimmt etwa ein viertel des Tages in Anspruch, wobei für Hühner die häufigste Fortbewegungsart das Gehen ist. Auch dieses Verhalten ist bei nicht artgerechter Haltung und fehlendem Platzangebot beschränkt.

Ruheverhalten

Hühner verbringen etwa ein Fünftel des Tages mit dem Ausruhen, welches stehend, vorzugsweise auf erhöhten Sitzstangen, auf einem oder auf beiden Beinen erfolgt. Fehlende (z.B. in der Käfighaltung) oder nicht artgerecht angebrachte Sitzstangen verhindern die Ausübung dieses Ruheverhaltens (Sewerin 2002).

Komfortverhalten

Eine besondere Form des Komfortverhaltens stellt das Sandbaden dar. Das Sandbaden ist vor allem in der Käfighaltung eingeschränkt, da es an Sand und Erde fehlt und das Platzangebot beschränkt ist. Viele Tiere führen stattdessen das Sandbadeverhalten am Futtertrog auf dem Drahtgitterboden des Käfigs aus (Sewerin 2002). Dieses Leerlaufbaden („Futterbaden“) wird als Verhaltensstörung gewertet (Olsson 2001) und führt zudem zu Gefiederschädigungen. Bei Haltungsformen ohne direkter Sonneneinstrahlung ist auch das Sonnenbaden nicht möglich (Stern 2001).

Zu diesem Grundbedürfnis heißt es in der Empfehlung des Ständigen Ausschusses des Europarates: „Haushühner weisen, wenn sie die Gelegenheit haben, ebenfalls die gleiche breite Palette an Komfortverhalten wie ihre Vorfahren, die Bankivahühner, auf.....die Motivation, im Staub zu baden ist nach wie vor besonders stark, selbst bei Tieren, die auf Drahtgitterböden gehalten werden und sie besteht auch bei Tieren, die frei von Ektoparasiten sind...“

Nestverhalten

Das angeborene Verhalten der Eiablage ist mit einem hoch differenzierten Verhaltensablauf, der in vier Phasen gegliedert ist, verbunden (Fölsch 1981).

Das Nestverhalten der Hühner ist vor allem in der Käfighaltung durch fehlende Nester und fehlendes Einstreu sowie durch den Gitterboden nicht möglich. Es treten daher in der Käfighaltung, aber auch in Systemen mit ungeeigneten Eiablageplätzen Fehlverhalten wie starke Unruhe, stereotypes Herumlaufen – ein Zeichen der Frustration – (Duncan 1970; Kite 1985) verstärktes Flucht- und Aggressionsverhalten sowie verzögerte Eiablage auf. Die Eier werden teilweise außerhalb des Nestes gelegt. Manche Eier werden auch von der Sitzstange aus gelegt, was zu Kloakenkannibalismus führen kann (Martin 1990; Keppler et al. 2001).

Zu diesem Grundbedürfnis heißt es in der Empfehlung des Ständigen Ausschusses des Europarates: „Alle Hennen zeigen Elemente normalen Nist-, und Eiablageverhaltens.....das gesamte Repertoire wird nur gezeigt, wenn ein angemessener Nestplatz wie zum Beispiel ein abgeschlossenes Nest zur Verfügung steht. Ist dies nicht der Fall, so treten diese Verhaltensweisen in abgeschwächter Form auf und Verhaltensanomalien, wie zum Beispiel langes stereotypes Herumlaufen, können auftreten.“

Sozialverhalten

Aus der Literatur ist bekannt, dass Hühner sozialen Kontakt benötigen (Peitz und Peitz 2002). Grundsätzlich unterscheidet man beim Sozialverhalten zwischen freundlichen und kämpferischen Auseinandersetzungen. Unter natürlichen Bedingungen halten die Hühner eine Sozialdistanz zu einander ein, die je nach Aktivität variiert (Appleby et al. 1992). Wird die Hühnerhaltung zu eng, treten aggressive Verhaltensformen bedingt durch den resultierenden Stress und die fehlende Sozialdistanz wesentlich häufiger auf (Bogner und Grauvogl 1984; Keeling und Duncan 1989; Peitz und Peitz 2002).

Beachtenswert in der sozialen Gruppenstruktur ist auch die klare Hierarchie einer Hühnerherde. Diese so genannte „Hackordnung“ verändert sich entsprechend dem körperlichen Zustand der Hühner (z.B. Geschlecht, Alter, Gewicht,

Krankheit u.s.w.). In einer stabilen Herde wird die Rangordnung durch Drohen und gelegentliches Hacken aufrechterhalten und bestätigt. Aggressive Auseinandersetzungen werden in kleinen artgerecht gehaltenen Herden selten beobachtet (Stern 2001; Peitz und Peitz 2002).

3.5 Haltungstechnologien – Entwicklung und Vergleich

Ursprünglich diente das Huhn einem einfachen Zweck – es versorgte die Familie mit frischen Eiern und Fleisch. Mit der Industrialisierung und der Entstehung von städtischen Ballungsgebieten mussten für die Nahrungsversorgung der Bevölkerung andere Maßstäbe gesetzt werden. Waren früher für Hühner extensive Haltungsformen vorherrschend, gelangten in den fünfziger Jahren Berichte aus den Vereinigten Staaten von Amerika nach Europa und ließen deutliche Vorzüge der intensiven Bodenhaltung erkennen. Gleichzeitig stieg das Angebot an amerikanischen Hybridhennen, die den einheimischen Rassen in ihren Leistungseigenschaften überlegen waren. Dies förderte die Bereitschaft der Hühnerhalter von der extensiven Haus- und Hofhühnerhaltung auf intensive Stallbodenhaltung – im Regelfall ohne Auslauf - umzustellen. Diese Ställe wiesen allerdings den eklatanten

Mangel auf, dass sie im Herbst und Winter zu feucht und kalt wurden. Die Folge waren Gesundheitsstörungen, Parasitenbelastungen und schlechte Leistungen (Tüller 1990).

Als eine Lösung der Probleme wurde Anfang 1960 die Käfighaltung verstanden. Die Darminfektionen verbreitende Bodentiefstreu wurde durch Drahtböden ersetzt, die die Exkremate durchfallen ließen und somit die bedeutendste Infektionsquelle beseitigten. Vor allem in der Legehennenhaltung wurde die Intensivierung in der Käfighaltung sehr vorangetrieben, so dass in den neunziger Jahren ungefähr 70-80% der im Handel verkauften Eier aus dieser Haltungsform stammten.

Grundsätzlich wird zwischen den Haltungsformen Käfighaltung, ausgestaltete Käfighaltung, Bodenhaltung, Volierenhaltung und ökologische Geflügelhaltung / Freilandhaltung unterschieden (Tauson 1984; Henk 1987; Tüller 1990; Rauch 1994; Sherwin 1994; Arbeitsgruppe Geflügel des Schweizer Tierschutz 1995; Beratung artgerechte Tierhaltung 1995; Appleby 1998).

3.5.1 Käfighaltung

Die Käfighaltung in ihrer konventionellen Form ist aufgrund des eingeschränkten Sozial-, Nahrungsaufnahme-, Fortbewegungs-, Ruhe-, Komfort- und Nestverhalten sowie der

Verursachung von Gesundheitsstörungen als nicht tiergerecht zu klassifizieren. So kommt es wegen des Platzmangels und der hohen Besatzdichte in den einzelnen Käfigen vermehrt zu aggressiven Auseinandersetzungen, die meist nicht so ausgeprägt sind, da die Tiere durch die enorme Enge gehemmt sind ("over-crowding"). Hühner in der Käfighaltung sind in ihrem arttypischen Verhalten stark eingeschränkt: Beeinträchtigungen sind begründet durch die Bodenbeschaffenheit des Käfigs, das Fehlen von Nest, Sandbad sowie Möglichkeiten zum Aufbaumen, die unstrukturierte Umgebung und das Fehlen von manipulierbarem Material außer dem Futter. Die Hühner sind weiters nicht in der Lage, ihren natürlichen Scharr- und Picktrieb auszuleben. Es kommt zu Verhaltensstörungen wie Ersatzscharren an der Futterrinne oder Federpicken (Staack und Knierim 2003).

Die Europäische Union legt ab 1. Januar 2003 in ihrer Richtlinie 1999/74/EG des Rates vom 19. Juli 1999 folgende Mindestanforderungen zum Schutz von Legehennen in der Käfighaltung fest:

- Den Legehennen muss eine uneingeschränkt nutzbare und horizontal bemessene Käfigfläche von mindestens 550 cm² je Tier und ein uneingeschränkt nutzbarer Futtertrog (10 cm pro im Käfig befindlichen Tier) zur Verfügung stehen.

- Sofern keine Nippeltränken oder Trinknäpfe vorhanden sind, muss jeder Käfig mit einer Rinnentränke gleicher Länge wie der oben erwähnte Futtertrog ausgestattet sein.
- Es muss bei über 65% der Käfigfläche eine Mindesthöhe von 40 cm eingehalten werden.
- An keiner Stelle darf die Käfighöhe unter 35 cm liegen.
- Der Boden der Käfige muss so beschaffen sein, dass die nach vorne gerichteten Krallen beider Ständer nicht abrutschen können.
- Der Neigungswinkel des Bodens darf 14% nicht überschreiten (außer der Boden besteht nicht aus rechteckigem Drahtgitter).
- Geeignete Vorrichtungen zum Kürzen der Krallen müssen vorhanden sein.

Im Sinne dieser Richtlinie ist der Bau und die Erstinbetriebnahme von Käfigen ab 1. Januar 2003, die Haltung von Legehennen in derartigen Käfigen ab 1. Januar 2012 verboten.

3.5.2 Ausgestaltete Käfighaltung

Als Alternative zur konventionellen Käfighaltung wurden in den letzten Jahren ausgestaltete Käfige entwickelt (Tauson 1984; Rauch 1994; Sherwin 1994; Appleby 1998), doch auch diese weisen erhebliche Mängel auf und sind als nicht artgerecht zu bezeichnen. Eine ungehinderte Fortbewegung ist

in der für jede Henne vorgesehenen Käfigfläche und Raumhöhe nicht möglich. Verhaltensformen wie das Gehen, Laufen, Rennen, Flattern und Fliegen benötigen wesentlich mehr Platz als in einem solchen Käfig angeboten wird. Die ungefähr 6 cm über dem Boden angebrachten Sitzstangen behindern die Fortbewegung zusätzlich (Fölsch 1981; Appleby et al. 1992; Baxter 1994). Den Funktionskreisen des Nahrungserwerbs-, Ruhe-, Nestbau-, Komfort-, und Sozialverhaltens wird in ausgestalteten Käfighaltung vor allem ob der großen räumlichen Enge nicht Rechnung getragen. Daraus resultieren Verhaltensanomalien wie das Feder- und Kloakenpicken durch fehlende nahrungsbezogene Beschäftigung (Martin 1984 und 1990; Blockhuis 1986 und 1989; Baum 1995; Huber-Eicher und Wechsler 1998; Huber-Eicher und Sebö 2001), Futterbaden als Ersatz für das Sandbaden und eine erhöhte Aggressions- und Fluchtbereitschaft bedingt durch die räumliche Enge und fehlende oder ungeeignete Nestplätze. Weiters begünstigen die Sitzstangen, die nur wenige Zentimeter über dem Boden angebracht sind, das Bepicken der Kloake durch andere Hennen (Moinard et al. 1998).

Die Europäische Union legt ab 1. Januar 2002 in ihrer Richtlinie 1999/74/EG des Rates vom 19. Juli 1999 folgende Mindestanforderungen zum Schutz von Legehennen in ausgestalteten Käfigen fest:

- Den Legehennen müssen mindestens 750 cm² Käfigfläche je Tier, davon 600 cm² nutzbare Fläche zur Verfügung stehen.
- Die Käfighöhe an jeder Stelle außerhalb der nutzbaren Fläche muss mindestens 20 cm betragen.
- Die gesamte Käfigfläche darf nicht weniger als 2000 cm² betragen.
- Jeder Käfig muss mit einem Nest, Einstreu, die das Picken und Scharren ermöglicht, geeigneten Vorrichtungen zum Kürzen der Krallen und Sitzstangen mit einem Platzangebot von mindestens 15 cm je Henne ausgestattet sein.
- Es müssen ein uneingeschränkt nutzbarer Futtertrog, dessen Länge mindestens 12 cm multipliziert mit der Zahl der im Käfig befindlichen Hennen beträgt, und eine der Gruppe angemessene Tränkvorrichtung vorhanden sein.
- Zur Erleichterung der Tierkontrolle, Käfigbeschickung und Käfigräumung müssen die Gänge zwischen den Käfigreihen mindestens 90 cm breit sein.
- Der Abstand zwischen dem Boden des Gebäudes und den unteren Käfigreihen muss mindestens 35 cm betragen.

3.5.3 Bodenhaltung

Zur Intensivierung der Produktion wurde die Bodenhaltung entwickelt. Der Marktanteil der Eier aus Bodenhaltung liegt bei etwa 10 %. An diese Haltungsform sind folgende Ansprüche zu stellen, um die Tiergerechtheit zu gewährleisten:

- Nicht mehr als 5 Tiere pro m² um ausreichend Platz zur Bewegung und Flucht sicher zu stellen.
- Bedeckung von mindestens einem Drittel der Stallbodenfläche mit Stroh oder einem ähnlichen Material um den Hühnern eine weiche und warme Unterlage zu schaffen in der sie auch scharren können.
- Kotsammelplätze, vor allem unter den Sitzstangen.
- Mindestens ein Nest für 5 Tiere um Legehennen genügend Rückzugsmöglichkeiten bei der Eiablage zu bieten.
- Sitzstangen in unterschiedlichen Höhen, die allen Hühnern gleichzeitig Platz bieten.
- Ausreichend Tränken und Fressplätze.
- Ausreichend Tageslicht durch genügend große Fenster.

Sind all diese Anforderungen erfüllt, ist von einer im Wesentlichen tiergerechten Haltungsform zu sprechen. Die für die Tiergesundheit und das Wohlbefinden bedeutende Bewegung im Freien ist jedoch nicht möglich. Werden diese Anforderungen nicht erfüllt, oder treten Mängel wie zu hohe Besatzdichten im Stall, mangelnde Einstreu, Nester, Sitzstangen, Tränken und Fressplätze oder fehlendes Tageslicht auf, resultieren erhebliche Einschränkungen der Bewegungsfreiheit, des Ruheverhaltens, des Komfortverhaltens und des Nestverhaltens. Weiters kommt es, bedingt durch eine zu hohe Besatzdichte zum gegenseitigen Bepicken, oder sogar zum Kannibalismus, nicht tiergerechte Sitzstangen können

Fußballengeschwüre zur Folge haben und das Risiko von parasitären Infektionen ist durch verschmutzte Einstreu in mangelhaft geführten Betrieben sehr hoch.

Die Europäische Union legt ab 1. Januar 2002 in ihrer Richtlinie 1999/74/EG des Rates vom 19. Juli 1999 folgende Mindestanforderungen zum Schutz von Legehennen in der Bodenhaltung fest:

- Die Besatzdichte darf nie mehr als 9 Legehennen pro m² nutzbare Fläche betragen; eine Ausnahme sind Betriebe in denen die nutzbare Fläche der verfügbaren Fläche entspricht. In solchen Fällen ist bis zum 31. Dezember 2011 eine Besatzdichte von 12 Tieren pro m² erlaubt.
- Pro Henne sind 250 cm² Einstreufäche vorzusehen.
- Der Einstreubereich muss mindestens ein Drittel der Stallbodenfläche umfassen.
- Den Legehennen müssen Längsfuttertröge von mindestens 10 cm Länge pro Tier oder Rundfuttertröge von mindestens 4 cm Länge pro Tier und Rinnentränken von mindestens 2,5 cm Länge pro Tier oder Rundtränken von mindestens 1 cm Länge pro Tier, beziehungsweise eine Nippeltränke oder Trinknapf für jeweils 10 Hennen, zur Verfügung stehen.
- Es muss mindestens ein Einzelnest für 7 Hennen bereitgestellt werden.

- Werden Gruppennester verwendet, so ist für maximal 120 Hennen mindestens 1 m² Nestfläche vorzusehen.
- Geeignete Sitzstangen ohne scharfe Kanten und mit einem Platzangebot von mindestens 15 cm pro Henne sind so anzuordnen, dass sie sich nicht über dem Einstreubereich befinden und der horizontale Abstand zur nächsten Sitzstange mindestens 30 cm, der zur Wand mindestens 20cm beträgt.
- Wie bei der Käfighaltung muss auch in dieser Haltungsform der Boden so beschaffen sein, dass die nach vorne gerichteten Krallen beider Ständer nicht abrutschen können.

3.5.4 Volierenhaltung

Diese Haltungsform wurde vor allem in den letzten Jahren vermehrt weiterentwickelt um eine wirtschaftlich tragbare und dennoch tiergerechte Alternative zur Käfighaltung zu bieten. Es handelt sich bei dieser Haltungsform um eine Bodenhaltung auf mehreren Ebenen. Es werden Futter- und Tränkautomaten sowie Scharräume in unterschiedlichen Höhen angebracht, wobei es den Hühnern möglich ist, sich auf allen Ebenen frei zu bewegen. Für die Beurteilung der Tiergerechtigkeit der Volierenhaltung gelten die gleichen Prinzipien wie bei der Bodenhaltung, da in dieser Haltungsform ähnliche Mängel auftreten können. Werden die Stalleinrichtungen entsprechend den Bedürfnissen der Tiere angelegt und wird die Besatzdichte

nicht erhöht, ist die Volierenhaltung als im Wesentlichen tiergerecht anzusehen. Bei guter Ausführung, ist sie sogar besser einzustufen als die Bodenhaltung.

Die Europäische Union legt ab 1. Januar 2002 in ihrer Richtlinie 1999/74/EG des Rates vom 19. Juli 1999 folgende Mindestanforderungen zum Schutz von Legehennen in der Volierenhaltung fest:

Es gelten in dieser Haltungsform dieselben Mindestanforderungen wie auch bei der Bodenhaltung. Darüber hinaus dürfen allerdings nur vier Ebenen über einander angeordnet sein, diese aber so, dass kein Kot auf die darunter liegenden Ebenen durchfallen kann; der Abstand zwischen den Ebenen muss mindestens 45 cm lichte Höhe betragen. Weiters müssen alle Fütterungs- und Tränkeanlagen so verteilt sein, dass alle Tiere gleichmäßigen Zugang haben.

Sowohl bei Bodenhaltungs- als auch Volierenhaltungssystemen in denen die Legehennen einen Auslauf ins Freie erhalten sind folgende Mindestanforderungen vorgeschrieben:

- Mehrere Auslauföffnungen (mindestens 35 cm hoch und 40 cm breit) müssen unmittelbar Zugang nach außen gewähren und über die gesamte Länge des Gebäudes verteilt sein.
- Pro Gruppe von 1000 Hennen muss in jedem Fall eine Öffnung von insgesamt 2 m zur Verfügung stehen.

- Der Auslauf muss so beschaffen sein, dass er Unterschlupfmöglichkeiten zum Schutz vor widrigen Wetterbedingungen und Raubtieren bietet.
- Bei Bedarf müssen geeignete Tränken angeboten werden.

3.5.5 Ökologische Geflügelhaltung / Freilandhaltung

Diese Haltungsform ist als die der ursprünglichen Haltungsform am ähnlichsten anzusehen. Artgerechte Auslaufhaltung, eine leistungsfähige ökologische Erzeugung und gesunde Tiere sind die drei Ziele in der ökologischen Geflügelhaltung, bei der die Hühner sowohl im Stall (meist in einer Boden-, in seltenen Fällen in einer Volierenhaltung) als auch tagsüber im Auslauf gehalten werden. Die rechtlichen Rahmenbedingungen werden sowohl durch die EU, als auch von einzelnen Verbänden (zum Beispiel AGÖL, BIOLAND, BIO SUISSE und ERNTE) angegeben.

Seit 1999 wird die ökologische Hühnerhaltung von der Verordnung (EG) 1804/99 in allen europäischen Ländern einheitlich geregelt und beschreibt folgenden gesetzlichen Mindeststandard an die Haltungsanforderungen:

- Den Hühnern muss stets Auslauf gewährt werden, wenn die klimatischen Bedingungen es erlauben.
- Soweit möglich, sollte der Auslauf mindestens während eines Drittels der Lebenszeit frei zugänglich sein.

- Die Ausläufe müssen größtenteils begrünt sein und es sind entsprechende Ruhezeiten zur Erholung der Vegetation einzulegen.
- Dem Schutzbedürfnis der Hühner ist durch Bäume und Sträucher Rechnung zu tragen.
- Es muss ständig freier Zugang zu Futtertrögen und Tranken in ausreichender Menge bestehen.
- Die Außenfläche pro Tier muss mindestens 4 m² betragen.
- Im Stall dürfen bei Legehennen 6 und bei Mastgeflügel 10 Tiere (bzw. 21 kg) pro m² nicht überschritten werden.
- Die Haltung in Käfigen ist nicht erlaubt.
- Erfolgt eine künstliche Zusatzbeleuchtung im Stall, ist eine Lichtphase von 16 Stunden und eine Dunkelphase von 8 Stunden (ohne Unterbrechung) einzuhalten.
- Ein Drittel der Bodenfläche muss aus einem festen, nicht perforierten Untergrund bestehen und mit Einstreumaterial versehen sein.
- In Legehennenställen ist eine Kotgrube vorzusehen.
- Bei der Haltung von Legehennen sind allen Tieren Sitzstangen zur Verfügung zu stellen.
- Als Verbindung zwischen Stall und Auslauf müssen je 100 m² Stallfläche Ein- und Ausgangsluken von insgesamt 4 laufenden Metern vorhanden sein.
- Die Obergrenze der Tierzahl je Geflügelstall beträgt bei Hühnern 4800 Tiere und bei Legehennen 3000 Tiere.

- Die maximale Gesamtstallfläche je Produktionseinheit bei der Fleischerzeugung ist 1600 m².

Vergleicht man alle Haltungsformen im Lichte des Tierschutzes, scheint die korrekt durchgeführte ökologische Geflügelhaltung bzw. die Freilandhaltung die tiergerechteste zu sein, da sie es den Hühnern ermöglicht, ihr natürliches Verhalten mehr oder weniger uneingeschränkt auszuüben. So beobachtete Sewerin (2002), dass in der ausgestalteten Käfighaltung im Vergleich zur Freilandhaltung die Dauer des Sandbadens um etwa die Hälfte verkürzt ist und bestimmte Drehbewegungen gar nicht ausgeführt werden. Im Freiland wird das Sandbaden im Durchschnitt von ungefähr 20 Tieren gleichzeitig ausgeführt, im ausgestalteten Käfig ist ein gemeinsames Bad unter Schwierigkeiten maximal zwei Tieren möglich, während das Sandbaden in der konventionellen Käfighaltung gänzlich ausbleibt. Zusätzlich bestehen in Haltungsformen mit beengten Platzverhältnissen nur sehr eingeschränkte Möglichkeiten zu synchronem Verhalten gemeinsam mit den anderen Hennen, wie es unter naturnahen Bedingungen in der alternativen Haltung vor allem beim Sandbaden (Veestergaard 1981; Veestergaard et al. 1990; Duncan et al. 1998), bei der Nahrungsaufnahme (Hughes 1971) und der Gefiederpflege beobachtet werden kann. Auch dies hat negative Auswirkungen auf das Sozialverhalten und resultiert darin, dass Verhaltensstörungen, wie sie oft in der Boden- und

Käfighaltung auftreten, in der Freilandhaltung wesentlich seltener vorkommen (Fölsch 1981; Staack und Knierim 2003). Die Volierenhaltung stellt hingegen einerseits eine Alternative zur Käfighaltung, andererseits einen Mittelweg zwischen Boden- und Freilandhaltung dar und kommt dem Bestreben, Hühnerhaltungsformen artgerechter zu gestalten entgegen.

3.6 Stressoren

Der Begriff „Stress“, abgeleitet von dem englischen Wort „Disstress“ (Qual, Erschöpfung) stellt ein generelles Reaktionsmuster auf eine erhöhte Belastung dar. Diese Belastungen werden als „Stressoren“ bezeichnet und gliedern sich in physische und psychische sowie anthropogene und natürliche Stressoren.

Zu den physischen Stressoren gehören physikalische Ursachen (Hitze, Kälte, Zugluft, Lärm und grelles Licht), chemische Schadstoffe in der Luft (Ammoniak und Schwefelwasserstoff) oder im Futter (Pestizide, Schwermetalle, Pilzbefall, Dioxine u.s.w.), medizinische Stressoren durch Krankheiten oder Parasitenbefall und Technopathien.

Psychische Stressoren treten überwiegend in unzureichenden Haltungssystemen, vor allem in der Intensivhaltung auf und

resultieren daraus, dass die Hühner in ihrem natürlichen Verhalten gestört sind. Es kommt zu einer gravierenden Einschränkung des Nahrungsaufnahmeverhaltens, da die Hühner ihren Scharr- und Picktrieb nicht ausleben können, des Fortbewegungsverhaltens durch enge Haltungsformen, des Ruheverhaltens wenn es an Sitzstangen mangelt, des Komfortverhaltens durch fehlende Möglichkeiten zum Sand- und Sonnenbaden, des Nestverhaltens wenn es an Nestern zur Eiablage fehlt (vor allem in der Käfighaltung) und des Sozialverhaltens, da es in engen Haltungsformen zu einem „Crowding effect“ mit aggressiven Auseinandersetzungen wie Federpicken, Kämpfen oder Kannibalismus kommt.

Vor allem Technopathien, Stressoren die durch mangelhafte Haltungssysteme entstehen und psychische Stressoren zählen zu den anthropogenen (vom Menschen verursachten) Stressoren. Zu den natürlichen Stressoren zählen wir Umwelteinflüsse wie Attacken durch natürliche Feinde oder Wetterumschwünge.

3.7 Stressphysiologie

Stress ist die unspezifische Reaktion des Organismus auf jede Herausforderung. János Selye beschrieb dieses Reaktionsmuster bereits 1936 und betitelte es als das „Allgemeine Adaptationssyndrom“ (A.A.S. oder englisch: „General

Adaptation Syndrome“, G.A.S.), welches die Reaktion des Körpers auf einen Stressor beschreibt. Das A.A.S. gliedert sich in

1. die Alarmreaktion mit Schocksymptomen und deren teilweiser Rückbildung in der Gegenschock-Phase,
2. die Resistenz- oder Widerstandsphase die durch Eosinopenie, polymorphkernige Leukozytose, thymolymphatische Involution und Anpassung der Bindegewebsreaktion gekennzeichnet ist und
3. das Erschöpfungsstadium, in dem die Kompensation des Stresses nicht mehr möglich ist und es zu einem tödlichen Zusammenbruch der Adaptation durch Nebennierenrindenversagen als Folge von zu schwerem oder lange andauerndem Stress kommt.

Die drei Symptome der Stress Trias (Vergrößerung der Nebennieren, Atrophie des lymphatischen Gewebes und gastrointestinale Ulzera), die in Zusammenhang mit dem A.A.S. auffällig sind, sind durch die Mobilisierung des sympathischen Nervensystems bedingt und werden durch die Freisetzung von Katecholaminen und die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA Achse) verursacht.

Es kommt durch die Einwirkung eines Stressors zu einer Kaskade an Ereignissen, die sowohl das neurogene als auch das HPA System mit einbezieht (Abb. 2 und 3).

Abb. 2

Stress – Neurogenes System

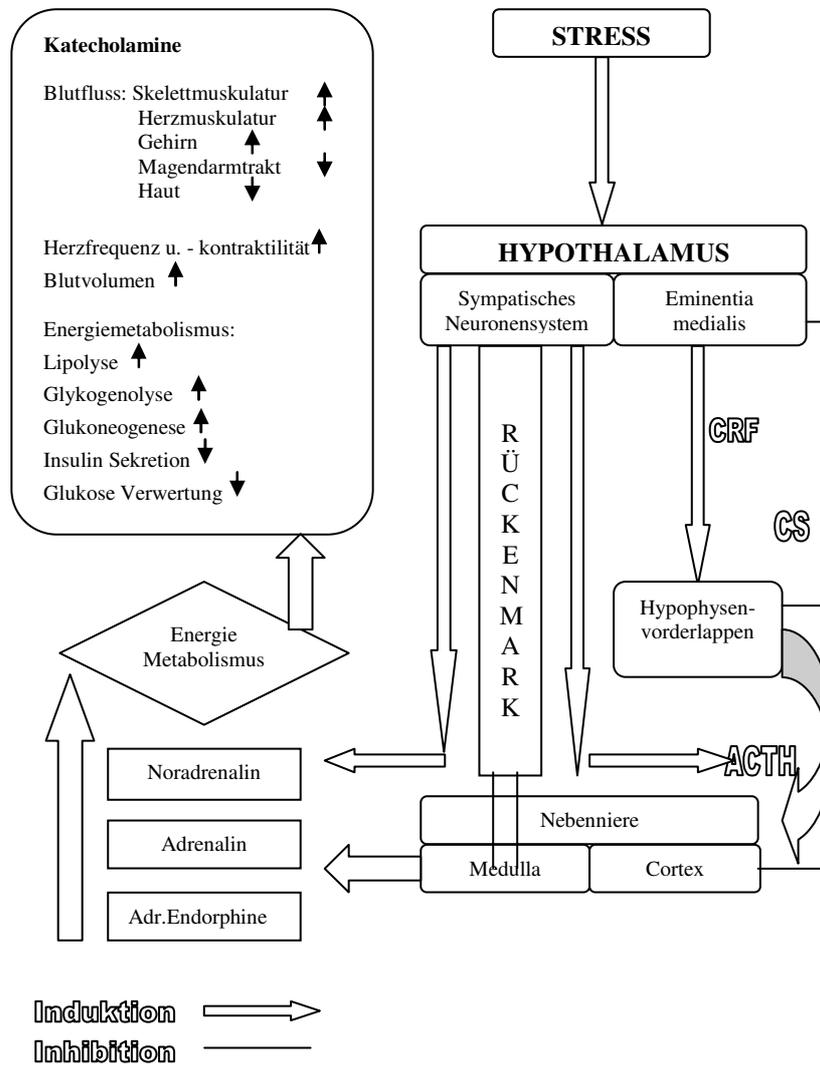
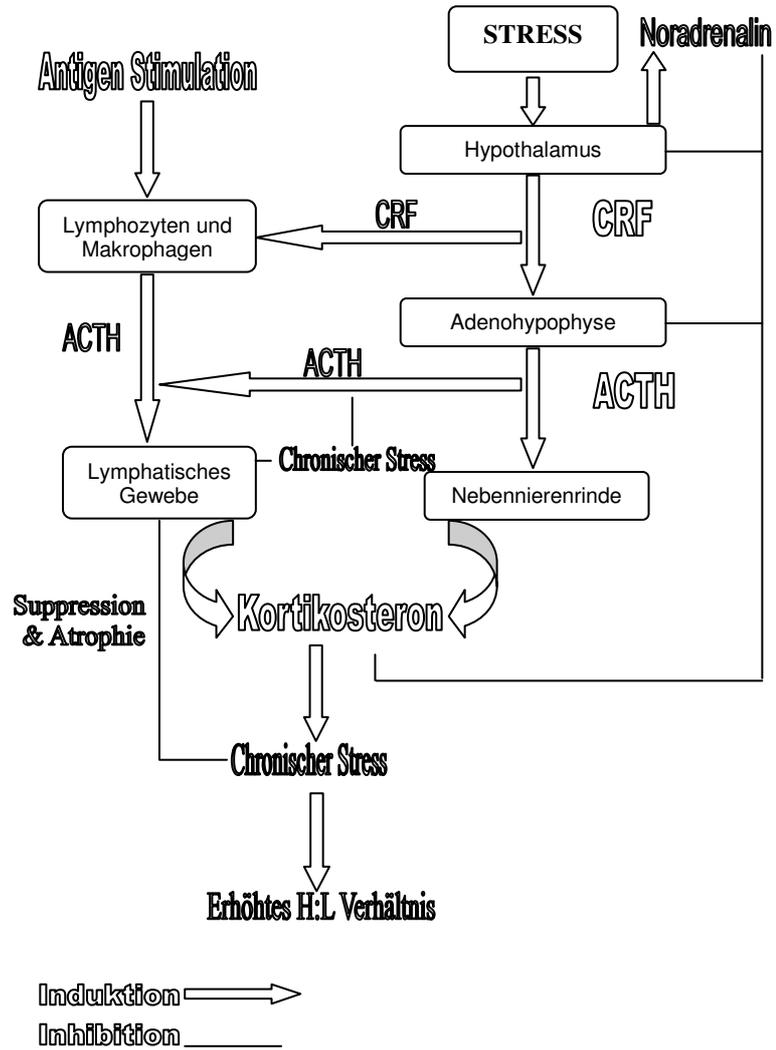


Abb. 3

Stress – HPA Achse



Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Nebenniere, die nicht, wie bei Säugetieren in klar definierte Zonen aufgeteilt ist. Dennoch ist die Nebenniere der Hühner mit der der Säugetiere vergleichbar – kortikale Hormone werden von dem kortikalen Gewebe, medulläre Hormone von den Chromaffinzellen ausgeschüttet. So schafft die Nebenniere durch ihre vielfältige Kontrollfunktion eine Kooperation zwischen dem endokrinen -, nervalen - und dem Immunsystem (Ganong 1963, Siegel 1985, Hendricks et al. 1991).

Die Aktivierung des neurogenen Systems ist durch den Begriff „Fight or Flight“ (Cannon 1929) geprägt und stellt einen Versuch des Körpers dar, den Stressor zu vermeiden oder zu bekämpfen, nicht aber sich ihm anzupassen. Es kommt zu einer vermehrten Ausschüttung von neurogenen Aminen (Katecholaminen), nämlich Noradrenalin (aus den postganglionalen Nervenenden) und Adrenalin (aus den Chromaffinzellen der Nebenniere), die vor allem auf das kardiovaskuläre System wirken. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Chromaffinzellen sowohl Adrenalin als auch Noradrenalin enthalten. Allerdings werden diese beiden Hormone in unterschiedlichen Zelltypen, deren Proportion zu einander von Huhn zu Huhn verschieden ist, produziert (Gosh 1980). Wird das sympathische Nervensystem zum Beispiel durch Stress stimuliert, resultiert daraus eine Ausschüttung von Katecholaminen aus den Chromaffinzellen.

Ein schneller Anstieg des Blutdrucks und Hypervolämie durch eine periphere Vasokonstriktion, eine Erhöhung des Herzminutenvolumens, Muskeltonus, Blutzuckers (vor allem durch Lipolyse und Glykogenolyse) und der Atemfrequenz sind die Konsequenz (Downing und Bryden 2002), wobei die Ausprägung der Katecholaminantwort nicht von der Schwere des Stress abhängt (Lahiri 1982). Diese Hormone werden als Folge eines schädlichen Stimulus binnen Sekunden in hohen Konzentrationen ausgeschüttet.

Die Mobilisierung des neurogenen Systems schützt das Tier indem sie vegetative und reproduktive Prozesse zu Gunsten der Freisetzung von Energiereserven unterdrückt und die Immunabwehr durch die Stimulierung der Adenyl Cyclase Aktivität der Leber und den Anstieg der Antikörper stärkt (Freeman und Manning 1976; Siegel 1980). Weiters resultiert durch die Freisetzung der Katecholamine eine Stress induzierte Analgesie, für die hauptsächlich β - Endorphine aus dem Gehirn und dem Nebennierenrindengewebe verantwortlich sind.

Bei länger andauerndem Stress spielt vor allem die Aktivierung der HPA –Achse eine wesentliche Rolle. Sie beginnt mit der Stimulation des Hypothalamus und einer subsequenten Freisetzung des Corticotropin Releasing Factor (CRF), der die Produktion des Hormons Adrenokortikotropin durch die Adenohypophyse anregt. In der Folge kommt es in der

Nebennierenrinde zur Bildung von Kortikosteroiden (CS), bei Vögeln vor allem Kortikosteron. Diese bewirken neben Veränderungen des Glukose und Mineralmetabolismus auch die mit Langzeitstress verbundenen Symptome wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Hypercholesterinämie, gastrointestinale Ulzera, lymphatische Involutionen und Nephritis.

Doch auch akuter Stress führt zu einer deutlichen Erhöhung des Kortikosteron Spiegels. In diesem Zusammenhang wird Kortikosteron als der primäre regulierende Faktor von erfolgreichen physiologischen und verhaltenstechnischen Stressantworten gewertet. Zum Beispiel führt Kortikosteron in akuten Stresssituationen durch die Mobilisierung von Glukose durch Proteinabbau und Glukoneogenese zur Erhöhung des Blutzuckerspiegels (Romero 2004).

Ein weiteres Merkmal der Kortikosteron Sekretion ist, dass sie diskontinuierlich ist. Zusätzlich zu der basalen Freisetzung erfolgt eine episodische Freisetzung – es kommt zu vorübergehenden Sekretionsschüben, die sich in unregelmäßigen Zeitintervallen wiederholen (Döcke 1994; Ladewig 1994). Diese episodische Ausschüttung des Kortikosterons wird beim Geflügel zusätzlich von einer zirkadianen Rhythmik überlagert (Beuving und Vonder 1977; Wilson et al. 1982; Kovacs und Peczely 1983). In diesem Zusammenhang wurde bei Wachteln, Legehühnern und Tauben

ein deutlicher Tagesrhythmus nachgewiesen, obwohl die Funktion desselben nach wie vor unklar bleibt (Beuving und Vonder 1977; Höhn 1983; Harvey et al. 1986; Breuner et al. 1999).

Hinzu kommt, dass die Kortikosteron Freisetzung großen Schwankungen sowohl zwischen einzelnen Individuen in derselben Stresssituation als auch zwischen verschiedenen Stresssituationen unterliegt. So zeigen manche Individuen als Reaktion auf einen Stressor nur einen minimalen Kortikosteron Anstieg während andere auf denselben Stressor mit einer deutlichen Erhöhung des Kortikosteronspiegels reagieren. Individuelle Kortikosteron Reaktionen sind in der Regel aber konstant. Es wird daher vermutet, dass die adrenokortikale Empfindlichkeit und in Folge auch die Höhe der Kortikosteron Ausschüttung genetisch bedingt sind, wie bereits im Falle der Japanischen Wachtel nachgewiesen (Satterlee und Jones 2004). Variationen in der Kortikosteron Antwort mögen aber dennoch auch von physischen und metabolischen Parametern wie dem Gesundheitszustand, oder bei psychischen Stressoren von der individuellen Einschätzung der Situation abhängen (Cockrem 2004).

Bei Vögeln sind 80 - 90% der zirkulierenden CS an Corticosteroid Binding Globuline (CBG) gebunden wobei nur ungebundene CS die Zellmembran durchdringen und ihre

Wirkung entfalten können. Siegel (1995) beschreibt in diesem Zusammenhang einen Kontrollmechanismus: Es wird vermutet, dass CBG im Plasma sowohl die Verfügbarkeit als auch die Halbwertszeit der CS reguliert und als „Feinregulator“ der Kortikosteron Wirkung dient (Breuner 2004; Lynn et al. 2004). So hemmen hohe Kortikosteroidblutspiegel die Synthese von CBG in der Leber und erhöhen auf diese Weise ihre Wirkung auf den Organismus (Robinson 1990). Weiters haben gebundene CS mit 90 Minuten eine wesentlich höhere Halbwertszeit als ungebundene CS, die eine Halbwertszeit von nur 7,5 Minuten aufweisen.

Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Hypophyse der Vögel nur in geringem Maße der Kontrolle des Hypothalamus unterworfen ist und die Nebenniere selbst der Kontrolle der Hypophyse teilweise entzogen ist und autonom agiert. Weiters sind basale Kortikosteroidspiegel nicht von der Verbindung zwischen den verschiedenen anatomischen Teilen der HPA Achse abhängig. So sind auch extra-hypophysäre Gebiete des Gehirns und aviäre Leukozyten für die Produktion von ACTH und ACTH-ähnlichen Substanzen verantwortlich (Siegel 1995).

Wird ein Tier gestresst, so werden die CS-Rezeptoren im Hypothalamus vermehrt gebunden und es kommt zu einer Unterdrückung der CRF Freisetzung durch negativen Feedback.

Dies lässt schließen, dass die Veränderungen der Endorgane, wie der Anstieg des Heterophil/Lymphozyten Verhältnisses oder die Atrophie des lymphatischen Gewebes bedingt durch die lympholytischen Effekte des ACTH, Indikatoren für chronischen Stress, die Konzentration von CS und Katecholaminen im Plasma aber Parameter für akuten Stress darstellen.

Dauert der Stress an, sinken die hohen CS-Spiegel die durch die Stressoren erzeugt wurden. So nehmen sowohl die basalen als auch die akuten Stress induzierten CS-Spiegel bei Tieren, die einem chronischen Stress Paradigma ausgesetzt wurden ab, obwohl die chronischen Stressoren präsent sind und erreichen einige Wochen nach Beseitigung der chronischen Stressoren wieder den Normalwert (Cyr und Romero 2004).

Die vor allem durch Kortikosteron regulierten physiologischen Veränderungen und Verhaltensänderungen, die durch akuten Stress ausgelöst werden, können helfen, bedrohliche Situationen zu überwinden (Romero 2004). Wenn Stress allerdings andauert und chronisch wird, belasten die daraus folgenden Effekte auf den Energiemetabolismus und die Stress bedingte Immunsuppression den Organismus nachteilig.

CS führen zu einer Glukoneogenese aus labilem Protein und erhöhen so den Glukose Spiegel im Plasma (Siegel 1995) und bewirken einen Anstieg von non protein nitrogen (NPN), einen

verminderten Einbau von Glukose – Kohlenstoff in Proteine (Brown et al. 1958; Nagra und Meyer 1963), die vermehrte Exkretion von Harnsäure (Halliday et al. 1977; Siegel und van Kampen 1984), eine erhöhte Synthese von Fettsäuren sowie eine Steigerung des Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren (Nagra und Meyer 1963), einen Abbau von Muskelprotein zu Gunsten der Fetteinlagerung (Nagra und Meyer 1963; Bartov et al. 1980; Siegel und van Kampen 1984) und eine Störung des Kalziumstoffwechsels, die in Jungtieren die Kalzifikation des Skeletts hemmt und in adulten Hühnern zu Osteoporose führt.

Generell ist weiters zu sagen, dass Hühner, die gravierendem Stress ausgesetzt waren, ihr optimales Gewicht am Ende der Wachstumsperiode nicht erreichen obwohl sie versuchen, Gewichtsverluste durch verstärkte Nahrungsaufnahme zu kompensieren. Dies resultiert aus der reduzierten Leistungsfähigkeit des Gastrointestinaltraktes, die auf die erhöhte Wasseraufnahme bedingt durch die vermehrte Harnsäurebildung und den höheren Harnfluss (Siegel und van Kampen 1984, Elrom 2000) zurückzuführen ist und aus der vermehrten Fettablagerung (Siegel und van Kampen 1984).

Chronischer Stress geht im Gegensatz zu akutem Stress mit einer deutlichen Immunsuppression einher: lang anhaltende oder wiederholt auftretende hohe CS-Spiegel im Blut bewirken

die Reduktion der zirkulierenden Lymphozyten, den Anstieg der heterophilen Granulozyten sowie resultierend den Anstieg des Heterophil/Lymphozyten Verhältnisses, Thymus Involution, Atrophie von Milz und peripheren Lymphknoten sowie eine eingeschränkte Immunantwort (Elrom 2000). Es kommt zu einer Abnahme der Antikörper und der zellmedierten Immunität sowie zu einer Einschränkung der Makrophagenwanderung und Hemmung der Phagozytose durch CS. Die Unterdrückung der Makrophagenfunktion ist einerseits auf die Blockade der für die Phagozytose notwendigen Enzyme und andererseits durch die Hemmung der Sekretion der für die T-Zell – Makrophagen Interaktionen notwendigen Interleukine (IL) zurückzuführen (Siegel 1995). Vor allem IL2, ein Zytokin der T- und Natural Killer Zellen (NK), wird während einer Stressbelastung unterdrückt (Siegel 1995; Tizard 1996). Die Aufgabe des IL2 ist es, die Immunaktivität durch Förderung der T-Zell Teilung und Induktion der Ausschüttung von Mediatoren wie Interferon β (IFN β) (der potenteste Faktor bei der Makrophagenaktivierung und Steuerung des Effekts der MHC II Moleküle auf Gewebezellen) zu stärken. Auch bewirkt IL2 die Teilung und das Wachstum von B-Zellen und induziert die Monozyten und NK Zellen Aktivierung (Roitt et al. 1996; Blood und Studdert 1999).

Um die negativen Auswirkungen von Stress und CS zu vermindern, wurde zunächst bei Wachteln versucht, Linien zu

züchten, die eine niedrigere adrenokortikale Sensibilität aufweisen. Die Selektion auf „LS (Low Stress) Tiere“ resultierte in Individuen, die eine nicht-spezifische Reduktion der Stressantwort auf diverse Stressoren sowie fehlende Kortikosteron Sensibilität aufweisen. Sie zeigen vermindertes Angstverhalten, ausgeprägteres Sozialverhalten, weniger Instabilität in ihrer Entwicklung und höhere Körpermassen sowie frühere sexuelle Reife (Satterlee und Jones 2004).

3.8 Stressparameter und Methoden des Stressnachweises

Als Folge von Stress treten bei Hühnern Verhaltensänderungen sowie physiologische und pathologische Veränderungen auf. Diese Veränderungen bezeichnet man als Stressparameter. Sie bezeichnen quantifizierbare Größen, die in Kombination zur Messung der Stressbelastung verwendet werden können (Stephens 1980; Gross und Siegel 1993).

3.8.1. Verhaltensänderungen und -störungen

- *durch das Haltungssystem*

Werden Hühner in einem ihrer Verhaltensfunktionskreise stark beeinträchtigt, führt dies zumeist zu Stress bedingten Änderungen oder Störungen in ihrem Verhalten. Eine

Einschränkung des Nahrungsaufnahmeverhaltens wie sie in Haltungssystemen ohne Stroh und Einstreu oder durch monotones Futter entsteht, führt zu einem Ersatzscharren in der Futterrinne und Feder-, Kloaken- und Zehenpicken sowie Picken gegen Gitter oder andere Gegenstände (fehlgeleitetes Objekt-picken), da die Hühner ihren Scharr- und Picktrieb nicht ausleben können. Andauernde Reizarmut kann in Kannibalismus resultieren. Auch die Beeinträchtigung des Sozialverhaltens in engen Haltungsformen in denen es zu einem „crowding effect“ kommt geht mit aggressiven Auseinandersetzungen wie Federpicken, Kämpfen oder Kannibalismus einher (Fölsch 1981).

Eine Einschränkung des Fortbewegungsverhaltens durch enge Haltungsformen führt zu einer Serie von Verhaltensstörungen, die vor allem in der Käfighaltung beobachtet werden. Diese beinhalten das Wenden um 180° beim Umhergehen, das Halten des Kopfes durch das Käfiggitter, Gitterlaufen, Drängeln, rotierendes Geschiebe (ein Huhn wird vom anderen weiter geschoben) und Wandlaufen.

Eine Störung des Ruheverhaltens durch mangelnde Sitzstangen und des Komfortverhaltens durch die fehlenden Möglichkeiten zum Sand- und Sonnenbaden führen zu Pseudo - Sandbaden auf dem Boden und Sandbaden in der Futterrinne.

Wird das Nestverhalten beeinträchtigt wenn es (zum Beispiel) an Nestern zur Eiablage fehlt, kommt es zu einer verlängerten Nestplatzsuche, einem leeren Nestscharren und nervösem Gackern (Sambraus 1978; Bogner und Grauvogl 1984; Krienbrock et al. 2003; Staack und Knierim 2003).

- *durch die Umwelt*

Existiert eine fehlende Harmonie zwischen Huhn und Umwelt, resultiert daraus vor allem Angst - ein psychischer Stress, der sich generell durch Panikattacken, Schreckhaftigkeit („Geflügelhysterie“), Polypnoe und Aggression äußert. Als Folge solcher Reaktionen werden Federverlust, Entzündungen, Abszesse, Hautveränderungen, Gelenkluxationen und Knochenbrüche beobachtet.

Auch bewirkt diese Imbalanz einen physischen Stress, der sich ebenfalls in Verhaltensänderungen manifestiert. So kommt es zum Beispiel bei Hitzestress zu Polypnoe, bei Kältestress zu Drängeln und durch zu grelles Licht zu vermehrtem Aggressionsverhalten (Sambraus 1978; Bogner und Grauvogl 1984; Nixey 1994; Sherwin 1998).

3.8.2. Physiologische Stressparameter

Während Verhaltensindikatoren meist als qualitative Parameter zur Erfassung der Stressbelastung herangezogen werden, bieten physiologische Indikatoren quantitative Messdaten. Wir

unterscheiden in diesem Zusammenhang im Blut hämatologische, immunologische, blutchemische und hormonelle Parameter sowie Veränderungen in der tonischen Immobilität und Produktionsleistung.

3.8.2.1. Hämatologische Parameter

Rote Blutkörperchen

Die Evaluierung der aviären Erythrozyten beinhaltet die Bestimmung des Hämatokrit, der Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration, Retikulozytenzahl, Erythrozytenmorphologie und der Berechnung des Mean Corpuscular Volume (MCV). Alle können Indikatoren für Stress verursachende Krankheitsbilder darstellen (Campbell 1995; Altan et al. 2000). Eine Thrombozytopenie kann sowohl auf einen schweren Blutverlust (bedingt durch Kämpfe, Kannibalismus oder Technopathien) als auch auf eine Septikämie hinweisen (Campbell 1995). Bei akutem Stress hingegen, kommt es zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl (Döcke 1994).

H/L Verhältnis

Die Freisetzung von Glukokortikoiden, bei Hühnern zum Großteil Kortikosteron, in Stresssituationen hat einen direkten Einfluss auf das lymphatische Gewebe und somit auf das Differentialblutbild. So führen vor allem längere und häufige

hohe Kortikosteronwerte im Blut zu einer Reduktion der zirkulierenden Lymphozyten und zu einem Anstieg der heterophilen Granulozyten sowie zu einer generellen Reduktion der Immunkompetenz (Elrom 2000). Diese Veränderung des Verhältnisses von Lymphozyten zu Heterophilen scheint in einer linearen Beziehung zu dem Kortikosterongehalt im Blut zu stehen (Gross und Siegel 1983) und bietet einen weiteren Parameter zur Messung der Stressbelastung.

Sowohl psychologische als auch physische Stressoren wie Fasten, sozialer Stress, Wasserentzug, extrem hohe oder niedrige Temperaturen und Beengung haben in einigen Studien nachweislich zu einer Erhöhung des H/L Verhältnisses geführt (Wolford und Ringer 1962; Gross und Chickering 1987; Beuving et al. 1989; Jones 1989; Cravener et al. 1992; Hacking et al. 1993; Bishop und Dhaliwal 1994; Altan et al. 2000; El-Lethey et al. 2000). Auch eine iatrogene Verabreichung von ACTH oder Kortikosteron in diversen Versuchsreihen führen zu einer Erhöhung des H/L Verhältnisses (Puvapolpirod und Thaxton 2000; El-Lethey et al. 2003). Referenzwerte für die Erfassung der Stressbelastung anhand des H/L Verhältnisses sind in Tab. 1 aufgeführt.

Dennoch ist ein limitierender Faktor dieses Stressparameters, dass das H/L Verhältnis nicht notwendigerweise während einer lang andauernden Stressperiode aufrechterhalten wird (Gross

und Siegel 1983; Gross und Siegel 1986; Katanbaf et al. 1988; Maxwell et al. 1990; Zuidhof et al. 1995). Ein weiterer Nachteil ist, dass das H/L Verhältnis sich nicht zur Erfassung von akutem Stress eignet, da sich eine Heteropenie und Basophilie entwickelt (Saleh und Jaksch 1977; Eder 1987; Maxwell et al. 1992; Mitchell et al. 1992; Maxwell 1993; Maxwell und Robertson 1998).

Tab. 1

Referenzwerte für das H/L Verhältnis als Maß für die Stressbelastung nach Gross und Siegel (1993)

Stressgrad	H/L Verhältnis
Geringgradig	0,2-0,3
Optimal	0,5
Erhöht	0,6
Hinweis auf Erkrankung	>1,3

Das H/L Verhältnis normalisiert sich etwa zwei Tage nach Ausschalten der Stresseinwirkung (Gross 1989; Gross und Siegel 1993).

3.8.2.2. Immunologische Parameter

Unter chronischer Stresseinwirkung kommt es, wie bereits beschrieben, zu einer Immunsuppression. Infolge dessen scheint die Fähigkeit der Hühner Antikörper zu bilden ein geeigneter

Parameter zu sein (Thaxton und Siegel 1972; Lölinger et al. 1980). So belegen gezielte Studien von Lölinger et al. (1980), Hester et al. (1996), Boa-Amponsem et al. (2000), El-Lethey (2000) und Erhard et al. (2000), dass sowohl schlechte Hygienebedingungen als auch Stresssituationen einen negativen Effekt auf die humorale Immunantwort und Antikörperbildung haben. Was die zelluläre Immunität betrifft, so führt die iatrogene Verabreichung von Kortikosteron im Futter in der Studie von El-Lethey (2003) nachweislich zu einer tiefen Unterdrückung. Dennoch ist die Analyse der Immunantwort auf ein einziges Antigen als Stressparameter vorsichtig zu bewerten, da neue Studien vermuten lassen, dass Immunreaktionen einem strikten Antigen abhängigen Mechanismus unterliegen (El-Lethey 2003).

3.8.2.3. Blutchemische Parameter

Total Protein

Sowohl eine Dehydratation als auch eine verstärkte katabole Leistung der Leber, wie sie in Stresssituationen beobachtet wird, können zu einem Anstieg des Total Proteins führen (Lösing 1980). Ehinger und Gschwindt (1981) führen die Erhöhung des Gesamteiweißes auf Belastungssituationen zurück und auch eine iatrogene Verabreichung von ACTH führt zu der für Stress typischen Erhöhung des Total Proteins (Siegel 1995; Puvadolpirod und Thaxton 2000).

Glukose

Der Blutglukosewert wird zwar oft als Stressparameter herangezogen, da die Aufrechterhaltung des Blutglukosespiegels für Körperfunktionen entscheidend ist und Regulationsmechanismen unter anderem auch der Ausschüttung von „Stresshormonen“ unterliegen (Puvadolpirod und Thaxton 2000), stellt aber nur begrenzt einen geeigneten Indikator für Stressbelastung dar. So stellen Ehinger und Gschwindt (1981) mit zunehmender Transportdauer eine Hyperglykämie fest, während Freeman (1984) eine Hypoglykämie beobachtet und Warris et al. (1993) keine signifikanten Veränderungen der Glukose bemerken.

Verwendet man Glukose als Stressparameter, ist der Zeitraum zwischen Belastung und Messung entscheidend für die Ergebnisse. Der Glukosespiegel steigt bereits 5-10 Minuten nach Einsetzen des Stressors an und fällt innerhalb von 2 Stunden wieder ab (Broom und Knowles 1989).

Als weitere blutchemische Stressindikatoren, die allerdings selten verwendet werden, gelten Harnstoff und Harnsäure, Kalium, Natrium und Kalzium, Enzyme wie Creatin Kinase (CK), Aspartat Transaminase (AST), Laktat Dehydrogenase und Alkalische Phosphatase (AP) sowie Cholesterin, Triglyzeride und High Density Lipoproteine (HDL).

3.8.2.4. *Hormonelle Parameter*

Katecholamine

Neurogene Amine wie Adrenalin und Noradrenalin werden vor allem in akuten Stresssituationen vom Nierenmark freigesetzt und dienen als „Starter“ für all jene physiologischen Mechanismen die zur Überwindung einer lebensbedrohlichen Situation notwendig sind (Fight or Flight). Der Katecholaminblutspiegel steigt rasch, meist schon während der Blutabnahme an und fällt ebenso schnell wieder ab – er ist daher in den meisten Versuchsanordnungen kein geeigneter Parameter für das Ausmaß der Stressantwort., kann aber durch Enzyme Immunoassay (EIA) bestimmt werden. Indirekte Anzeichen einer erhöhten Katecholaminfreisetzung bieten allerdings messbare Daten, die als Indikatoren für Stress herangezogen werden können, und beinhalten einen Anstieg der Körpertemperatur durch periphere Vasokonstriktion, Erhöhung des Blutdrucks, der Herz- und Atemfrequenz und Anstieg der Blutglukosespiegel durch den Abbau von Leberglykogenreserven (Freeman 1985; Wittmann 1994; Elrom 2000). Downing und Bryden (2002) versuchten in einer Studie eine nicht invasive Methode des Stressnachweises durch die Messung von Katecholaminen im Eiklar mittels HPLC und elektrochemischer Analyse zu entwickeln, kamen aber zu dem

Schluss, dass dieser Parameter als nicht invasiver Stressindikator ungeeignet ist.

Kortikosteroide (CS)

Kortikosteron ist bei Hühnern das wichtigste Steroid der Nebennieren. Andere Glukokortikoide, wie zum Beispiel Kortisol, können nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Die Referenzbereiche für den Plasmakortikosteronwert liegen zwischen 0,4ng/ml (Broom 1990), 0,6ng/ml (Puvadolpirod und Thaxton 2000) und 1-3µg/ml (Hummel 2000). Die Verwendung des Plasmakortikosteronwertes als Stressindikator und seine Quantifizierung mittels Enzyme Immunoassay (EIA) (Dehnhard et al. 2003) oder Radio Immunoassay (Puvadolpirod und Thaxton 2000) wird zur Zeit durch nicht invasive Messtechniken, die Sammelproben darstellen ersetzt, da Kortikosteronwerte im Blut starken Schwankungen unterliegen (Beuving und Vonder 1977; Höhn 1983; Harvey et al. 1986; Döcke 1994; Ladewig 1994), multifaktoriell, zum Beispiel auch durch die Blutabnahme selbst (Beuving 1980; Craig und Adams 1984; Kratsch et al. 1986 und Lagadic et al. 1990), beeinflussbar sind und über einen längeren Zeitraum nicht aufrecht erhalten werden können (Döcke 1994; Puvadolpirod und Thaxton 2000). Alternativen zu der invasiven Messung des Kortikosterons im Blutplasma sind bei Hühnern die nicht invasive Messung im Kot mittels High

Performance Liquid Chromatography (HPLC) und EIA (Palme und Möstl 1997; Möstl und Palme 2002, Carere et al. 2003; Dehnhard et al. 2003) oder RIA (Wasser et al. 2000) sowie im Ei bzw. Eigelb mittels Radioaktivität (Palme et al. 2004), RIA (Downing und Bryden 2002) oder der durch den Autor neu entwickelten Methode basierend auf Flüssigchromatographie und Tandem Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS).

3.8.2.5. *Tonische Immobilität (TI)*

Dies ist ein relativ simpler Stressparameter, der oft herangezogen wird um die Stressbelastung zu evaluieren. Die TI wird induziert, in dem das Huhn auf den Rücken gelegt und 45 Sekunden in dieser Position fixiert wird. Die Dauer der TI und die Zeit, die das Huhn benötigt um sich aufzurichten sowie die Anzahl der Versuche die benötigt werden um eine TI hervorzurufen werden bewertet (El-Lethey et al. 2000). Hühner, die durch fehlende Einstreu oder monotone Fütterung in ihrem Verhalten eingeschränkt und gestresst sind, zeigen in den Studien von Gallup (1979) und El-Lethey et al. (2000 und 2003) eine signifikant längere TI als nicht gestresste Hühner. So kann die Dauer der TI als sensitiver Verhaltensindikator für Stress bei Hühnern angesehen werden.

3.8.2.6. *Veränderungen der Produktionsleistung*

Diese beinhalten Parameter wie Eiproduktion, Eigewicht, Futteraufnahme und –verwertung sowie Gewichtszunahmen und Körpergewicht.

Hughes (1975), Koelkebeck und Cain (1984), Cunningham (1988) und Appleby (1995) beobachteten in diesem Zusammenhang eine verringerte Legeleistung bei Hühnern die durch enge Haltungsformen eine Stressbelastung erfuhren. Weiters liegt die Legeleistung bei Hühnern, die einen Auslauf zu Verfügung haben in der Studie von Roth (2004) um 3,5% über der Legeleistung von Hühnern ohne Auslauf. Das Eigewicht hingegen, ist sowohl Rasse- als auch Stress abhängig. So bewirkt Stress bedingt durch enge Haltungsformen in einigen Rassen vor allem bei jüngeren Tieren eine signifikante Reduktion des Eigewichts, während andere Rassen davon unbeschadet bleiben (Bishop und Purling 1993; Bishop und Dhaliwal 1994).

Auch die Futteraufnahme nimmt in Stresssituationen ab (Hughes 1975; Bishop und Dhaliwal 1994) und wird oft auf die Reduktion der Legeleistung zurückgeführt. Doch existieren auch Studien, die einen Stress bedingten Anstieg der Futteraufnahme beobachteten (Siegel und van Kampen 1984).

Die Gewichtszunahme und das Körpergewicht sind die am häufigsten herangezogenen leistungsbezogenen Stressparameter, wobei vor allem das Ausmaß eines Gewichtsverlusts als Indiz für das Wohlbefinden der Hühner dient (Warris 1996). Da es in Stresssituationen zu einer reduzierten Leistungsfähigkeit des Gastrointestinaltraktes bedingt durch die vermehrte Harnsäurebildung und die resultierende Polydypsie kommt (Siegel und van Kampen 1984) und Stress im Allgemeinen katabole Mechanismen bewirkt, führt eine Stressbelastung zu einem Gewichtsverlust bzw. langsamerem Wachstum (Puvadolpirod und Thaxton 2000). Dennoch werden die Gewichtszunahmen und das Körpergewicht durch eine Vielfalt von Faktoren beeinflusst. So sind zum Beispiel in den Studien von Tauson und Holm (2001) und Weber et al. (2003) die Gewichtszunahmen umso geringer, je größer der zur Verfügung stehende Platz und damit die Bewegungsmöglichkeiten sind.

3.8.3. Pathologische Stressparameter

3.8.3.1. Mortalität

Es ist bekannt, dass Stress und die daraus resultierende Immunsuppression zu einer vermehrten Krankheitsanfälligkeit führen. Weiters kann es durch Technopathien oder aggressive Auseinandersetzungen in unzureichenden Haltungsformen zu Verletzungen und Frakturen mit Todesfolge kommen (Weber et

al. 2003). So ist zum Beispiel die Mortalitätsrate in konventionellen Käfigen höher als die in ausgestalteten Käfigen (Abrahamsson et al. 1996; Tauson und Holm 2001; Tauson 2002).

3.8.3.2. Pathologische Veränderungen

Frakturen und Verletzungen stellen vor allem in der konventionellen Käfighaltung die häufigste Todesursache dar und sind eine Folge herabgesetzter Knochenfestigkeit (Leyendecker et al. 2002). Diese resultiert zum einen aus der mangelnden Bewegungsmöglichkeit im Käfig bedingt durch die hohe Besatzdichte und dem Mangel an Sitzstangen (Hughes und Appleby 1989; Norgaard-Nielsen 1990; Tauson und Abrahamsson 1994; Abrahamsson und Tauson 1997; Moinard et al. 1998), zum anderen aus der vermehrten Ausschüttung von Kortikosteron, welches die Kalzifikation des Skeletts hemmt und bei erwachsenen Tieren zu Osteoporose führt (Döcke 1994).

Weitere Folgen der reduzierten körperlichen Aktivität sind ein verringertes Herzgewicht und die Reduktion der Größe des Muskelmagens (Gaudlitz 1971).

Organveränderungen in der Nebenniere der Vögel stehen in Zusammenhang mit der Art des Stresses. So kommt es bei akutem Stress zu einer Kortikosteronsynthese und –sekretion

sowie zu einer Lipoidentspeicherung des Interrenalkörpers (Hummel 2000), bei chronischem Stress zu einer Vergrößerung der Nebennieren mit knotigen Hyperplasien (Siegel 1960 und 1995), und im Stadium der Erschöpfung zu bilateralen Blutungen und Infarzierung des Interrenalkörpers (Dämmrich 1991).

Die Vergrößerung und Gewichtsvermehrung der Leber ist auf die Kortikosteron induzierte Fettakkumulation zurückzuführen, da bei Hühnern die Fettsäurensynthese vor allem in der Leber stattfindet (Leveille 1969; Puvadolpirod und Thaxton 2000).

Die quergestreifte Muskulatur hingegen reagiert auf die Eiweiß katabole Wirkung des Kortikosterons mit einem Eiweißabbau und einer konkomitanten interstitiellen Lipomatose (Dämmrich 1991 und Siegel 1995).

4. Material und Methode

4.1 Beschreibung der Hennen

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 der Freilandhaltung gleicht. 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 Hühner waren mit einem Flügelclip gekennzeichnet. Das Impfprogramm bis zur Einstallung der Hennen umfasste Impfungen gemäß Herstellerangabe. Am ersten Tag wurden die Küken gegen die Mareksche Krankheit (Nobilis, RISMAVAC+CA 126, Lebendimpfstoff, Intervet GmbH), in der 2. und 4. Woche gegen Gumboro (Nobilis, GUMBORO D78, Lebendimpfstoff, Intervet GmbH), zwischen der 3. und 5. Woche gegen Newcastle Disease (Vitapest), in der 10. Woche gegen Newcastle Disease und Infektiöse Bronchitis (Nobilis, MA5+CLONE 30, Lebendimpfstoff, Intervet GmbH) und in der 37. Woche mit einem Kombinationsimpfstoff gegen Infektiöse Bronchitis, Gumboro, Newcastle Disease, Egg Drop Syndrome (Nobilis, IB+G+ND+EDS, Lebendimpfstoff, Intervet GmbH), Pocken und Diphtherie (Ovo-Diphtherin Forte, Lebendimpfstoff, Intervet Int.) vakziniert.

Alle Legehennen erhielten dasselbe Kraftfuttermittel mit Weizen ab libitum. Der Legezeitraum erstreckte sich von Oktober 2003 bis Juni 2004 über 9 Monate.

Es waren in keiner der beiden Haltungssysteme Schädlingsbekämpfungsmaßnahmen von Nöten.

4.2 Beschreibung der Käfighaltung

Die Käfigbatterien des Typs „HTK KHÜNE“ (Mosonmagyaróvár) waren ein etagig und fünfreiig (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.

4.3 Beschreibung der naturnahen 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.

4.4 Probenentnahmen und Untersuchung des Gesundheitsstatus

Ein Überblick über die während des Versuchs durchgeführten klinischen Untersuchungen und entnommenen Proben ergibt sich aus Tabelle 2. Bei zeitgleicher Gewinnung von Blut- und Eiprobe wurde die klinische Untersuchung an denselben Tieren durchgeführt.

Tab. 2

**Probennahmen und Untersuchungen während des
Versuchszeitraums**

Maßnahmen	Entnahmezeitpunkt (Tag 0 =Beginn des Versuchs)
Blutproben zur Kortikosteronmessung	Tag 2, 7, 16
Eisammlung zur Kortikosteronmessung	Tag 0, 2, 7, 16
Klinische Untersuchung	Tag 0, 2, 7, 16

Als klinische Parameter wurden 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 Haltungsforn zeitgleich mit der Probeentnahme adspektorisch untersucht. Die Bewertung der Schädigungen erfolgte mittels eines Punktesystems, wie in Tabelle 3 dargestellt, in Anlehnung an Tauson et al. (1984) und Tauson (1986). Auf weitere Parameter wie z.B. die Legeleistung oder das Körpergewicht wurde ob der Kürze des Versuchszeitraums dieser Studie nicht eingegangen.

Tab. 3

**Untersuchungsschlüssel für die Beurteilung des Zustandes
von Gefieder, Haut, Fußballen und Krallen (Tauson et al.
1984 und Tauson, 1986)**

Lokalisation	Bewertung in Punkten	Charakterisierung der Veränderung
Gefieder	4	Sehr gut (keine oder wenige abgenutzte oder deformierte Federn)
	3	Komplett bedeckt, aber verschlechtert
	2	Deutlich verschlechtert und/oder kahle Stellen
	1	Nackte Regionen oder geringgradig bedeckt mit hochgradigen Schäden
Ballen	4	Ohne besonderen Befund
	3	Proliferation am Ballenepithel, Ballen nicht verdickt
	2	Oberflächliche Nekrosen oder Verschorfung des Epithels, Ballen nicht verdickt
	1	Tiefgreifende Nekrose der Ballen, Ballen verdickt
Krallen	3	Länge < 2cm
	2	Länge 2-3cm
	1	Länge > 3cm
Tierkörper	Punkte = Anzahl der Verletzungen mit über 1cm Durchmesser	

4.5 Hormonelle Blutuntersuchungen – 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 (Terumo Nadel, 20G x 1,5“ Nr.1, Luer). 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 dienten wurden in mit Na-EDTA beschichteten Röhrchen (Vacuette, 2ml, Greiner bio-one) gesammelt, und anschließend zentrifugiert, (2500g für 15 Minuten) um das Plasma von den Blutkörperchen zu trennen. Das Plasma wurde dann 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.

4.6 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 und wurde in Vorversuchen validiert (Sas et al. 2006). Sie beruht auf einer Messung des Kortikosterongehalts mittels HPLC-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography – Tandem Massspectrometry) nach einem speziellen Extraktionsverfahren:

5 g Eigelb werden mit 7,5 g Kieselerde vermengt und in der Mikrowelle bei 620 W in drei 30 Sekunden Etappen getrocknet.

Nach dem Auskühlen wird das Eigelb / Kieselerdegemisch in die Extraktionszelle transferiert. Diese Extraktionszelle wird in dem Accelerated Solvent Extractor (ASE 200) zunächst einem Reinigungs-, dann einem Eluierungs- / Extraktionsverfahren unterworfen.

Der erste Schritt besteht in der Reinigung des Probenmaterials mit Hexan und dient dazu die Fette zu lösen. Bevor die Reinigung beginnt, wird der ASE mit 8 ml Hexan durchspült. Das Pumpsystem füllt die Extraktionszellen mit soviel Hexan wie möglich bei einem Druck von 1000 psi und hält diese Füllung 5 Minuten lang aufrecht (static time). Das Hexan mit den gelösten Verunreinigungen wird dann, wiederum mit einem Druck von 1000 psi, aus der Extraktionszelle in eine Sammelvial gepresst. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt (3 static cycles). Zwischen jedem Reinigungszyklus wird der ASE mit 4 ml Hexan gereinigt. Die Sammelvials werden verworfen.

Lösungsmittel: Hexan 100%

Ofen Temperatur: 50°C

Druck: 1000 psi

Gas: N₂

Static time: 5 Minuten

Static cycles: 3

Der zweite Schritt ist der der Extraktion / Eluierung. Bevor dieser Schritt beginnt, wird der ASE mit 8 ml eines Hexan / Ethylazetatgemisches (1:1) durchspült. Das gereinigte Probenmaterial in der Extraktionszelle wird dann mit dem Hexan / Ethylazetatgemisch (1:1) fünf mal gespült, wobei im Unterschied zur Reinigung nicht die ganze Menge der Lösungsmittel aus der Probe in die Sammelvials gepresst wird (diesmal mit 2000 psi), sondern nur 60%. 40% bleiben in der Extraktionszelle. Die restlichen 60% werden bei jedem neuen static cycle neu hinzugefügt. Der Eluierungs- / Extraktionsvorgang wird fünfmal wiederholt (5 static cycles). Zwischen jeden Zyklus wird der ASE mit 4 ml Hexan / Ethylazetat (1:1) gereinigt.

Lösungsmittel: Hexan / Ethylazetat (1:1)

Ofen Temperatur: 60°C

Druck: 2000 psi

Gas: N₂

Static time: 5 Minuten

Static cycles: 5

Flush volume: 60%

Das Eluat der Hexan / Ethylazetat Extraktion wird in einem weiteren Schritt in einem Wasserbad bei 40°C mit Stickstoff getrocknet.

Zu den eingeengten Proben wird nun ein interner Dexamethasonstandard hinzugefügt. Dies ist eine stabile Verbindung die als Referenzwert im Zuge des späteren Messvorgangs dient und eine Überprüfung der Methode erlaubt.

Die Proben werden in 100 µL Eluent (Azetonitril / H₂O – 1:1) gelöst und in das HPLC-MS/MS System gespeist.

Die Kalibrierung erfolgt durch die Zugabe von 5 ppb Dexamethason und 1 ppb Kortikosteron Standards. Die Errechnung der Standardkurve basiert auf der Kalibrierung mit einer konstanten Dexamethasonmenge (5 ppb) und variierenden Mengen von Kortikosteron (1 ppb, 3 ppb, 5 ppb, 10 ppb und 15 ppb). Das Verfahren wurde in Vorversuchen zur Sicherstellung der Wiederholbarkeit (repeatability), Genauigkeit (accuracy) und Selektivität (selectivity) unter Verwendung von Kortikosteronmengen von 0,025 – 5,00 ppb einem Validierungsprozess unterzogen (Sas et al. 2006). 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.

Die HPLC, bestehend aus SUPELCO Hypersil BDS C₁₈ als stationärer hydrophober Phase (150 x 3.2 mm, Partikelgröße: 5 µm) und einem Acetonitril und 0,005 M Ammoniumazetatgemisch gemäß zeitabhängigem Gradientprogramm als mobiler Phase, dient zunächst der

Trennung und Quantifizierung des Kortikosterons. Das Eluat der HPLC Säule wird hiernach mittels Stickstoff als Trägergas und Helium als auxiliäres Gas in die Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) Interface und Ionenquelle eines Finnigan/ThermoQuest LCQ Deca MS/MS Systems gespeist.

Die Operationsbedingungen des HPLC-MS/MS Systems können wie folgt zusammengefasst werden:

Durchflussgeschwindigkeit: 750 μ l/min

Säulentemperatur: 30°C

Zeit: 29 min

Injektionsvolumen: 20 μ l

Temperatur der Kapillare: 160°C

Temperatur der APCI – Ionen Quelle: 500°C

N₂ Gas Durchflussgeschwindigkeit: 50 l/Std

Kapillar Potential: 5,0 kV

Kollisionsenergie: 21,0 V

Durchflussgeschwindigkeit des Trägergases (N₂): 40 ml/min

Durchflussgeschwindigkeit des auxiliären Gases (He): 4 ml/min

Kollisionsgas: Helium

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.

Tab. 4

Ionengewinnung des positiven APCI Ionisierungsmodus

Analyt	Vorläufer Ion (precursor ion)	Fragment(e)
Kortikosteron	405.0	345.1
Dexamethason	393.2	373.1, 355.2, 337.2

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

Die Verbindung des Flüssigchromatographen mit dem Tandem-Massenspektrometer erfolgt über die APCI Ionenquelle. Das Prinzip besteht darin, dass Nebeltröpfchen, die geladene

Teilchen im Überschuss enthalten, neutrale Lösungsmittelmoleküle durch Verdampfung verlieren, wodurch die Oberflächenladung pro cm^2 wegen des kleiner werdenden Tröpfchenradius bis zu einem Grenzwert zunimmt, bei dem es wegen der Ladungsabstoßung zum Austritt von Ionen kommt. Die Rate, mit der die Ionen austreten, hängt unter anderem von deren Solvationsenergie ab, so dass bei Gemischen ein Ionentyp bevorzugt abgegeben werden kann (in unserem Fall die des Kortikosterons). Die Ionen treten bei Atmosphärendruck in die Gasphase über („atmospheric pressure ionization“) und werden in das unter Hochvakuum stehende Massenspektrometer gebracht, wobei Luft und Lösungsmitteldämpfe abgesaugt werden.

Die Tröpfchenbildung durch ein starkes elektrisches Feld bewirkt. Durch Anlegen hoher Spannungen am Ende der Sprühkapillare wird ein Flüssigkeitskonus gebildet, an dessen Ende sich entsprechend der Feldrichtung positive oder negative Ionen ansammeln und aus dem geladene Tröpfchen entstehen die zum Teil hochgeladene Ionen enthalten. Die gebildeten Ionen werden durch elektrische Felder aus ihrer Flugrichtung abgelenkt (Trennung von Neutralteilchen).

Um nun ein Massenspektrum zu erhalten, werden die gebildeten Ionen nach ihrem Masse / Ladungsverhältnis (m/q oder m/z) getrennt. Um die Fragmentierung zu studieren und die

Selektivität und Sensitivität der Kortikosteronquantifizierung entscheidend zu verbessern, sowie zur Senkung der Nachweisgrenze wurde ein MS/MS verwendet. Dabei werden die Substanz spezifischen (in unserem Fall Kortikosteron spezifischen) Ionen ausgewählt und mittels Kollisionsgas (He) zum weiteren Zerfall angeregt. Die so erhaltenen Zerfallsprodukte werden im Spektrometer weiter aufgetrennt und registriert. Die Stärke dieses Systems liegt darin, dass es Verbindungen und / oder Komponenten einer Mixtur nicht nur an Hand ihrer Masse (beziehungsweise ihres Masse / Ladungsverhältnisses) sondern auch durch ihre Fragmentierungsmuster (ein viel genaueres und strengeres strukturelles Merkmal) identifiziert (Stach et al. 1990; De Hoffmann 1996; Dongre 1997).

5. Ergebnisse

5.1 Gesundheitsstatus im Verlauf

Im Verlauf des Versuchs verschlechterte sich der Gefiederzustand in der naturnahen Freilandhaltung. Eine Verschlechterung des Ballenzustandes wurde hingegen in der Käfighaltung beobachtet, obwohl die Veränderungen sehr geringfügig waren (Tab. 5 und 6).

In Abb. 4, 5 und 6 sind die Mittelwerte der Bewertungen (mittels Punktesystem) aller klinischen Untersuchungen im Verlauf für beide Haltungssysteme dargestellt. Abb. 7 zeigt die Mittelwerte der Bewertungen (mittels Punktesystem) aller klinischen Untersuchungen im Versuchszeitraum für beide Haltungssysteme. Es zeigt sich, dass das Gefieder bei Hennen in der Käfighaltung in einem besseren Zustand ist als bei Hennen in der naturnahen Freilandhaltung – allerdings nicht in einem signifikanten Ausmaß. In der naturnahen Freilandhaltung wiederum weisen die Hennen einen besseren Ballenzustand auf als in der Käfighaltung, jedoch sind auch diese Unterschiede nicht signifikant. Der Krallenzustand ist in beiden Haltungssystemen gut, doch hat sich eine Henne in der Käfighaltung eine Krallenverletzung zugezogen. Schwere

Verletzungen oder irreversible Schäden konnten zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

Tab. 5

Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Hennen in Käfighaltung

Tag der Probennahme	Huhn Nummer	Gefieder	Ballen	Krallen
T	6	4	4	3
A	13	4	4	3
G	14	4	4	3
	16	4	4	3
0	18	4	4	3
Mittelwert		4,00	4,00	3,00
Standardabw.		0,00	0,00	0,00
T	6	4	4	3
A	7	4	4	3
G	14	4	4	3
	16	4	4	3
2	18	4	4	3
Mittelwert		4,00	4,00	3,00
Standardabw.		0,00	0,00	0,00
T	5	3	3	3
A	13	4	3	3
G	14	3	4	3
	16	4	4	3
7	18	3	4	3
Mittelwert		3,40	3,60	3,00
Standardabw.		0,55	0,55	0,00
T	6	4	3	3*
A	13	3	3	3
G	14	3	4	3
	16	3	4	3
16	18	3	3	3
Mittelwert		3,20	3,40	3,00
Standardabw.		0,45	0,55	0,00

Graduierung siehe Tab. 7; * eine Krallen war abgebrochen, der Rest <2cm

Tab. 6

**Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Hennen in
naturnaher Freilandhaltung**

Tag der Probennahme	Huhn Nummer	Gefieder	Ballen	Krallen
T	101	4	4	3
A	102	4	4	3
G	103	4	4	3
	104	4	4	3
0	105	4	4	3
Mittelwert		4,00	4,00	3,00
Standardabw.		0,00	0,00	0,00
T	672	4	4	3
A	737	4	4	3
G	901	4	4	3
	1047	3	4	3
2	1132	4	4	3
Mittelwert		3,80	4,00	3,00
Standardabw.		0,45	0,00	0,00
T	485	3	4	3
A	672	3	4	3
G	910	1	4	3
	1042	2	4	3
7	1132	3	4	3
Mittelwert		2,40	4,00	3,00
Standardabw.		0,89	0,00	0,00
T	508	3	4	3
A	656	3	4	3
G	900	2	4	3
	1031	4	4	3
16	1091	2	4	3
Mittelwert		2,80	4,00	3,00
Standardabw.		0,84	0,00	0,00

Graduierung siehe Tab. 7

Abb. 4

Gefiederzustand der Hennen: Käfighaltung und naturnahe Freilandhaltung im Vergleich

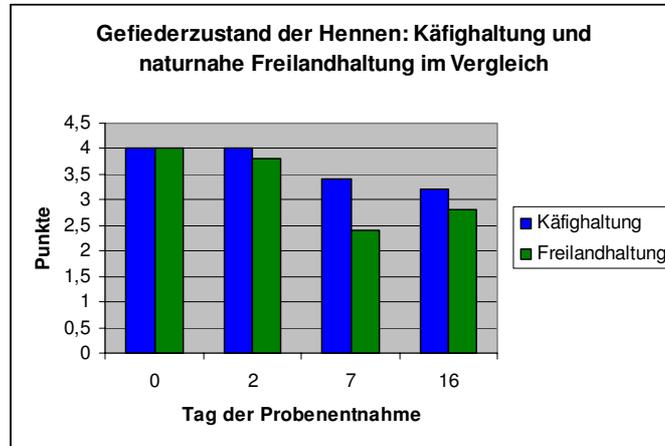


Abb. 5

Ballenzustand der Hennen: Käfighaltung und naturnahe Freilandhaltung im Vergleich

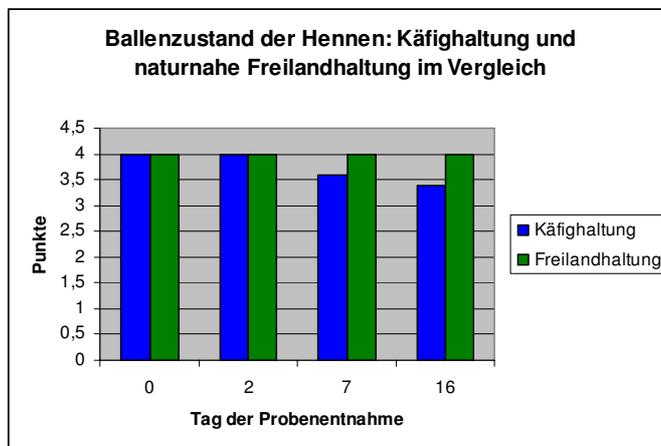


Abb. 6

Krallenzustand der Hennen: Käfighaltung und naturnahe Freilandhaltung im Vergleich

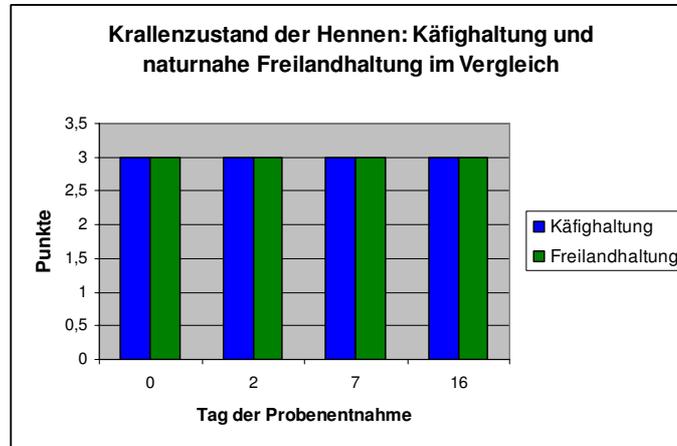
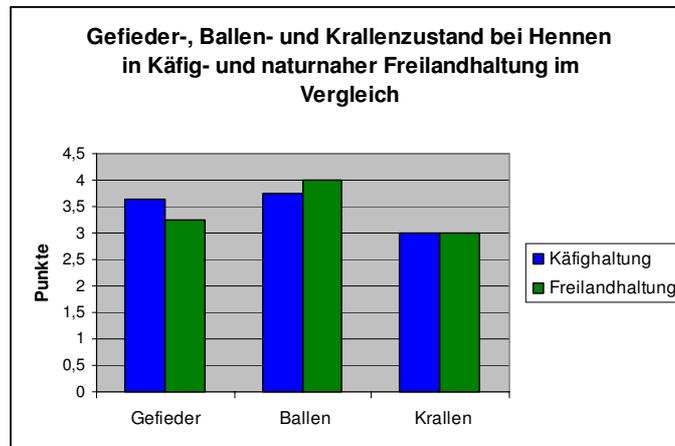


Abb.7

Gefieder-, Ballen- und Krallenzustand bei Hennen in Käfig- und naturnaher Freilandhaltung im Vergleich

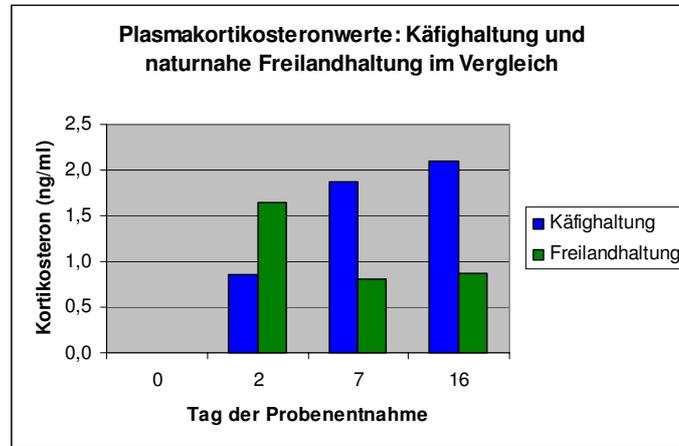


5.2 Kortikosteron im Plasma

Die Ergebnisse der im Rahmen der hormonellen Blutuntersuchungen ermittelten Plasmakortikosteronwerte sind als Einzel- und als arithmetische Mittelwerte für jeden Tag der Probenentnahme für beide Haltungssysteme gesondert dargestellt (Tab. 7 und 8). Die Mittelwerte aller Tageskortikosteronwerte im Plasma sind für beide Haltungssysteme in Abb. 8 schematisiert. Die Mittelwerte des Plasmakortikosterons liegen 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 erstrecken 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 sind auch in dieser Haltungssystem, wenn auch weniger, weit gestreut und rangieren zwischen 0,33 ng/ml und 2,90 ng/ml. Vergleicht man die Plasmakortikosteronwerte der beiden verschiedenen Haltungssysteme, sind die Unterschiede allerdings nicht signifikant.

Abb. 8

Plasmakortikosteronwerte: Käfighaltung und naturnahe Freilandhaltung im Vergleich



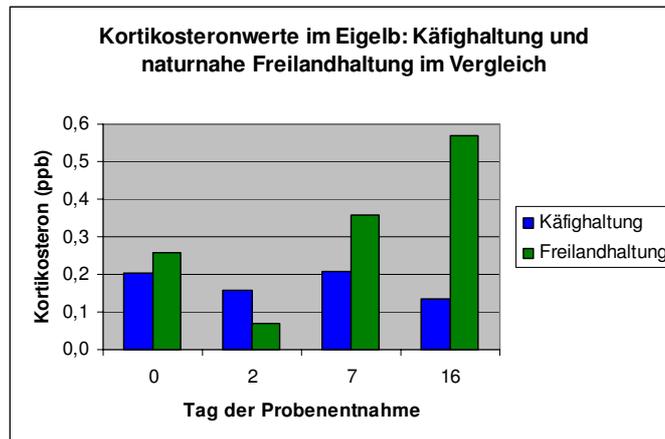
5.3 Kortikosteron im Eigelb

Die Ergebnisse der ermittelten Kortikosteronwerte im Eigelb sind wie die Plasmakortikosteronwerte als Einzel- und als arithmetische Mittelwerte für jeden Tag der Probenentnahme für beide Haltungssysteme gesondert angegeben (Tab. 7 und 8). Die Mittelwerte aller Tageskortikosteronwerte im Eigelb sind für beide Haltungssysteme in Abb. 9 dargestellt. Die Mittelwerte des Kortikosterons im Eigelb liegen 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 erstrecken 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 sind in dieser Haltungsform weiter gestreut als in der Käfighaltung und rangieren zwischen 0,040 ppb und 1,361 ppb. Auch der Vergleich der Kortikosteronwerte im Eigelb weist keine signifikanten Unterschiede auf.

Abb. 9

Kortikosteronwerte im Eigelb: Käfighaltung und naturnahe Freilandhaltung im Vergleich



5.4 Kortikosteron in Plasma und Eigelb – Vergleich der Haltungsformen und der beiden Parameter

Vergleicht man sowohl die gesamten als auch die für jeden Tag der Probenentnahme gesondert errechneten Plasmakortikosteron Mittelwerte der beiden Haltungsformen, so sind die Tagesmittelwerte, mit Ausnahme des Tag 2 der Probenentnahme in der Käfighaltung höher als in der naturnahen Freilandhaltung (siehe Abb. 8). Auch der Gesamtmittelwert des Plasmakortikosterons ist in der Käfighaltung höher ($1,590 \pm 0,734$ ng/ml) als in der naturnahen Freilandhaltung ($1,110 \pm 0,474$ ng/ml). Dennoch sind diese Unterschiede nicht als signifikant zu bewerten.

Ähnlich ist es was die Kortikosterongehalte im Eigelb betrifft. Zwar weisen in diesem Fall die Hennen in der naturnahen Freilandhaltung, mit Ausnahme von Tag 2 der Probenentnahme, höhere Tagesmittelwerte des Kortikosterons im Eigelb auf (siehe Abb. 9) und auch der Gesamtmittelwert des Kortikosterons im Eigelb ist höher ($0,314 \pm 0,211$ ppb) als in der Käfighaltung ($0,179 \pm 0,133$ ppb), doch sind auch diese Unterschiede nicht signifikant.

Auch ein Vergleich der Kortikosteronwerte im Eigelb und Plasma ergibt, dass zwischen diesen Parametern in beiden Haltungsformen keine Korrelation besteht.

Anmerkung zu den Ergebnissen: Einzelne Hennen wurden an einzelnen Versuchstagen aufgrund von irrational hohen Plasmakortikosteronwerten oder unmessbar niedrigen Kortikosteronmengen im Eigelb von der statistischen Auswertung ausgenommen.

Tab. 7

Kortikosterongehalte in Plasma und Eigelb von Hennen aus der Käfighaltung

Tag der Probennahme	Huhn Nummer	Kortikosteron Eigelb (ppb)	Kortikosteron Plasma (ng/ml)
T	6	0,084	kP
A	13	0,176	kP
G	14	0,040	kP
	16	0,668	kP
0	18	0,040	kP
Mittelwert		0,202	
Standardabw.		0,187	
T	6	0,085	0,53
A	7	0,334	1,46
G	14	0,040	1,08
	16	nn	0,62
2	18	0,173	0,56
Mittelwert		0,158	0,850
Standardabw.		0,096	0,336
T	5	0,040	1,67
A	13	0,040	ne
G	14	0,566	3,44
	16	0,195	1,56
7	18	0,206	0,81
Mittelwert		0,209	1,87
Standardabw.		0,143	0,79
T	6	0,046	1,82
A	13	0,302	0,97
G	14	nn	3,81
	16	0,150	2,34
16	18	0,034	1,56
Mittelwert		0,133	2,100
Standardabw.		0,093	0,780

kP = Keine Probenentnahme; nn = nicht nachweisbar; ne = nicht evaluiert

Tab. 8

Kortikosterongehalte in Plasma und Eigelb von Hennen aus der naturnahen Freilandhaltung

Tag der Probennahme	Huhn Nummer	Kortikosteron Eigelb (ppb)	Kortikosteron Plasma (ng/ml)
T	101	0,252	kP
A	102	0,221	kP
G	103	0,222	kP
	104	0,375	kP
0	105	0,227	kP
Mittelwert		0,259	
Standardabw.		0,046	
T	672	0,040	1,31
A	737	0,049	1,20
G	901	nn	1,19
	1047	0,153	2,90
2	1132	0,040	1,62
Mittelwert		0,071	1,644
Standardabw.		0,041	0,502
T	485	0,406	0,82
A	672	0,055	0,77
G	901	0,452	0,75
	1042	0,622	0,88
7	1132	0,259	0,80
Mittelwert		0,359	0,804
Standardabw.		0,161	0,037
T	508	nn	1,98
A	656	0,421	0,85
G	900	1,361	0,64
	1031	0,040	0,57
16	1091	0,460	0,33
Mittelwert		0,571	0,874
Standardabw.		0,395	0,442

kP = Keine Probenentnahme; nn = nicht nachweisbar

6. Diskussion

Stressantworten sind Bestandteil der Überlebensstrategie und stellen den Versuch eines Tieres dar, dem Stressor zu entfliehen, oder sich ihm anzupassen (Downing und Bryden 2002). Unter normalen Umständen lässt der Stressor nach oder das Tier, in diesem Fall das Huhn, entzieht sich seinem Einfluss. Allerdings sind diese Möglichkeiten in modernen Legebetrieben oft nicht realisierbar – die Hennen werden einem Stress ausgesetzt, dem sie sich nicht entziehen können. So manifestiert sich Stress in physiologischen und pathologischen Veränderungen sowie in Verhaltensveränderungen.

Die Berücksichtigung des Gesundheitsstatus bei der Festlegung des Wohlbefindens und der Stressbelastung der Hennen ist wohl der naheliegendste und einfachste Parameter.

So wurden in dieser Arbeit, sowie in den Studien von Sewerin (2002) und Weber et al. (2003) der Gefieder-, Ballen- und Krallenzustand als Parameter zur Ermittlung des Gesundheitszustandes ausgewählt.

Gefiederschäden, wie sie in dieser Arbeit vor allem in der naturnahen Freilandhaltung aufgetreten sind, wenn auch nicht in einem signifikanten Ausmaß, können infolge physiologischer Prozesse oder als Verhaltensstörung auftreten (Weber et al.

2003). Manche Autoren werten Federverlust vor allem im Bereich des Rückens (Gunnarsson et al. 1999) oder des Schwanzes als Indiz für Federpicken, aus dem Verletzungen und Kannibalismus resultieren können (Dittrich-Prölss 1987).

Ob das Federpicken allerdings tatsächlich, wie oft angenommen (Vestergaard et al., 1993), eine direkte Konsequenz der erhöhten Stressbelastung ist und Rückschlüsse auf die Stressreaktion der einzelnen Tiere zulässt, wird zur Zeit in der Literatur diskutiert. So kamen El-Lethey et al. (2000) in ihrer Studie zu dem Schluss, dass Stress, bedingt vor allem durch fehlendes Einstreumaterial, zwar einen Faktor darstellt, der zu einer solchen Verhaltensstörung führen kann, beobachteten aber gleichzeitig, dass selbst hoher Stress nicht eine Voraussetzung für Federpicken darstellt.

Allerdings beeinflussen nicht nur die Ausgestaltung der Haltung, die Fütterung und das Management das Auftreten von Federpicken, sondern bereits die Wahl der eingesetzten Hühner. Eine genetische Disposition für das Auftreten von Federpicken ist vielfach belegt (Hughes und Duncan 1972; Craig und Muir 1993; Engström und Schaller 1993; Keeling 1994; Abrahamsson et al. 1996; Craig und Muir 1996; Savory und Mann 1997; Keppler et al. 2001; Kjaer et al. 2001). Auch ist das Merkmal „Ausführung des Federpickverhaltens“ eine additive genetische Komponente (Kjaer und Sørensen 1997;

Rodenburg et al. 2003) und kann durch entsprechende Selektion verringert werden. In diesem Zusammenhang versuchten Koolhaas et al. (1999) in einer Studie die individuelle Kapazität akute Stresssituationen zu überwinden und die Anfälligkeit für Stress bedingte Erkrankungen durch eine Teilung der Hühner in zwei Verhaltensgruppen zu erklären. Die Studie beschreibt den „proaktiven Verhaltenstyp“ – Hühner mit einer niedrigeren Angriffslatenz, starkem Federpicktrieb (High Feather Pecking, HFP) und niedrigerer Kortikosteron Reaktion auf einen akuten Stressor und den „reaktiven Verhaltenstyp“ – Hühner mit niedrigem Federpicktrieb (Low Feather Pecking, LFP) und höherer Kortikosteron Reaktion auf einen akuten Stressor. So kann die Kortikosteronausschüttung nach einer akuten Stresssituation zwar als Parameter dienen um Hühner in „proaktiv / HFP“ und „reaktiv / LFP“ Gruppen zu teilen (Korte et al. 1997), allerdings besteht keine genetische Korrelation zwischen der Reaktion auf einen akuten Stressor und dem Federpicktrieb (Wissink et al. 2003).

Betrachtet man die Verschlechterung des Federkleides in den beiden Haltungssystemen im Versuch, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die Hennen in der Käfighaltung einzeln in Käfigen gehalten wurden, was ein gegenseitiges Bepicken unmöglich macht, während die Hennen in der naturnahen Freilandhaltung in Gruppen zu 17 Tieren gehalten wurden und

sozialen Kontakt miteinander hatten. Weiters bot die Gestaltung des Auslaufs, durch fehlende Sträucher und Hecken, nicht genug Anreiz zur Nutzung – ein Faktor der das Federpickverhalten maßgeblich beeinflusst (Nicol et al. 2003).

Ballenveränderungen waren bei den Hennen in der naturnahen Freilandhaltung über den gesamten Versuchszeitraum nicht feststellbar. Die Hennen in Käfighaltung wiesen an den Tagen 7 und 16 eine nicht signifikante geringgradige Verschlechterung der Ballengesundheit auf. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Abrahamsson et al. (1996) und Sewerin (2002), die in einer Vergleichsuntersuchung unter kontrollierten Bedingungen den Zustand der Fußballen von Hennen in ausgestalteten Käfigen zwar signifikant schlechter als in konventionellen Käfigen bewerteten, der Haltung mit Auslauf allerdings eindeutig den positivsten Effekt auf die Ballengesundheit einräumten. Tauson und Holm (2001) wiederum fanden eine bessere Fußgesundheit bei Hennen in der ausgestalteten Käfighaltung im Vergleich zu Hennen in der Bodenhaltung. Als Ursache für die Erkrankung der Fußballen werden vor allem schlechtere hygienische Bedingungen in der Bodenhaltung aber auch die Benutzung von Sitzstangen vermutet (Tauson und Abrahamsson 1994).

Zwar umfasste die naturnahe Freilandhaltung in diesem Versuch ebenfalls eine Bodenhaltung, allerdings ist zu

beachten, dass die Europäische Union in der Richtlinie 1999/74/EG des Rates vom 19.07.1999 zur Festlegung von Mindestanforderungen zum Schutz von Legehennen eine maximale Besatzdichte von 9 Hennen/m² und mindestens 250 cm² Einstreufläche pro Henne für die konventionelle Bodenhaltung, und in der Bio-Tierhaltungs-Verordnung 1804/1999/EG eine maximale besatzdichte von 6 Hühnern/m² Nettostallfläche für die ökologische Hühnerhaltung festlegt. Im Vergleich dazu, erhielten die Hennen in diesem Versuch ein höheres Platzangebot von 0,48 Hühnern/m² und der gesamte Stallboden war mit Einstreu versehen. Aufgrund dieser geringen Besatzdichte und des adäquaten Einstreus waren die hygienischen Bedingungen in der Bodenhaltung in diesem Versuch gegeben und es waren daher keine Erkrankungen der Fußballen nachweisbar.

Die Krallenlänge ist von den Möglichkeiten zum Abrieb abhängig (Abrahamsson et al. 1996). In keinem der beiden Haltungssysteme konnten im Laufe des Versuchs signifikante Veränderungen der Krallengesundheit festgestellt werden. Dies ist aufgrund der kurzen Versuchsdauer erklärbar. Allerdings belegen Studien von Sewerin (2002) und Weber et al. (2003), dass der Abrieb in Bodenhaltungssystemen oder Volieren mit Auslauf am besten gewährleistet ist. Auch in dieser Studie kam es bei einem Huhn aus der Käfighaltung zu dem Abriss einer

Kralle, was auf den negativen Effekt der Haltung auf Gitterboden ohne Einstreu zurückgeführt werden kann.

Schwerwiegende, irreversible Verletzungen oder Veränderungen traten in keinem der Haltungssysteme auf und lassen darauf schließen, dass beide adäquat genug ausgestattet waren um schwere Technopathien oder extremes Aggressionsverhalten zu vermeiden.

Neben diesen qualitativen Veränderungen bedingt durch das Haltungssystem, werden aber auch quantitative Veränderungen manifest, die auf das Wohlbefinden der Hühner Rückschlüsse erlauben. Aus der Literatur ist bekannt, dass Haltungs- und Managementfaktoren bei der Stresseinwirkung eine signifikante Rolle spielen (Saleh und Jaksch 1977; Siegel 1980; Freeman et al. 1983; Bishop und Dhaliwal 1994; Mitchell und Kettlewell 1994; Downing und Bryden 2002). Doch wie bewertet man die Stresseinwirkung objektiv?

Der am meisten herangezogene Parameter zur Erfassung, insbesondere von chronischem Stress, ist bei Hühnern Kortikosteron (Siegel 1980; Gross und Siegel 1983; Beuving et al. 1989; McFarlane und Curtis 1989; Broom und Johnson 1993; Terlouw et al. 1997; Elrom 2000; Matteri et al. 2000; Moberg 2000; Pulvadolpirod und Thaxton 2000; Downing und Bryden 2002; Wissink et al. 2003). So verursacht Stress eine physiologische Antwort der Hypothalamus-Hypophysen-

Nebennierenrinden-Achse (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA Achse) und des sympathoadrenomedullären Systems (Moberg 2000), die in einem Anstieg von Stresshormonen, nämlich vor allem Kortikosteroiden und / oder Katecholaminen, resultiert. Diese Anstiege stellen jene endokrinen Mechanismen dar, die es dem Organismus ermöglichen sich gegen stressvolle Situationen zu schützen.

Über den aviären Metabolismus und die Exkretion von Katecholaminen bei Stresseinwirkung ist wenig bekannt. Zwar beschäftigten sich schon einige Studien mit dem Nachweis von Katecholaminen im Blut und Eiklar (z.B. Downing und Bryden 2002), doch waren die Resultate ob des schnellen Anstiegs und Abfalls dieser Hormone im Blut und ihres fehlenden Anstiegs im Eiklar als Reaktion auf einen Stressor nicht befriedigend. So kamen Downing und Bryden (2002) zu dem Schluss, dass sich Adrenalinpiegel im Eiklar nicht zum nicht invasiven Stressnachweis bei Hennen eignen.

Aus diesem Grund konzentrierte sich meine Arbeit auf den Nachweis und Vergleich von Kortikosteroiden, in diesem Fall Kortikosteron, im Blut und Eigelb als Stressindikator.

Stress per se als physiologischer Mechanismus ist nicht von Grund auf schlecht (Moberg 2000). So bewirken Kortikosteroide während Kurzzeitstress eine erhöhte Fitness durch Energiefreisetzung (Raynaert et al. 1976) und eine

Veränderung im Verhalten (Korte et al. 1993). Chronischer Stress, d.h. hohe Kortikosteroidspiegel die über längere Zeit andauern, hingegen, beeinflussen die individuelle Fitness durch Immunsuppression und Gewebsatrophie sowie durch die Suppression der Reproduktion und das Auftreten von Stereotypen negativ (Munck et al. 1984, Liptrap 1993, Dobson und Smith 1995, McBride und Cuddelford 2001). Doch wann wird Stress chronisch und für das Huhn schädlich?

Nimmt man den Nachweis von lang anhaltenden hohen Kortikosteronspiegeln beim Huhn als Indikator für eine chronische Stressbelastung, stößt man bei der Erfassung des Kortikosteronwertes aus dem Blutplasma auf einige Hindernisse. Obwohl die Konzentration von Kortikosteron im Blut in vielen Studien auch für die Bewertung von chronischem Stress herangezogen wird (Bishop und Dhaliwal 1994; Puvadolpirod und Thaxton 2000), ist man sich in der Literatur einig, dass solche Momentaufnahmen, wie sie durch eine einmalige Blutentnahme entstehen, ein verzerrtes Bild der Stressbelastung darstellen, da das Probenentnahmeverfahren (d.h. das Einfangen, Fixieren und die Blutabnahme) in sich Stress verursacht (Beuving 1980; Kratsch et al. 1986; Lagadic et al. 1990; Cook et al. 2000) und es binnen 45 Sekunden (Bishop und Dhaliwal 1994) bis 3 Minuten (Beuving und Vonder 1978; Freeman und Flack 1980) nach der durch die

Probenentnahme ausgelösten Alarmreaktion zu einem Anstieg des Kortikosterongehalts im Blut kommt.

Hinzu kommt, dass die Kortikosteronausschüttung nicht kontinuierlich erfolgt, sondern einem zirkadianen Muster unterliegt: Minimalwerte sind bei Sonnenuntergang, Maximalwerte kurz vor Sonnenaufgang evident (Beuving und Vonder 1977; Höhn 1983; Harvey et al. 1986). Diese basalen Hormonspiegel werden zusätzlich durch Sekretionsschübe, die sich in unregelmäßigen Zeitintervallen wiederholen überlagert (Döcke 1994; Ladewig 1994). Stressoren, die zum Zeitpunkt der natürlichen Peaks einwirken, können außerdem keine zusätzliche Ausschüttung von Kortikosteron herbeiführen (Hill 1983).

Infolge dieser vielen Schwankungen erscheinen einzelne oder gelegentliche Kortikosteronmessungen aus dem Blut von geringem Nutzen zu sein (Broom 1988). Eine Alternative wäre es, Blutproben die zum Kortikosteronnachweis herangezogen werden mehrmals über einen Zeitraum von 24 Stunden zu entnehmen – eine aufwendige, für die Hühner belastende und zeitraubende Art der Probengewinnung, die in der Praxis schwer durchzuführen ist.

Auf der Suche nach Messverfahren die diese Störfaktoren umgehen, versucht man, Kortikosteron durch Sammelproben und nicht invasive Probengewinnung (überwiegend durch die

Sammlung von Eiern oder Kot) zu erfassen. Bei der Henne bietet sich vor allem das Ei zur nicht invasiven Messung von Stress an, da es im Vergleich zu Blutproben keine Momentaufnahme sondern eine stabile Sammelprobe darstellt. Das im Blut zirkulierende Kortikosteron wird in der Zeit der Eiformation über ca. 24 Stunden eingelagert und spiegelt somit die Stressbelastung über einen längeren Zeitraum wider (Hummel 2000, Downing und Bryden 2002). Tagesschwankungen sowie die pulsatile Ausschüttung des Kortikosterons werden ausgeglichen; Störfaktoren und Verzerrungen, die durch die Probengewinnung entstehen werden vermieden.

Zwar kann auch der Nachweis von Kortikosteron, bzw. Kortikosteronmetaboliten im Kot zur nicht invasiven Messung von chronischem Stress herangezogen werden, doch war bis vor kurzem wenig über den Metabolismus und die Exkretion von fekalen Metaboliten bekannt (Palme et al. 1996). Weiters wurde die biologische Relevanz dieser nicht invasiven Messtechnik zwar durch die Administration von ACTH zur Stimulation und Dexamethason zur Suppression des adrenalen Kortex nachgewiesen (Palme et al. 1999; Wasser et al. 2000) und man nimmt an, dass der Nachweis von fekalen Glukokortikoidmetaboliten die adrenale Antwort auf ein breites Spektrum von potentiellen Stressoren widerspiegelt (Wingfield 1994; Creel et al. 1997; Wasser et al. 1997; Wingfield et al.

1997; Goymann et al. 1999; Millspaugh 1999; Foley et al. 2001), doch ist man sich in der Literatur einig, dass die Metaboliten im Kot von Säugern und auch Vögeln erhebliche interspezies Unterschiede aufweisen (Palme und Möstl 1997; Möstl et al. 1999; Teskey-Gerstl et al. 2000; Wasser et al. 2000). Hinzu kommt, dass es durch die extensive Metabolisierung von Glukokortikoiden schwierig ist, ein generalisiertes Messverfahren für alle Tierarten zu schaffen (Palme et al. 1999; Wasser et al. 2000). So enthält der Kot typischerweise multiple und variierende Glukokortikoidmetaboliten und wenig natives Hormon (Eriksson 1971; Palme et al. 1997; Bahr et al. 2000; Wasser et al. 2000). In diesem Zusammenhang werden zum Beispiel beim Huhn nach der Administration von radioaktivem Kortikosteron auf der Basis von HPLC/MS Metaboliten charakterisiert und zur Etablierung von Enzym Immunoassays (EIA) verwendet (Palme et al. 2004). So ist das Ziel der Arbeiten von Wasser et al. (2000) zum Beispiel die Suche nach Antikörpern und EIAs die relevante fekale Glukokortikoidprofile über eine große Spanne von Tierarten ermöglichen.

Dennoch belegen Studien von Goymann et al. 1999; Wallner et al. 1999; Bahr et al. 2000 und Wasser et al. 2000, dass der Nachweis von Glukokortikoiden im Kot vor der Verwendung als Monitoringtool für biologische Stressantworten vorerst

durch Spezies spezifische Untersuchungen untermauert werden muss.

Ein weiterer Nachteil der Messung von Kortikosteron und seinen Metaboliten im Kot ist, dass häufige Probenentnahmen vonnöten sind, um kurze Hormonpeaks zu erfassen – dies ist vor allem bei Tierarten wichtig, die eine kurze Passagezeit haben (Möstl und Palme 2002), wie es unter anderem auch bei Hühnern der Fall ist. So kommt es zum Beispiel nach der Administration von radioaktivem Kortikosteron beim Huhn zu zwei Peaks: das Harnmaximum wird nach einer Stunde, das Kotmaximum nach 4 Stunden erreicht (Palme et al. 2004).

Hinzu kommt, dass Kortikosteronmetaboliten wie auch Kortisolmetaboliten im Kot durch bakterielle Enzyme konvertiert werden (Winter et al. 1979; Möstl und Palme 2002). Um diesen Veränderungen nach der Kotausscheidung vorzubeugen ist es wichtig, die Proben umgehend nach ihrer Entnahme einzufrieren oder die bakteriellen Enzyme mittels Erhitzung oder Trocknung zu inaktivieren (Möstl und Palme 2002). Anders ist es beim Ei: So ergaben Kortikosteronmessungen im Eigelb, die im Rahmen der Voruntersuchungen durchgeführt wurden, keine signifikanten zeitabhängigen Schwankungen, sofern die Eier nach dem Legen im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

Das vorherrschende Ziel dieser Arbeit war es daher, eine praxisnahe nicht invasive Methode des Stressnachweises bei Legehennen durch die Messung von Kortikosteron im Eigelb zu entwickeln und 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 naturnaher Freilandhaltung und Käfighaltung zu messen und zu vergleichen.

Die Entwicklung des Nachweisverfahrens für Kortikosteron im Eigelb mittels HPLC-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography – Tandem Massspectrometry) erwies sich als kompliziert, da eine zeitaufwendige Reinigung und Extraktion vonnöten ist, um die Störfaktoren (wie zum Beispiel Fette) aus dem Eigelb zu entfernen und ein Probenmaterial zu schaffen, dass rein genug ist, um in das HPLC-MS/MS System gespeist zu werden. Vorversuche, bei denen versucht wurde das Kortikosteron mittels HPLC-MS/MS im Eiklar nachzuweisen ergaben, dass die Konzentration dieses Hormons im Eiklar zu niedrig ist um eine Messung zu ermöglichen. Daraus schloss man, dass sich das Eiklar nicht zur Erfassung der Stressbelastung durch Bestimmung des Kortikosterongehalts eignet. Dies deckt sich nicht mit der Studie von Downing und Bryden (2002), die ein RIA Verfahren zum Nachweis von

Kortikosteron im Eiklar entwickelten und fanden, dass Kortikosteronspiegel im Eiklar als Antwort auf einen Stressor ansteigen und dass der Nachweis von diesem Hormon im Eiklar als nicht invasive Methode zum Nachweis von Stress herangezogen werden kann.

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 Probenmaterial zur nicht invasiven Messung der Stressbelastung bei Legehennen herangezogen werden kann. Vergleichbare Studien, die ebenfalls das Eigelb als Probenmaterial verwenden basieren auf RIA Nachweisverfahren (Wingfield et al. 1991; Schwabl 1993; Hayward und Wingfield 2004; Szöke et al. 2004) oder den Nachweis von radioaktivem Kortikosteron (Palme et al. 2004) und decken sich mit der Aussage dieser Arbeit. So fanden zum Beispiel Szöke et al. (2004), dass bei Wildenten der Kortikosterongehalt im Eigelb 84 Stunden nach Auslösen einer Alarmreaktion durch Manipulation ansteigt.

Der Vorteil der in dieser Arbeit entwickelten Methode liegt in ihrer Sensitivität und Selektivität. Die Verwendung von HPLC-MS/MS zur Erfassung von Kortikosteron im Eigelb stellt wohl

die sensibelste Messtechnik dar, da sie Kortikosteron nicht nur nach seinem Masse / Ladungsverhältnis, sondern auch anhand des Fragmentierungsmusters seiner Ionen identifiziert – eine Eigenschaft die für jede Substanz charakteristisch und einzigartig ist. Die Entwicklung einer solch hoch sensiblen Methode ist deshalb wichtig, da Studien belegen, dass nur sehr geringe Mengen des im Blut zirkulierenden Kortikosterons in das Ei gelangen (Hackl et al. 2003; Palme et al. 2004).

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

Vergleicht man die Kortikosteronwerte in invasiv genommenem Probenmaterial (Blut) mit denen in nicht invasiv genommenem Probenmaterial (Eigelb) so ist im Blut eine weite Streuung erkennbar, die sich durch die oben erwähnte individuelle Varianz und die pulsatile und episodenhafte Ausschüttung des Kortikosterons erklären lässt. Im Eigelb ist diese Streuung geringer, was ob des Sammelproben-Charakters des Eigelbs zu erwarten war. In Summe ist die Menge des im Eigelb nachweisbaren Kortikosterons deutlich geringer als die im Blut. Dies ist auf den natürlichen Metabolismus zurückzuführen und deckt sich mit den Ergebnissen von Palme et al. (2004), die in ihrer Studie nach intravenöser Verabreichung von radioaktivem Kortikosteron versuchten, die Radioaktivität im Eiklar und

Eigelb zu messen und nur einen geringen Teil der verabreichten Radioaktivität wieder fanden. Diese Ergebnisse bestätigen die Studien an japanischen Wachteln, die zeigten, dass nur 1% des intravenös verabreichten 3H-Kortikosterons ins Eigelb gelangten (Hackl et al. 2003). Aufgrund des geringen Kortikosterongehalts im Ei scheint der Nachweis mittels HPLC-MS/MS zielführender zu sein als RIAs oder EIAs, da diese Methode ein wesentlich sensibleres Messverfahren darstellt und die Erfassung von sehr niedrigen Hormonspiegeln ermöglicht.

Vergleicht man die Kortikosteronwerte im Blut und Eigelb in der vorliegenden Studie, besteht keine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Werten. Dies deckt sich mit der Hypothese dieser Arbeit und ist damit zu erklären, dass der Vergleich des Kortikosterongehalts im Blut und im Eigelb den Vergleich einer Einzelprobe mit einer Sammelprobe darstellt. Die unterschiedlichen Ergebnisse waren, bedingt durch den pulsatilen und diskontinuierlichen Charakter der Kortikosteronausschüttung im Blut und die Verzerrungen, die während der invasiven Blutprobenentnahme entstehen, zu erwarten.

Die Resultate in der vorliegenden Arbeit decken sich nicht mit der Studie von Hayward und Wingfield (2004) an japanischen Wachteln, die nachwiesen, dass ein experimentell erhöhter Plasmakortikosterongehalt (durch Applikation von exogenen

Kortikosteron Implantaten) zu einem Anstieg des Kortikosteronspiegels im Eigelb führt. Im Gegensatz dazu konnten Downing und Bryden (2002) in ihrer Studie an Hennen nach exogener Applikation von Kortikosteron keinen Zusammenhang zwischen Blutkortikosteron und dem Kortikosterongehalt im Eiklar feststellen und führten dies auf den Mechanismus des negativen Feedbacks zurück, der die endogene Ausschüttung von Kortikosteron verhindert und somit versucht, Anstiege des Kortikosterons im Blut zu minimieren.

Worin sich allerdings die vorliegende Arbeit von den oben genannten unterscheidet, ist, dass die gemessenen Kortikosterongehalte im Plasma und Eigelb in dieser Arbeit physiologische Stresssituationen widerspiegeln und keine exogenen Kortikosterongaben erfolgten.

Über den Vergleich der Stressbelastung in verschiedenen Haltungssystemen und den Einfluss unterschiedlicher Besatzdichten existieren zahlreiche Studien (Bishop und Dhaliwal 1994; Davis et al. 2000; El-Lethey et al. 2000; Downing und Bryden 2002).

Diese Studie befasste sich mit dem Vergleich der Stressbelastung in der Käfig- und naturnahen Freilandhaltung. Es wurde ob der Artgerechtigkeit beider Systeme postuliert, 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 auszuleben. Vergleicht man aber die beiden Haltungsformen in dieser Arbeit, weisen die im Blut gemessenen Kortikosteronmengen keine signifikanten Unterschiede auf, sondern sind sowohl in der Käfighaltung als auch in der Freilandhaltung weit gestreut. Es existieren in diesem Zusammenhang in der Literatur ähnliche Versuchsmodelle, die sich allerdings auf den Vergleich verschiedener Besatzdichten beschränken und deren Aussagen sehr uneinheitlich sind. So fanden Bishop und Dhaliwal (1994) und Davis et al. (2000) dass eine Verringerung des Platzangebots bei in Käfigen gehaltenen Hennen den Kortikosteronwert im Blut nicht beeinflussten. Auch Downing und Bryden (2002) versuchten die Stressbelastung der Hennen in verschiedenen Besatzdichten im Blut nachzuweisen und fanden in ihrem Versuch, dass das Plasmakortikosteron nicht beeinflusst wurde. Koelkebeck und Cain (1984), hingegen, sahen einen Anstieg des Plasmakortikosterons als Antwort auf die Erhöhung der Besatzdichte bei Hennen in der Boden- nicht aber in der Käfighaltung. Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von Mashaly et al. (1984), die genau das Gegenteil beobachteten.

Diese widersprüchlichen Resultate lassen darauf schließen, dass sich die Kortikosteronbestimmung im Blut durch einzelne Probenentnahmen nicht als verlässlicher und reproduzierbarer

Parameter zur Erfassung der Stressbelastung eignet. Dies ist in Anbetracht der individuell unterschiedlichen Kortikosteronantwort sowie der pulsatilen und episodischen Ausschüttung des Kortikosterons und der durch die Probenentnahme verursachte Alarmreaktion nicht verwunderlich.

Doch auch die im Eigelb gemessenen Kortikosteronwerte weisen in meiner Arbeit bei einem Vergleich beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf und entsprechen somit nicht der in dieser Arbeit postulierten Hypothese. Dies lässt vermuten, dass sich die Stressbelastung in der in diesem Versuch verwendeten Käfighaltung nicht wesentlich von der naturnahen Freilandhaltung unterscheidet. Vergleichbare Studien sind in der Literatur nicht vorhanden. Einzig Downing und Bryden (2002), die Kortikosteron im Eiklar als Stressindikator verwendeten fanden, dass die Umstellung von Hennen in Käfige und eine Erhöhung der Besatzdichte zwar anfänglich zu höheren Kortikosteronwerten führen, sich diese aber binnen 34 Wochen ausgleichen. Arbeiten, die hingegen andere verlässliche Parameter wie den Gesundheitsstatus, das Verhalten oder Verhaltensstörungen, das H/L Verhältnis, die Induzierbarkeit und Dauer einer tonischen Immobilität oder den Immunstatus durch die Bestimmung von Antikörpertitern als Indikatoren zur Bestimmung des Wohlbefindens und der Stressbelastung heranziehen, sind in ihrer Aussage einheitlich:

Die Käfighaltung ohne Einstreu, wie sie auch in meinem Versuch verwendet wurde, stellt eindeutig einen gröberen Einschnitt in das Wohlbefinden der Hennen dar und verursacht eine wesentlich höhere Stressbelastung als die naturnahe Freiland- oder sogar Bodenhaltung (El-Lethey et al. 2000; Tauson und Holm 2001; Staack und Knierim 2003). Auch das Verbot der Käfighaltung für Legehennen durch die Europäische Union ab dem Jahr 2012 spiegelt diese Erkenntnis wider.

Der nicht signifikante Unterschied der Kortikosteronwerte im Eigelb der Hennen in der Käfig- und naturnahen Freilandhaltung im Vergleich in der vorliegenden Studie ist darauf zurückzuführen, dass die den Hennen zur Verfügung stehende Bodenfläche in der Käfighaltung die Mindestanforderungen der Europäischen Union bei weitem überschreitet. So schreibt die EU in der Richtlinie 1999/74/EG des Rates vom 19. Juli 1999 eine Mindestfläche von 550cm² pro Huhn vor, während die Hennen im Versuch eine Käfigfläche von 2250cm² pro Huhn erhielten. Weiters wurden die Hennen nicht wie in der Eiproduktionsindustrie üblich zu dritt oder viert in einem Käfig gehalten sondern einzeln. Im Gegenzug wurden die Hennen in der naturnahen Freilandhaltung in diesem Versuch nicht gemäß den Mindestanforderungen der EU, wie sie in der Bio-Tierhalteverordnung 1804/1999/EG festgelegt sind, gehalten. So war die Besatzdichte im Stall mit 0,48 Hühnern pro m² nutzbarer Stallfläche im Versuch zwar

niedriger als es die Europäische Union mit 6 Legehennen pro m² vorschreibt, das Platzangebot im Auslauf aber entsprach den Mindestanforderungen der EU bei weitem nicht: Die Hennen im Versuch hatten im Vergleich zu den vorgeschriebenen 4 m² Auslauf pro Huhn lediglich eine Fläche von 1,39 m² Auslauf pro Huhn zur Verfügung. Weiters wurde den Auflagen der Europäischen Union was die Gestaltung des Auslaufs betrifft nicht Rechnung getragen. Die unzureichende Begrünung und mangelhaften Unterschlupfmöglichkeiten boten den Hennen nicht genügend Anreiz, den Auslauf adäquat zu nützen.

Unter den gegebenen Bedingungen ist dieser Versuch ist also als der Vergleich einer „artgerechteren Käfighaltung“ mit einer „reduzierten Freilandhaltung“ anzusehen bei dem rückblickend – in Anbetracht der fehlenden Konformität beider Haltungssysteme mit der Vorgaben der Europäischen Union – eine signifikant höhere Stressbelastung der Käfighennen nicht wahrscheinlich war.

Weiters muss festgehalten werden, dass konkretere Aussagen über die Stressbelastung in verschiedenen Haltungssystemen und die Artgerechtheit alternativer Haltungsformen erst getroffen werden können, nachdem umfangreichere Feldstudien, die vor allem auch die Langzeiteffekte der verschiedenen Haltungsarten berücksichtigen gemacht worden sind. Weiters bedarf auch die neu entwickelte Methode zur

nicht invasiven Messung der Stressbelastung durch den Nachweis von Kortikosteron im Eigelb noch einiger Versuchreihen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu sichern. Um die praktische Relevanz der Resultate zu verbessern, sollten in weiterführenden Untersuchungen über den Vergleich verschiedener Haltungssysteme auf die Stressbelastung von Hennen Systeme verwendet werden, die den Vorgaben der Europäischen Union entsprechen.

Es ergeben sich aus dieser Studie zahlreiche Aspekte und weitere Anwendungsgebiete, die in Zukunft in Betracht gezogen werden sollten. So sollte die Verwendung dieser und anderer nicht invasiver Methoden des Stressnachweises zur Sicherung der Artgerechtigkeit konventioneller und neu entwickelter, alternativer Haltungssysteme dienen. Zudem ermöglicht es die in dieser Arbeit entwickelte Methode, anhand von Stichproben in Eiverpackungsanlagen inadäquate, schlecht geführte Betriebe ausfindig zu machen in dem Eier mit hohem Kortikosterongehalt zum Herkunftsbetrieb zurückverfolgt werden.

Auch in Zuchtbetrieben kann diese Methode zur Hilfe bei der Bestimmung und Optimierung der Haltungsbedingungen herangezogen werden. Dies bietet nicht nur einen tierrechtlichen sondern auch einen wirtschaftlichen Vorteil, da es wissenschaftlich erwiesen ist, dass, zum Beispiel in Fall der

japanischen Wachtel, gestresste Muttertiere schwächere, weniger überlebensfähige Küken produzieren und sich eine wesentlich höhere Mortalitätsrate abzeichnet als bei artgerechter Haltung (Hayward und Wingfield 2004).

7. 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 das 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.

8. Zusammenfassung

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 – je mehr sich ein Huhn an seine Umgebung anpassen muss, je mehr das Umfeld nicht seinen physiologischen Bedürfnissen entspricht, desto höher der Stress. Um diese Stressbelastung objektiv zu erfassen, werden Kortikosteroide, beim Huhn Kortikosteron, und seine Metaboliten herangezogen und gelten in diesem Zusammenhang, unter Berücksichtigung des Gesundheitszustandes, als verlässliche Stressparameter und -indikatoren. Die Verwendung von Eiern bietet sich deshalb an, da sie 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 sich so zur Erfassung von länger andauerndem Stress eignen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine praxisnahe nicht invasive hoch sensible Methode zu entwickeln, die die Erfassung von Kortikosteron im Eigelb mittels HPLC-MS/MS ermöglicht und herangezogen werden kann, um nachzuweisen, dass Kortikosteron in das Ei gelangt und es somit zu einem geeigneten Probenmaterial für die nicht invasive Messung der Stressbelastung macht das dazu verwendet werden kann verschiedene Haltungsformen zu vergleichen.

Die vorliegenden Resultate belegen, dass es mit der in dieser Arbeit neu entwickelten Methode basierend auf HPLC-MS/MS möglich ist, Kortikosteron im Eigelb nachzuweisen. Es besteht weder eine Korrelation zwischen den Kortikosteronwerten im Blut und Eigelb, noch weisen die Kortikosteronmengen in Blut und Eigelb der Hennen in den zwei verschiedenen Haltungsformen signifikante Unterschiede auf. Ähnliche Resultate sind bei einem Vergleich des Gesundheitsstatus der Hennen beider Haltungsformen zu beobachten – auch hier waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Dennoch wäre es aufgrund Dauer des Versuchs sowie der in diesem Versuch verglichenen Haltungssysteme und Gruppengröße verfrüht, diese Resultate als Beweis dafür zu erachten, dass die Stressbelastung in einer Käfighaltung sich nicht wesentlich von der in einer Freilandhaltung unterscheidet. Weiters sind dies die ersten Versuche der Erfassung von Kortikosteron im Eigelb, die mit dieser neuen Methode gemacht wurden. Es besteht also

noch der Bedarf in umfangreichen Langzeitstudien die Methode zu überprüfen und die Haltungssysteme an die Anforderungen der Europäischen Union anzupassen. Danach stehen dieser Methode eine breite Palette an Anwendungsgebieten- sowohl bei der Beurteilung der Artgerechtigkeit von Haltungssystemen im Legehennenbetrieb als auch bei der Evaluierung und Optimierung von Zuchtbetrieben offen.

9. Literaturverzeichnis

ABRAHAMSSON, P., TAUSON, R. (1997): Effects of group size on performance and bird's use of facilities in furnished cages for laying hens. *Acta Agric. Scand. Sect. A, Anim. Sci.* 47, 254-260.

ABRAHAMSSON, P., TAUSON, R., APPLEBY, M.C. (1996): Behaviour, health and integument of four hybrids of laying hens in modified and conventional cages. *Br. Poult. Sci.* 37, 521-540.

ALTAN, Ö., ALTAN, A., CABUK, M., BAYRAKTAR, H. (2000): Effects of Heat Stress on Some Blood Parameters in Broilers. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 24, 145-148.

APPELBY, M.C., HUGHES, B.O., ELSON, H. A. (1992): *Poultry Production Systems: Behaviour, Management and Welfare*. Wellingford, CAB International.

APPLEBY, M.C. (1995): Perch length in cages for medium hybrid laying hens. *Br. Poult. Sci.* 36, 23-31.

APPLEBY, M.C. (1998): The Edinburgh Modified Cage: effects of group size and space allowance on brown laying hens. *J. Appl. Poult. Research* 7, 152-161.

ARBEITSGRUPPE GEFLÜGEL DES SCHWEIZER TIERSCHUTZ (1995): Legehennen – 12 Jahre Erfahrung mit neuen Haltungssystemen in der Schweiz. Kümmerly und Frey, Bern.

BAHR N., PALME R., MÖHLE U., HODGES K., HEISTERMANN M. (2000): Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117, 427-438.

BAKOSS, L. (1931): Gazdasági baromfitenyésztés. 2. kiadás. Csáthy ferenc Egyetemi Könyvkereskedés és Irodalmi Vállalat Rt., Budapest – Debrecen.

BÁLDY, B. (1954): A baromfi tenyésztése. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

BARTOV, I., JENSEN, L.S., VELTMANN, J.R. (1980): Effect of corticosterone and prolactin on fattening in broiler chicks. *Poult. Sci.* 59, 1328-1334.

BAUM, S. (1995): Die Verhaltensstörung Federpicken beim Haushuhn (*Gallus gallus forma domestica*). Ihre Ursache, Genese und Einbindung in den Kontext des Gesamtverhaltens. Cuvilier Verlag, Göttingen.

BAXTER, M.R. (1994): The welfare problems of laying hens in battery cages. *Veterinary Record* 134, 614-619.

BERATUNG ARTGERECHTE TIERHALTUNG,
UNIVERSITÄT GESAMTHOCHSCHULE KASSEL (Hrsg.)
(1995): Ökologische Geflügelhaltung – Haltung, Fütterung,
Züchtung, Wirtschaftlichkeit, Mensch – Tier Beziehung.
Eigenverlag, Witzenhausen.

BEUVING, G. (1980): Corticosteroids in laying hens. In:
MOSS, R. (Hrsg.): The layinghen in its environment. Martinus
Nijhoff, The Hague, 65-84.

BEUVING, G., JONES, R.B., BLOKHIUS, H.J. (1989):
Adrenocortical and heterophil/lymphocyte responses to
challenge in hens showing short or long tonic immobility
reactions. Br. Poult. Sci. 30, 175-184.

BEUVING, G., VONDER, G.M.A. (1977): Daily rhythm of
corticosterone in laying hens and the influence of egg laying. J.
Reprod. Fert. 51, 169.

BEUVING, G., VONDER; G.M.A. (1978): Effect of stressing
factors on corticosterone levels in the plasma of laying hens.
Gen. Comp. Endocrinol. 35, 153-159.

BISHOP, R.J., DHALIWAL, S. (1994): Cage Density Effects
on Production and Welfare of Layers. Poultry Information
Exchange, Queensland, Australia, 97-106.

BISHOP, R.J., PURLING, T.J. (1993): Production and welfare of laying hens in three bird cages at densities ranging between 450 and 750cm² per hen. Ninth Poultry and Feed Convention, Queensland, Australia, 159-163.

BISZKUP, F., BEKE, L. (1951): A magyaróvári sárga magyar tájfajta tyúk kitenyésztésének módszerei és eredményi. Agrártudomány III (9), 461-467.

BLOKHUIS, H.J.(1986): Feather-pecking in poultry: its relation with ground-pecking. Appl. Anim. Behav. Sci. 16, 63-67.

BLOKHUIS, H.J.(1989): The development and causation of feather pecking in the domestic fowl. Thesis, Spelderholt Centre for Poultry Research and Extension, The Netherlands.

BLOOD, D.C., STUDDERT, V.P. (1999): Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary. W.B. Saunders, London.

BOA – AMPONSEM, K., DUNNINGTON, E.A., PIERSON, F.W., LARSEN, C.T., SIEGEL, P.B. (2000): Antibody responses to different dosages of sheep red blood cells in lines of chickens selected for high and low antibody response to sheep red blood cells. Poult. Sci. 79, 159-162.

BOGNER, H., GRAUVOGL, A. (Hrsg.) (1984): Verhalten landwirtschaftlicher Nutztiere, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

BÖGRE, I., KAKUK, T., SZLAMENICZKY, I., VÁRADY, B. (1964): A tyúktenyésztés kézikönyve. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

BREUNER, C. (2004): Corticosteroid binding globulins and the acute stress response. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Avian Endocrinology, 6. – 11. June 2004, Scottsdale, Arizona, USA.

BREUNER, C.W., WINGFIELD, J.C., ROMERO, L.M. (1999): Diel Rhythms of Basal and Stress-Induced Corticosterone in a wild, Seasonal Vertebrate, Gambel's White-Crowned Sparrow. J. Exp. Zool. 284, 334-342.

BROOM D.M., JOHNSON K.G. (1993): Stress and animal welfare. Chapman & Hall, London.

BROOM, D.M. (1988): The scientific assessment of animal welfare. Appl. Anim. Behav. Sci. 20, 5-19.

BROOM, D.M. (1990): Effects of handling and transport on laying hens. World Poult. Sci. J. 46, 48-50.

BROOM, D.M. (1991): Animal welfare: Concepts and measurement. J. Anim. Sci. 69, 4167-4175.

BROOM, D.M., KNOWLES, T.G. (1989): The assessment of welfare during the handling and transport of spent hens. 3rd

European Symposium on Poultry Welfare, Tours, France, 79-91.

BROWN, K.I., BROWN, D.J., MEYER, R.K. (1958): The effect of surgical trauma, ACTH, and adrenal cortical hormones on electrolytes and gluconeogenesis in male chickens. *Am. J. Physiol.* 192, 43-50.

CAMPBELL, T.W. (1995): *Avian hematology and cytology*. 3rd Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

CANNON, W.B. (1929): *Bodily Changes in Pain, Fear and Rape: An Account of Recent Researches into the Function of Emotional Excitement*, Second Edition, New York, Appelton.

CARERE, C., GROOTHUIS, T.G.G., MÖSTL, E., DAAN, S., KOOLHAAS, J.M. (2003): Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: Daily rhythm and the response to social stress. *Horm. Behav.* 43, 540-548.

COCKREM, J.F. (2004): The Significance of Variation in Corticosterone Responses. In: *Proceedings of the 8th International Symposium on Avian Endocrinology*, 6. – 11. June 2004, Scottsdale, Arizona, USA.

COOK C.J., MELLOR D.J., HARRIS P.J., INGRAM J.R., MATTHEWS L.R. (2000): Hands-on and hands-off measurement of stress. In: *MOBERG G.P., MENCH J.A.*

(Hrsg.): The biology of animal stress. CABI Publishing, 123-146.

CRAIG, J.V., ADAMS, A.W. (1984): Behaviour and well-being of hens in alternative housing environments. *World Poult. Sci. J.* 40, 221-240.

CRAIG, J.V., MUIR, W.M. (1993); Selection for reduction of beak-inflicted injuries among caged hens. *Poult. Sci.* 72, 411-420.

CRAIG, J.V., MUIR, W.M. (1996): Group selection for adaptation to multiple-hen cages: Beakrelated mortality, feathering and body-weight responses. *Poult. Sci.* 75, 294-302.

CRAVENER, T.L., ROUSH, W.B., MASHALY, M.M. (1992): Broiler production under varying population densities. *Poult. Sci.* 71, 427-433.

CREEL, S., CREEL, N.M., MONFORT, S.L. (1997): Radiocollaring and stress hormones in African wild dogs. *Conserv. Biol.* 11, 544-548.

CUNNINGHAM, D.L. (1988): effects of population size and cage area on agonistic activity and social structure of White Leghorn layers. *Poult. Sci.* 67, 198-204.

CYR, N.E., ROMERO, L.M. (2004): Chronic stress alters both basal and acute stress-induced heart rate and corticosterone in

European starlings. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Avian Endocrinology, 6. – 11. June 2004, Scottsdale, Arizona, USA.

DÄMMRICH, K. (1991): Endokrine Organe. In: SCHULTZ, L.-C. (Hrsg.): Pathologie der Haustiere Teil I, Gustav Fischer Verlag, Jena.

DAVIS, G.S., ANDERSON, K.E., CARROLL, A.S. (2000): The Effects of Long- Term Caging and Moulting of Single Comb White Leghorn Hens on Heterophil to Lymphocyte Ratios, Corticosterone and Thyroid Hormones. Poultry Sci. 78, 514-518.

DAWKINS, M.S. (1989): Time Budgets in Red Junglefowl as a Baseline for the Assessment of Welfare in Domestic Fowl. Appl. Anim. Behav. Sci. 24, 77-80.

DAWKINS, M.S., HARDIE, S. (1989): Space needs of laying hens. Br. Poultry Sci. 30, 413-416.

DE HOFFMANN, E. (1996): Tandem mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 31, 129.

DEHNHARD, M., SCHREER, A., KRONE, O., JEWGENOW, K., KRAUSE, M., GROSSMAN, R. (2003): Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant

(*Phalacrocorax carbo*) and the goshawk (*Accipiter gentilis*).
Gen. Comp. Endocrinol. 131 (3), 345-352.

DITTRICH – PRÖLSS, I. (1987): Das Auftreten von Federpicken bei Hennen während der Aufzucht in Bodenhaltung. Arch. Geflügelk. 51, 29-37.

DOBSON H., SMITH R.F. (1995): Stress and reproduction in farm animals. J. Reprod. Fertil. Suppl. 49, 451-461.

DÖCKE, F. (1994): Nebennierenrinde. In: DÖCKE, F. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Aufl., Fischer Verlag, Jena, 314-333.

DONGRE, A.R., ENG, J.K., YATES, J.R. (1997): 3rd. Emerging tandem-mass-spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. Trends Biotechnol.. 10, 418-425.

DOWNING, J.A., BRYDEN, W.L. (2002): A non-invasive test of stress in laying hens. RIRDC, Sydney.

DUNCAN, I.J.H. (1970): Frustration in the fowl. In: FREEMAN, B.M. und GORDON R.F. (Hrsg.): Aspects of Poultry Behaviour, Br. Poult. Sci. Ltd., Edinburgh, 15-31.

DUNCAN, I.J.H., WIDOWSKI, T.M., MALLEAU, A.E., LINDBERG, A.C., PETHERICK, J.C. (1998): External factors and causation of dustbathing in domestic hens. Behav. Processes 43, 219-228.

EDER, H. (1987): Blut und Lymphe. In: WITTKE, G. (Hrsg.). Lehrbuch der Veterinärphysiologie, 7. Aufl., Verlag Paul Parey, 160-207.

EHINGER, F., GSCHWINDT, B. (1981): Der Einfluß unterschiedlicher Transportzeiten auf die Fleischqualität und auf physiologische Merkmale bei Broilern verschiedener Herkunft. Arch. Geflügelk. 45, 260-265.

EL-LETHEY, H., AERNI, V., JUNGI, T.W., WECHSLER, B. (2000): Stress and feather pecking in laying hens in relation to housing conditions. Br. Poult. Sci. 41, 22-28.

EL – LETHEY, H., HUBER – EICHER, B., JUNGI, T.W. (2003): Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses. Vet. Immunol. Immunopathol. 95, 91-101.

ELROM, K. (2000): Review: Handling and Transportation of Broilers; Welfare, Stress, Fear and Meat Quality; Part II: Stress. Israel J. of Vet. Med. 55 (2), 39-45.

ENGSTRÖM, B., SCHALLER, G. (1993): Experimental studies on the health of laying hens in relation to housing system. In: SAVORY, C.J., HUGHES, B.O. (Hrsg.): Fourth European Symposium on Poultry Welfare, Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, UK.

ERHARD, M.H., ÖZPINAR, H., BILAL, T., ABBAS, Y., KUTAY, C., ESECELI, H., STANGASSINGER, M. (2000): The humoral immune response and the productivity of laying hens kept on the ground or in cages. *Alternatives Lab. Anim.* 28, 699-705.

ERIKSSON, H. (1971): Steroids in germfree and conventional rats: Metabolites of [4-¹⁴C] pregnenolone and [4-¹⁴C] corticosterone in urine and faeces from male rats. *Eur. J. Biochem.* 18, 89-93.

FOLEY, C.A.H., PAPAGEORGE, S., WASSER, S.K. (2001): Non-invasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*). *Conserv. Biol.* 15, 1134-1142.

FÖLSCH, D.W. (1981): Das Verhalten von Legehennen in unterschiedlichen Haltungssystemen unter Berücksichtigung der Aufzuchtmethoden. In: FÖLSCH, D.W., VESTERGAARD, K.S.(Hrsg.): Das Verhalten von Hühnern. Tierhaltung Bd. 12, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, 9-114.

FÖLSCH, D.W. (1982): Das Konzept des Volierensystems für Hühner – Beispiel einer Lösung im Praxisbetrieb. In: FÖLSCH, D.W., NABHOLZ A. (Hrsg.): Ethologische Aussagen zur artgerechten Nutztierhaltung. Tierhaltung Bd. 13, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart.

FRASER, A.F., BROOM, D.G.M. (1990): Welfare terminology and concepts. In: Farm animal behaviour and welfare, 3. Aufl. Baillière Tindall, London, 256-265.

FREEMAN, B.M. (1984): Physiology and Biochemistry of domestic fowl. Vol. 5, Academic Press Inc., London.

FREEMAN, B.M. (1984): Transportation of poultry. World Poult. Sci. J. 40, 19-30.

FREEMAN, B.M. (1985): Stress in domestic fowl: Physiological fact or fantasy? World Poult. Sci. J. 41, 45-51.

FREEMAN, B.M., FLACK, L.H. (1980): Effect of handling on plasma corticosterone concentrations in the immature domestic fowl. Comp. Biochem. Physiol. A 66, 77.

FREEMAN, B.M., MANNING, A. C.C (1976): Mediation of glucagon in the response of the domestic fowl to stress. Comp. Biochem. Physiol. A53, 169.

FREEMAN, B.M., MANNING, A.C.C., FLACK, L.H. (1983): Adrenal cortical activity on the domestic fowl, gallus domesticus, following withdrawal of water or food. Comp. Biochem. Physiol. A 74, 639-641.

GALLUP, G.G. (1979): Tonic immobility as a measure of fear in domestic fowl. Anim. Behav. 27, 316-317.

GANONG, W.F. (1963): The central nervous system and the synthesis and release of adrenocorticotropic hormone. In: NALBANDOV, A.V. (Hrsg.): Advances in Neuroendocrinology. University of Illinois press, 92.

GAUDLITZ, O.W. (1971): Vergleichende quantitative Untersuchungen an unterschiedlich gehaltenen Legehühnern. Diss. Tierärztl. Hochschule, Hannover.

GOSH, A. (1980): Avian adrenal medulla: structure and function. In: EPPLE, A., STETSON, M.H. (Hrsg.): Avian Endocrinology. Academic Press, New York, 301.

GOYMANN W., MÖSTL E., VAN'T HOF T., EAST M.L., HOFER H. (1999): Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). Gen. Comp. Endocrinol. 114, 340-348.

GROSS, W.B. (1989): Factors affecting thrombocyte morphology and the relationship with heterophil:lymphocyte ratios. Br. Poult. Sci. 30, 919-925.

GROSS, W.B., CHICKERING, W. (1987): Effects of fasting, water deprivation and adrenal-blocking chemical on resistance to *Escherichia coli* challenge. Poult. Sci. 66, 270-272.

GROSS, W.B., SIEGEL, H.S. (1983): Evaluation of the Heterophil/Lymphocyte Ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis.* 27, 972-979.

GROSS, W.B., SIEGEL, P.B. (1986): Effects of initial and second periods of fasting on heterophil/lymphocyte ratios and body weight. *Avian Dis.* 30, 345-346.

GROSS, W.B., SIEGEL, P.B. (1993): General principles of stress and welfare. In: GRANDIN, T. (Hrsg.): *Livestock, Handling and Transport*. CAB International, Wollingford, 21-34.

GUNNARSSON, S., KEELING, L.J., SVEDBERG, J. (1999): Effect of rearing factors on the prevalence of floor eggs, cloacal cannibalism and feather pecking in commercial flocks of loose housed laying hens. *Br. Poult. Sci.* 40, 12-18.

HACKING, P.M., MAXWELL, M.H., MITCHELL, M.A. (1993): Welfare of broiler breeder and layer females subjected to food and water control during rearing. *Br. Poult. Sci.* 34, 443-458.

HACKL, R., BROMUNDT, V., DAISLEY, J., KOTRSCHAL, K., MÖSTL, E. (2003): Distribution and origin of steroid hormones in the yolk of Japanese quail (*Coturnix japonica japonica*). *J. Comp. Physiol. B* 173, 327-331.

HALLIDAY, W.G., ROSS, J.G., CHRISTIE, G., JONES, R.M. (1977): Effects of transportation on blood metabolites in broilers. *Br. Poult. Sci.* 18, 657-659.

HARVEY, S., SCANES, C.G., BROWN, K.I. (1986): Adrenals. In: STURKIE, P.D. (Hrsg.): *Avian Physiology*. 4th Ed., Springer Verlag, New York, Berlin, 479-493.

HAYWARD, L.S., WINGFIELD, J.C. (2004): Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may alter offspring growth and adult phenotype. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 365-371.

HENDRICKS, G.L., SIEGEL, H.S., MASHALY, M.M. (1991): Ovine corticotropin-releasing factor increases endocrine and immunological activity of avian leukocytes in vivo. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 196, 390.

HENK, F. (1987): *Hühnerhaltung: Ökonomisch – ökologisch*. Leopold Stocker Verlag, Graz.

HESTER, P.Y., MUIR, W.M., CRAIG, J.V. (1996): Group selection for adaptation to multiple-hen cages: humoral immune response. *Poult. Sci.* 75, 1315-1320.

HILL, J.A. (1983): Indicators of stress in poultry. *World Poult. Sci. J.* 39, 24-32.

HÖHN, E.O. (1983): Hormones and their relationships. In: MEHNER, A.W., HARTFIEL, W. (Hrsg.): Handbuch der Geflügelphysiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena.

HUBER-EICHER, B., SEBO, F. (2001): The prevalence of feather pecking and development in commercial flocks of laying hens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 74, 223-231.

HUBER-EICHER, B., WECHSLER, B. (1998): The effect of quality and availability of foraging materials on feather pecking in laying hen chicks. *Anim. Behav.* 55, 861-873.

HUGHES, B.O. (1971): Allelomimetic feeding in the domestic fowl. *Br. Poult. Sci.*, 13, 485-493.

HUGHES, B.O. (1975): The concept of an optimum stocking density and its selection for egg production. In: FREEMAN, B.M. UND BOORMAN, K.N. (Hrsg.): Economic factors affecting egg production, *Br. Poult. Sci. Ltd.*, Edinburgh, 271-298.

HUGHES, B.O., APPLEBY, M.C. (1989): Increase in bone strength of spent laying hens housed in modified cages with perches. *Vet. Rec.* 124, 483-484.

HUGHES, B.O., DUNCAN, I.J.H. (1972): The influence of strain and environmental factors upon feather pecking and cannibalism in fowls. *Br. Poult. Sci.* 13, 525-547.

Hühnern. Tierhaltung Bd. 12, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, 115-132.

HUMMEL, G. (2000): Anatomie und Physiologie der Vögel. Verlag Ulmer, Stuttgart.

JONES, R.B. (1989): Chronic stressors, tonic immobility and leucocytic responses in the domestic fowl. *Physiol. Behav.* 46, 439-442.

KATANBAF, M.N., JONES, D.E., DUNNINGTON, E.A., GROSS, W.B., SIEGEL, P.B. (1988): Anatomical and physiological responses of early and late feathering broiler chickens to various feeding regimes. *Arch. Geflügelk.* 52, 119-126.

KEELING, L.J. (1994): Feather pecking – who in the group does it, how often and under what circumstances? Proceedings of the 9th European Poultry Conference, Glasgow, 288-289.

KEELING, L.J., DUNCAN, I.J.H. (1989): Inter-individual distances and orientation in laying hens housed in groups of three in two different-sized enclosures. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 24, 325-342.

KEPPLER, C., LANGE, K., STROBEL, E., FÖLSCH, D. W. (2001a): A comparative study on the influence of breed on feather pecking and cannibalism in laying hens in alternative

rearing and husbandry systems including feeding aspects. Proceedings of the 6th European Symposium on Poultry Welfare, Zollikofen, 289-291.

KEPPLER, C., LANGE, K., WEILAND, I., FÖLSCH, D.W. (2001b): The expression of natural nesting behaviour is important for egg production and for the prevention of cannibalism. 6th European Symposium on Poultry Welfare, 1.-4. September 2001 Zollikofen, 349-352.

KITE, V.G. (1985): Does a hen require a nest? Second European Symposium on Poultry Welfare. Report of Proceedings. WEGNER, R.-M. (Hrsg.), Institute of Poultry Research, Celle. 118-135.

KJAER, J.B., SÖRENSEN, P. (1997): Feather pecking behaviour in White Leghorns, a genetic study. Br. Poult. Sci. 38, 333-341.

KJAER, J. B., SÖRENSEN, P., SU, G. (2001): Divergent selection on feather pecking behaviour in laying hens. Appl. Anim. Behav. Sci. 71, 229-239.

KNIERIM, U. (1998): Wissenschaftliche Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Tiergerechtigkeit. In: Beurteilung der Tiergerechtigkeit von Haltungssystemen, KTBL-Schrift 377, KTBL, Darmstadt, 40-50.

KNIERIM, U. (2001): Grundsätzliche ethologische Überlegungen zur Beurteilung der Tiergerechtigkeit bei Nutztieren. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 109, 261-266.

KOELKEBECK, K.W., CAIN, J.R. (1984): Performance, Behaviour, Plasma Corticosterone and Economic Returns of Laying Hens in Several Management Alternatives. Poult. Sci. 63, 2123-2131.

KOOLHAAS, J.M., KORTE, S.M., DE BOER, S.F., VAN DER VEGT, B.J., VAN REENEN, C.G., HOPSTER, H., DE JONG, I.C., RUIS, M.A.W., BLOKHUIS, H.J. (1999): Coping styles in animals: current status in behaviour and stress-physiology. Neurosci. Biobehav. Rev. 23, 925-935.

KORTE S.M., BOUWS G.A.H., BOHUS B. (1993): Central actions of corticotropin-releasing hormone (CR-H) on behavioral, neuroendocrine and cardiovascular regulation: brain corticoid receptor involvement. Horm. Behav. 27, 167-183.

KORTE, S.M., BEUVING, G., RUESINK, W., BLOKHUIS, H.J. (1997): Plasma catecholamine and corticosterone levels during manual restraint in chicks from a high and low feather pecking line of laying hens. Physiol. Behav. 62, 437-441.

KOVACS, K., PECZELY, P. (1983): Phase shifts in circadian rhythmicity of total, free corticosterone and transcortine plasma

levels in hypothyroid male Japanese quails. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50, 483.

KOVÁCSNÉ GAÁL, K. (2004): A sárga magyar tyúk génmegörzése és fajtafanutartása Mosonmagyaróváron. *A Baromfi VII*, 1, 21-24.

KRATSCH, J., BIER, H., KLEMM, R., PINGEL, H. (1986): Radioimmunoassay zur Bestimmung von Serumkortison bei der Ente. *Arch. Exper. Vet. Med., Leipzig*, 40, 4, 531-540.

KREIENBROCK, L., SCHNEIDER, B., SCHÄL, J., GLASER, S. (2003): Orientierende epidemiologische Untersuchung zum Leistungsniveau und Gesundheitsstatus in Leghennenhaltungen verschiedener Haltungssysteme. Zwischenbericht: Deskriptive Auswertung. Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung, WHO-Collaborating Centre for Research and Training in Veterinary Public Health, Tierärztliche Hochschule Hannover.

LADWIG, J. (1994): Stress. In: DÖCKE, F. (Hrsg.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie* 3. Aufl., Fischer Verlag, Jena, 379-398.

LAGADIC, H., FAURE, J.M., MILLS, A.D., WILLIAMS, J.B. (1990): Effects of blood sampling on plasma concentrations of corticosterone and glucose on laying hens caged in groups. *Br. Poult. Sci.* 31 (4), 823-829.

LAHIRI, P. (1982): Effect of chronic heat stress on adrenomedullary hormones and blood sugar response in blue rock pigeon, *Columba livia* Gmelin. *Indian Journal of Experimental Biology* 20, 492.

LEVEILLE, G.A. (1969): In vitro hepatic lipogenesis in the hen and chick. *Comp. Biochem. Physiol.* 28, 431-435.

LEYENDECKER, M., HAMANN, H., HARTUNG, J., GLÜNDER, G., NOGOSSEK, M., NEUMANN, U., SÜRIE, C., KAMPHUES, J., DISTL, O. (2002): Untersuchungen zur Schalenfestigkeit und Knochenstabilität von Legehennen in drei verschiedenen Haltungssystemen. *Lohmann – Information* 2, 19-24.

LIPTRAP R.M. (1993): Stress and reproduction in domestic animals. *Ann. NY Acad. Sci.* 697, 275-284.

LÖLINGER, H.-CH., VONDEM HAGEN, D., MATTHES, S. (1980): Tiergesundheit und klinische Parameter als Indiz für die Beurteilung tierschutzrelevanter Tatbestände in der Geflügelhaltung. *Arch. Geflügelk.* 44, 229-236.

LÖSING, W. (1980): Untersuchungen über die klinischen Erscheinungen und zur Diagnose des Trinkwassermangels beim Huhn. Dissertation an der tierärztl. Hochschule, Hannover.

LYNN, S.E., BREUNER, C.W., WINGFIELD, J.C. (2004): Corticosterone and binding globulins: Plasma interactions in response to short-term food restriction. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Avian Endocrinology, 6. – 11. June 2004, Scottsdale, Arizona, USA.

MARTIN, G. (1984): Nahrungssuch- und Nahrungsaufnahmeverhalten von Legehennen in Bodenhaltung. In: Aktuelle Arbeiten zur artgemäßen Tierhaltung 1983, KTBL-Schrift 299, KTBL (Hrsg.) Darmstadt, 246-255.

MARTIN, G. (1990): Federpickhäufigkeit in Abhängigkeit von Draht- und Einstreuboden, sowie von der Lichtintensität. In: Aktuelle Arbeiten zur artgemäßen Tierhaltung 1989, KTBL-Schrift 342, KTBL (Hrsg.) Darmstadt, 108-133.

MASHALY, M.M., WEBB, M.L., YOUTZ, S.L., ROUSH, W.B. AND GRAVES, H.B. (1984): Changes in serum corticosterone concentration of laying hens as a response to increased population density. *Poult. Sci.* 63, 2271-2274.

MATOLCSI, J. (1975): A háziállatok eredete. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

MATTERI R.L., CARROLL J.A., DYER C.J. (2000): Neuroendocrine responses to stress. In: MOBERG G.P., MENCH J.A. (Hrsg.): The biology of animal stress. CABI Publishing, 43-76.

MAXWELL, M.H. (1993): Avian blood Leucocyte response to stress. *World Poult. Sci. J.* 49, 35-43.

MAXWELL, M.H., HOCKING, P.M., ROBERTSON, G.W. (1992b): Differential leucocyte responses to various degrees of food restriction in broilers, turkeys and ducks. *Br. Poult. Sci.* 33, 177-187.

MAXWELL, M.H., ROBERTSON, G.M. (1998): The avian heterophil leucocyte: a review. *World Poult. Sci. J.* 54, 155-178.

MAXWELL, M.H., ROBERTSON, G.M., MITCHELL, M.A., CARLISLE, A.J. (1992a): The fine structure of broiler chicken blood cells, with particular reference to basophils, after severe heat stress. *Comp. Haematol. Int.* 2, 190-200.

MAXWELL, M.H., ROBERTSON, G.W., SPENCE, S., Mc CORQUADALE, C.C. (1990): Comparison of haematological values in restricted and ad-libitum-fed domestic fowls: White blood cells and thrombocytes. *Br. Poult. Sci.* 31, 399-405.

Mc FARLANE, J.M., CURTIS, S.E. (1989): Multiple concurrent stressors in chicks.3. Effects on plasma corticosterone and the Heterophil:Lymphocyte Ratio. *Poult. Sci.* 68, 522-527.

MCBRIDE S.D., CUDELDFORD D. (2001): The putative welfare reducing effects of preventing equine stereotypic behaviour. *Anim. Welfare.* 10, 173-189.

MILLSPAUGH, J.J. (1999): Behavioural and Physiological Responses of Elk to Human Disturbances in the Southern Black Hills, South Dakota. Ph.D. thesis, University of Washington.

MITCHELL, M.A., KETTLEWELL, P.J. (1994): Roadtransportation of broiler chickens: Introduction of physiological stress. *World Poult. Sci. J.* 50, 57-59.

MITCHELL, M.A., KETTLEWELL, P.J., MAXWELL, M.H. (1992): Indicators of physiological stress in broiler chickens during road transportation. *Anim. Welfare* 1, 91-103.

MOBERG G.P. (2000): Biological response to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG G.P., MENCH J.A. (Hrsg.): *The biology of animal stress*. CABI Publishing, 123-146.

MOINARD, C., MORISSE, J.P., FAURE, J.M. (1998): Effect of cage area, cage height and perches on feather condition, bone breakage and mortality of laying hens. *Br. Poult. Sci.* 39, 198-202.

MÖSTL E., MESSMANN S., BAGU E., ROBIA C., PALME R. (1999): Measurement of glucocorticoid metabolite

concentrations in faeces of domestic livestock. *J. Vet. Med. A.* 46, 621-632.

MÖSTL, E., PALME, R. (2002): Hormones as indicators of stress. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23, 67-74.

MUNCK A., GUYRE P.M., HOLBROOK N.I. (1984): Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relationship to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5, 25-44.

NAGRA, C.L., MEYER, R.K. (1963): Influence of corticosterone on the metabolism of palmitate and glucose in cockerels. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3, 131-138.

NICOL, C.J., PÖTZSCH, C., LEWIS, K., GREEN, L.E. (2003): Matched concurrent case-control study of risk factors for feather pecking in hens on free-range commercial farms in the UK. *Br. Poult. Sci.* 44, 515-523.

NIXEY, C. (1994): Lighting for the production and welfare of turkeys. *World Poult. Sci. J.* 50, 292-294.

NORGAARD – NIELSEN, G. (1990): Bone strength of laying hens kept in an alternative system, compared with hens in cages and on deep-litter. *Br. Poult. Sci.* 31, 81-89.

OLSSON, A. (2001): Motivation in laying hens. Studies of perching and dustbathing behaviour. Dissertation, Acta

Universitatis Agriculturae Sueciae, Veterinaria 101, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

PALME R., FISCHER P., SCHILDORFER H., ISMAIL M.N. (1996): Excretion of infused ^{14}C -steroid hormones *via* faeces and urine in domestic livestock. *Anim. Reprod. Sci.* 43, 43-63.

PALME, R., MÖSTL, E. (1997): Measurement of cortisol metabolites in the feces of sheep as a parameter of cortisol concentration in the blood. *Int. J. Mammal. Biol.* 62 (Suppl. II), 192-197.

PALME, R., MÖSTL, E., BREM, G., SCHELLANDER, K., BAMBERG, E. (1997): Faecal metabolites of infused ^{14}C -progesterone in domestic livestock. *Reprod. Dom. Anim.* 32, 199-206.

PALME, R., RETTENBACHER, S., HACKL, R., GHAREEB, K., MÖSTL, E. (2004): Noninvasive evaluation of adrenal activity in chicken. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Avian Endocrinology, 6. – 11. June 2004, Scottsdale, Arizona, USA.

PALME, R., ROBIA, C., MESSMANN, S., HOFER, J., MÖSTL, E. (1999): Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: A non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 86, 237-241.

PEITZ, B., PEITZ, L. (2002): Hühner. Rätegeber Nutztiere. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

PUVADOLPIROD, S., THAXTON, J.P. (2000): Model of Physiological Stress in Chickens 1. Response Parameters. Poult. Sci. 79, 363-369.

RAUCH, H.W. (1994): Results and experiences with laying hens in Get-Away cages. In: SHERWIN, C.M. (Hrsg.): Modified Cages for Laying Hens. Potters Bar, UK, Universities Federation for Animal Welfare, 63-73.

RAYNAERT R., DE PAEPE M., PEETERS G. (1976): Influence of stress, age and sex on serum growth hormone and free fatty acids in cattle. Horm. Metab. Res. 8, 109-114.

ROBINZON, B. (1990): Introduction to Endocrinology. Academnon, Student Publishing House of the Hebrew University of Jerusalem.

RODENBURG, T.B., BUITENHUIS, A.J., ASK, B., UITDEHAAG, K., KOENE, P., VAN DER POEL, J.J., BOVENHUIS, H. (2003): Heritability of feather pecking and open-field response in laying hens at two different ages. Poult. Sci. 82, 861-867.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. (1996): Immunology. 4th Ed., Mosby, Barcelona.

ROMERO, L.M. (2004): Physiological consequences of acute release of corticosteroids. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Avian Endocrinology, 6. – 11. June 2004, Scottsdale, Arizona, USA.

ROTH, F.X. (2004): Fütterungsstrategien für Legehennen in Haltungssystemen mit Grünbewuchs im Auslauf (nach EU VO 2092/91), Schlussbericht. Fachgebiet für Tierernährung und Leistungsphysiologie, Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Technische Universität München, Bio nach EG-Öko Verordnung.

SALEH, S.Y., JAKSCH, W. (1977): The effects of stress factors on blood leucocytic count, glucose, and corticosteroids in chickens. Zbl. Vet. Med. A 24, 220-228.

SAMBRAUS, H. H. (Hrsg.) (1978): Nutztierethologie. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

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.

SATTERLEE, D.G., JONES, R.B. (2004): Correlated traits associated with selection of Japanese quail for divergent adrenocortical responsiveness. In: Proceedings of the 8th

International Symposium on Avian Endocrinology, 6. – 11. June 2004, Scottsdale, Arizona, USA.

SAVORY, C.J., MANN J.S. (1997): Behavioural development in groups of pen-housed pullets in relation to genetic strain, age and food form. *Br. Poult. Sci.* 38, 38-47.

SAVORY, C.J., WOOD-GUSH, D.G.M., DUNCAN, I.J.H. (1978): Feeding behaviour in a population of domestic fowls in the wild. *Appl. Anim. Ethol.* 4, 13-27.

SCHWABL, H. (1993): Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 90, 11446-11450.

SELYE, H. (1936): A syndrom produced by diverse noxious agents. *Nature* 138, 32.

SEWERIN, K. (2002): Beurteilung der Tiergerechtheit des angereicherten Käfigtyps „Aviplus“ unter besonderer Berücksichtigung ethologischer und gesundheitlicher Aspekte bei Lohmann Silver Legehennen. Inaugural – Dissertation, Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

SHERWIN, C.M. (1998): Light intensity preferences of domestic male turkeys. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 58, 121-130.

SHERWIN, C.M. (Hrsg.) (1994): Modified Cages for Laying Hens. Potters Bar, UK, Universities Federation for Animal Welfare.

SIEGEL, H.S. (1960): Effect of population density on the pituitary – adrenal cortical axis of cockerels. *Poult. Sci.* 39, 500-510.

SIEGEL, H.S. (1980): Physiological stress in birds. *Bio-Sci.* 30, 529.

SIEGEL, H.S. (1985): Immunological responses as indicators of stress. *World Poult. Sci. J.* 27, 237.

SIEGEL, H.S. (1995): Stress, strains and resistance. *Br. Poult. Sci.*, 36, 3-22.

SIEGEL, H.S., VAN KAMPEN, N. (1984): Energy relationship in growing chickens given daily injections of corticosterone. *Br. Poult. Sci.*, 25, 471-485.

STAACK, M., KNIERIM, U. (2003): Studie zur Tiergerechtheit von Haltungssystemen für Legehennen. BUND, Berlin.

STACH, J., MÖDER, M., HERZSCHUH, R. (1990): Tandem-Massenspektrometrie – Grundlagen und Applikationen. *Z. Chem.* 30, 157.

STEPHENS, D.B. (1980): Stress and its measurement in domestic animals; a review of behavioral and physiological studies under field and laboratory situations. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24, 179-210.

STERBETZ, J.(1979): Élő örökségünk. Générózió, génbank. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

STERN, A. (2001): Geflügel – Natürlich und artgerecht halten. 3. Auflage, Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co., Stuttgart.

SZALAY, I. (2002): Régi magyar baromfifajták. Old Hungarian Poultry. KÁTKI és Mezőgazda Kiadó, Gödöllő.

SZÖKE, Zs., BICZÓ, A., PÉCZELY, P. (2004a): Effect of handling stress on the egg production and some eggparameters. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Avian Endocrinology, 6. – 11. June 2004, Scottsdale, Arizona, USA.

SZÖKE, Zs., FERENCZI, Sz., BICZÓ, A., PÉCZELY, P. (2004b): Effect of maternal handling stress on the steroid deposition into the yolk and on the offsprings. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Avian Endocrinology, 6. – 11. June 2004, Scottsdale, Arizona, USA.

TAUSON, R. (1984): Effects of a perch in conventional cages for laying hens. *Acta Agric. Scand.* 34, 193-209.

TAUSON, R. (1986): Avoiding excessive growth of claws in caged laying hens. *Acta Agric. Scand.* 36, 95-106.

TAUSON, R. (2002): Furnished cages and aviaries: production and health. *World Poult. Sci. J.* 58, 49-63.

TAUSON, R., ABRAHAMSSON, T. (1994): Foot and skeletal disorders in laying hens. Effects of perch design, hybrid, housing system and stocking density. *Acta Agric. Scand. Sect. A., Anim. Sci.* 44, 110-119.

TAUSON, R., AMBROSEN, T., ELWINGER, K. (1984): Evaluation of procedures for scoring the integument of laying hens – independent scoring of plumage condition. *Acta Agric. Scand.* 34, 400-408.

TAUSON, R., HOLM, K.E. (2001): First furnished small group cages for laying hens in evaluation program on commercial farms in Sweden. In: *Proc. 6th European Symp. on Poultry Welfare*, Zollikofen, Switzerland 9/2001, 1-4.

TERLOUW E.M., SCHOUTEN W.G.P., LADEWIG J. (1997): Physiology. In: *APPLEBY M.C., HUGHES B.O. (Hrsg.): Animal welfare*. University Press, CAB International, Cambridge, 143-158.

TESKEY-GERSTL A., STEINECK T., BAMBERG E., PALME R. (2000): Excretion of corticosteroids in urine and faeces of hares (*Lepus europaeus*). J. Comp. Physiol. B. 170, 163-168.

THAXTON, P., SIEGEL, H.S. (1972): Depression of secondary immunity by high environmental temperature. Poultry Sci. 51, 1519.

TIZARD, I.R. (1996): Veterinary Immunology, An Introduction. 5th Ed., W.B. Saunders Co. Ltd., Philadelphia.

TÜLLER, R. (1990): Geflügelställe: Stallbau, Klima, Einrichtung. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

VESTERGAARD, K.S. (1981a): Behavioural and physiological studies of hens on wire floors and in deep litter pens. In: FÖLSCH, D.W., VESTERGAARD, K.S. (Hrsg.): Das Verhalten von Hühnern. Tierhaltung Bd. 12, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, 115-132.

VESTERGAARD, K.S. (1981b): The well-being of the caged hen – an analysis based on the normal behaviour of fowl. In: FÖLSCH, D.W., VESTERGAARD, K.S. (Hrsg.): Das Verhalten von Hühnern. Tierhaltung Bd. 12, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, 145-167.

VESTERGAARD, K.S., HOGAN, J.A., KRUIJT, J.P. (1990): The development of a behaviour system: dustbathing in the

Burmese red junglefowl: I. the influence of the rearing environment on the organization of dustbathing. *Behav.* 112, 99-116.

VESTERGAARD, K.S., KRUIJT, J.P., HOGAN, J.A. (1993): Feather pecking and chronic fear in groups of red junglefowl: their relations to dustbathing, rearing environment and social status. *Anim. Behav.* 45, 1127-1140.

WALLNER, B., MÖSTL, E., DITTAMI, J., PROSSINGER, H. (1999): Fecal glucocorticoids document stress in female Barbary macaques (*Macaca sylvanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 80-86.

WARRIS, P.B. (1996): The welfare of animals during transport. *Vet. Annual* 36, 73-85.

WARRIS, P.D., KESTIN, S.C., BROWN, S.N., KNOWLES, T.G., WILKINS, L.J., EDWARDS, J.E., AUSTIN, S.D., NICOL, C.J. (1993): The depletion of glycogen stores and indices of dehydration in transported broilers. *Br. Vet. J.* 149, 391-398.

WASSER, S.K., BEVIS, K., KING, G., HANSON, E. (1997): Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. *Conserv. Biol.* 11, 1019-1022.

WASSER, S.K., HUNT, K.E., BROWN, J.L., COOPER, K., CROCKETT, C.M., BECHERT, U., MILLSPAUGH, J.J., LARSON, S., MONFORT, S.L. (2000): A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 260-275.

WEBER, R.M., NOGOSSEK, M., SANDER, I., WANDT, B., NEUMANN, U., GLÜNDER, G. (2003): Untersuchungen zum Gesundheitsstatus von Legehennen in ausgestalteten Käfigen im Vergleich zu Tieren in konventioneller Käfig- und Bodenhaltung. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 90, 257-266.

WILSON, S.C., CUNNINGHAM, F.J., MORRIS; T.R. (1982): Diurnal changes in the plasma concentration of corticosterone, luteinizing hormone and progesterone during sexual development and the ovulatory cycle Khaki Campbell chicks. *J. Endocrinol.* 93, 267.

WINGFIELD, J.C. (1994): Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. In: DAVEY, K.G., PETER, R.E., TOBE, S.S. (Hrsg.): *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Nat. Research Council of Canada, Ottawa, 520-528.

WINGFIELD, J.C., BREUNER, C., JACOBS, J. (1997): Corticosterone and behavioural responses to unpredictable

events. In: HARVEY, S., ETCHES, R.J. (Hrsg.): Perspectives in Avian Endocrinology. Soc. for Endocrinol., Bristol, UK, 267-278.

WINGFIELD, J.C., HEGNER, R.I., LEWIS, D. (1991): Circulating levels of luteinizing hormone and steroid hormones in relation to social status in the cooperatively breeding white-browed sparrow weaver, *Plocepasser mahali*. J. Zool. Lond. 225, 43-48.

WINKLER, J. (1921): Baromfitenyésztés. „Pátria“ Irodalmi Vállalat és Nyomdai Részvénytársaság, Budapest.

WINTER J., BROKKENHEUSER V.D., PONTICORVO L. (1979): Bacterial metabolism of corticoids with particular reference to the 21-dehydroxylation. J. Biol. Chem. 254, 2626-2629.

WISSINK, P.H., DUCRO, B., VAN DER LENDE, T. (2003), Animal Breeding and Genetics group, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University, The Netherlands.

WITTMANN, J. (1994): Endokrinologie des Geflügels. In: DÖCKE, F. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Aufl., Fischer Verlag, Jena, 713-749.

WOLFORD, J.H., RINGER, R.K. (1962): Adrenal weight, adrenal ascorbic acid, adrenal cholesterol and differential

leucocyte counts as physiological indicators of “stressor” agents in laying hens. *Poult. Sci.* 41, 1521-1529.

ZUIDHOF, M.J., ROBINSON, F.E., FEDDES, J.J.R., HARDIN, R.T., WILSON, J.L., MCKAY, R.I., NEWCOMBE, M. (1995): The effects of nutrient dilution on the well-being and performance of female broiler breeders. *Poult. Sci.* 74, 441-454.

10. Danksagung

Mein Dank gilt vor allem all jenen Menschen, die diese Arbeit möglich gemacht haben. Danke an den leider verstorbenen lieben Freund, Herrn Prof. Dr. IVANCSICS János, für die Einführung in das PhD Programm, seine Ideen und seine Hilfe bei dem Start des Projekts. Danke an Frau Kovácsné Prof. Dr. GAÁL Katalin, meine „Doktormutter“ für ihre fachliche Hilfe, ihre liebevolle Betreuung und ihren Beistand.

Danke an Herrn Prof. Dr. NEMENYI Miklós für die Aufnahme in das PhD Programm und die hilfreichen und anregenden „Brainstormings“.

Danke an den Ungarischen Landwirtschaftsminister, Herrn Dr. NÉMETH Imre für die zugesagte Hilfe bei der Ermöglichung dieses Projekts.

Danke an Herrn Prof. Dr. SAS Barnabas und seine Mitarbeiter für die Hilfe bei der Entwicklung der neuen Methode zur Erfassung von Kortikosteron im Eigelb, seinen Rat und seine ehrliche Freundschaft.

Danke an Herrn Dr. SÜTH Miklós, Leiter der Staatlichen Lebensmitteluntersuchungsanstalt in Budapest für die

Erlaubnis, die Eiprüben zu analysieren und die Methode zu entwickeln.

Danke an Herrn Prof. Dr. PALME Rupert, Institut für Biochemie an der Veterinärmedizinischen Universität in Wien für die Analyse der Blutprüben.

Mein größter Dank, jedoch, gebührt meiner Familie – danke an meine Mutter, die mich zu dem Menschen gemacht hat der ich heute bin und mir mit viel Liebe und Geduld und stets aneifernd zur Seite gestanden ist.

Danke an meinen Mann, der mich vorangetrieben und mir in allen Höhen und Tiefen beigegeben hat und der mir durch seine Liebe in schweren Zeiten die nötige Kraft gab weiterzumachen.

Und zu guter letzt: Danke an meinen Vater. Ich weiß, es war Dein größter Wunsch zu sehen, wie ich mein PhD abschließe – leider konntest Du es nicht mehr erleben, aber ich danke Dir für alles - für Deine Liebe, Deinen Ehrgeiz, Deinen Willen mich vorwärts zu bringen und Deine Nachsicht.

Ich widme daher diese Arbeit meinem lieben Vater, und hoffe, ihn damit stolz auf mich machen zu können.