

Aus der Tierklinik für Fortpflanzung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Training von Hunden für Suchaufgaben  
am Beispiel von *Staphylococcus aureus*  
als Mastitiserreger der Milchkuh**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Viviane Theby**  
Tierärztin aus Bad Neuenahr

Berlin 2020  
Journal-Nr.: 4202







Aus der Tierklinik für Fortpflanzung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Training von Hunden für  
Suchaufgaben am Beispiel von  
*Staphylococcus aureus* als  
Mastitiserreger der Milchkuh

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Viviane Theby  
Tierärztin aus Bad Neuenahr

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4202

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: PD Dr. Carola Fischer-Tenhagen  
Zweiter Gutachter: PD Dr. Dorothea Döring  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lars Lewejohann

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

dogs, diary cows, animal behavior, detection, training of animals, mastitis,  
*staphylococcus aureus*

Tag der Promotion: 14.07.2020

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-060-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Der Geruch</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Anatomie der Riechorgane am Beispiel Hund</b>	<b>9</b>
2.2.1 Genetische Ausstattung	9
2.2.2 Die Nase ( <i>Nasus</i> )	10
2.2.3 Das Riechepithel ( <i>Tunica mucosa</i> )	11
2.2.4 Die Riechrezeptoren und der Riechnerv ( <i>Nervus olfactorius</i> )	11
2.2.5 Das Riechhirn	12
<b>2.3 Riechen</b>	<b>13</b>
2.3.1 Strömungsverhältnisse der Luft in der Nase	13
2.3.2 Lokalisierung der Riechrezeptoren	15
2.3.3 Die Schleimschicht	15
2.3.4 Funktionsweise des Riechrezeptors	15
2.3.5 Riechreizschwellen	15
<b>2.4 Suchhunde</b>	<b>16</b>
2.4.1 Suchhunde für Krankheitserreger	20
2.4.2 Geruch und Suche in der Tiermedizin	20
<b>2.5 Training von Suchhunden</b>	<b>20</b>
2.5.1 Der Zielgeruch	21
2.5.2 Das Training	22
2.5.3 Einflussfaktoren auf die Riechleistung der Hunde	23
2.5.3.1 Ablenkungen	23
2.5.3.2 Der Hundeführer	24
2.5.3.3 Verblindung	24
2.5.3.4 Kommunikation und Lernen	25
<b>2.6 Mastitisdiagnostik</b>	<b>25</b>
2.6.1 Anzucht der Infektionserreger auf Nährmedien im Labor	26
2.6.2 Patho-proof™ <i>Mastitis PCR Assay</i>	26
2.6.3 Diagnostik von Erregern anhand flüchtiger Substanzen	27
2.6.3.1 Gaschromatographie mit Massenspektrometer	27
2.6.3.2 Elektronische Nasen	28
<b>2.7 Ziel der Arbeit</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Hunde und Hundeführer</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Geruchsproben</b>	<b>30</b>
3.2.1 Experiment 1	30
3.2.2 Experiment 2	31
3.2.3 Experiment 3	32
3.2.4 Experiment 4	32

<b>3.3 Präsentation der Proben</b>	<b>32</b>
3.3.1 Probengefäße	32
3.3.2 Anordnung der Probengefäße	33
<b>3.4 Training</b>	<b>34</b>
3.4.1 Trainingsprotokoll und –methode	34
3.4.1.1 Experiment 1	34
3.4.1.2 Experiment 2	36
3.4.1.3 Experiment 3	36
3.4.1.4 Experiment 4	37
3.4.2 Trainingsdauer und Durchgänge	38
3.4.3 Belohnungsvarianten im Training	38
<b>3.5 Test</b>	<b>38</b>
3.5.1 Testanordnung	38
<b>3.6 Statistische Analyse</b>	<b>40</b>
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Experiment 1</b>	<b>41</b>
4.1.1 Training	41
4.1.2 Test	42
<b>4.2 Experiment 2</b>	<b>42</b>
4.2.1 Training	42
4.2.2 Test	43
<b>4.3 Experiment 3</b>	<b>44</b>
4.3.1 Training	44
4.3.2 Test	45
<b>4.4 Experiment 4</b>	<b>46</b>
4.4.1 Training	46
4.4.2 Test	46
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Training</b>	<b>48</b>
5.1.1 Trainingsprotokoll	48
5.1.2 Trainingsmethoden in der Sucharbeit	52
5.1.3 Trainingszeiten und Kriterien	53
5.1.4 Trainingsfehler	54
5.1.5 Können der Trainer	55
5.1.6 Kommunikation und Lernverhalten	55
<b>5.2 Der Zielgeruch</b>	<b>56</b>
<b>5.3 Test</b>	<b>59</b>
5.3.1 Anordnung der Probengefäße	59
5.3.2 Einfluss der Hundeführer auf die Leistung des Hundes	59
5.3.3 Verblindung der Hundeführer und Versuchsleiter	60
5.3.4 Andere Einflüsse auf das Testergebnis	61
<b>5.4 Geruch als diagnostische Methode für Erreger</b>	<b>62</b>
5.4.1 Geruch in der Mastitis Diagnostik	63

<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>82</b>
<b>9.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>9.2</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>9.3</b>	<b>Trainingsprotokoll</b>	<b>84</b>
<b>9.4</b>	<b>Trainingsdokumentation</b>	<b>86</b>
	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>93</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>94</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

al.	alii
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
Entero.	Enterokokkus
FN	falsch negativ
FP	falsch positiv
h	Stunde
Hz	Hertz
KbE	Kolonie bildende Einheiten
min.	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mykroliter
mm	Millimeter
nAA	n-Amyloazetat
neg	negativ
PCR	Polymerase chain reaction – Polymerasekettenreaktion
pos	positiv
ppb	parts per billion
ppt	parts per trillion
RN	richtig negativ
RP	richtig positiv
sec	Sekunden
spp	subspecies
Staph.	Staphylokokkus
Strep.	Streptokokkus
v.Chr.	vor Christus
z.B.	zum Beispiel

# 1 EINLEITUNG

Die Arbeit mit Suchhunden ist ein faszinierendes Thema. Bei einem Fachgespräch tiermedizinischer Kollegen kam die Frage auf, in welchem Bereich Suchhunde in der Tiermedizin eingesetzt werden können. Einige wissenschaftliche Arbeiten berichten über Hunde, die in der Brunsterkennung bei Milchkühen eingesetzt werden (Fischer-Tenhagen et al., 2013; Johnen et al., 2015). In der Humanmedizin gibt es Arbeiten zur Krebserkennung und Anzeige von Bakterienbesiedlungen in Krankenhäusern (Chen et al., 2000; Cornu et al., 2011; Ehmann et al., 2012; Bomers et al., 2012). Es entwickelte sich die Frage, ob Suchhunde auch geeignet sind, in Milchproben Erreger der Mastitis zu differenzieren. Mastitiden stellen ein großes Problem in Milchviehbetrieben dar (Krömker und Volling, 2007). Eine der dabei am häufigsten dabei anzutreffenden Bakterienarten ist *Staphylococcus aureus* (Artursson et al., 2010). Da es sich um eine Machbarkeitsstudie handelt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Suchhunde *Staphylococcus aureus* von anderen Erregern der Mastitis in Milchproben differenzieren können.

Durch die Flexibilität ihres Verhaltens und den hochentwickelten Riechsinn sind Hunde ein effektiver und wertvoller Biodetektor (Gazit et al., 2005). Jedoch ist das Training komplex und komplizierter als das Training für andere lerntheoretische Studien. Das Training eines Suchhundes ist bisher eher eine Kunst als eine Wissenschaft. Austausch, Offenheit und Diskussion zwischen Wissenschaftlern und Trainern finden kaum statt (Gazit et al., 2005).

Die Ausbildung von Suchhunden wird sehr uneinheitlich durchgeführt (Schoon, 1996; Johnen et al., 2013). Daher ist auch keine Weiterentwicklung im Sinne von effektiverer Ausbildung über die Jahre festzustellen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit soll darauf liegen, wie ein Trainingsprotokoll aufgebaut wird und welche wichtigen Kriterien ein Protokoll erfüllen muss (Anzahl der Probengefäße, Ablenkungsgerüche, Konzentrationen, Negativanzeigen, usw.). Das Training sollte anhand des Protokolls genau nachvollziehbar sein und mit den meisten Hunden zum Erfolg führen. Damit ist eine Grundlage für darauf aufbauende Arbeiten gelegt. Eine effektivere Weiterentwicklung wäre dann gegeben, wenn in kommenden Versuchen einzelne Trainingsschritte begründet verändert würden.

Da wir durch das Verhalten der Hunde nur indirekt darauf schließen können, was der Hund im Einzelfall genau riecht, ist ein kritisches Hinterfragen an jeder Stelle des Trainings enorm wichtig.

Für das spätere Training und ganz besonders für den Test muss unbedingt doppel blind gearbeitet werden, um eine Beeinflussung der Hunde durch den Menschen zu vermeiden (Lit et al., 2011; Schoon et al., 2014). Dabei darf weder der Hundeführer noch sonst jemand im Raum wissen, welches die positive Probe ist. In der vorliegenden Arbeit soll daher ein

Versuch unternommen werden, zu zeigen wie man Training systematisch aufbaut. Außerdem wird versucht nachzuweisen, dass Hunde *Staphylococcus aureus* in Milchproben in einer Konzentration, wie sie bei an Mastitis erkrankten Kühen vorkommt, riechen, unterscheiden und anzeigen können. Im Speziellen sollen die Hunde (1) *Staphylococcus aureus*, die auf Blutagar kultiviert sind, von *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* unterscheiden; (2) *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* und *Enterococcus* in Milch unterscheiden und (3) *Staphylococcus aureus* in Milchproben von an klinischer Mastitis erkrankten Kühen erkennen.

## **2 LITERATURÜBERSICHT**

In der Literaturübersicht werden zunächst die Eigenschaften des Geruchs, der Aufbau und die Funktion der Nase und das Riechen dargestellt. Dann geht es um Suchhunde und deren Ausbildung mit allen dazugehörigen Aspekten. Schließlich wird noch die Mastitisiagnostik behandelt.

### **2.1 Der Geruch**

Der Geruch ist definiert als „Ausdünstung, Ausströmung, die durch das Geruchsorgan wahrgenommen wird; die Art wie etwas riecht“ (Duden, 2015). Im Gegensatz zum Hören und Sehen gibt es für das Riechen keine physikalische Messeinheit. Beim Sehsinn können Farbspektrum und die Lichtstärke gemessen werden (Skramlik, 1924). Ein Ton kann durch Frequenz und Lautstärke definiert werden (Heffner, 1983). Für Geruch kann nur die Qualität, ob er gerochen wird oder nicht, bestimmt werden (Schoon und Haak, 2002; Gerritsen und Haak, 2010). Gazit et al. (2005) beschreiben Geruch als flüchtige Moleküle, die eine Reaktion im Riechhirn hervorrufen. Sie sind meist lipophil und hydrophob (Gazit et al., 2005). Die geschätzte Anzahl an Molekülen, die von Säugetieren geruchlich wahrgenommen werden kann, reicht von 10.000 (Firestein, 1991) bis zu mehr als 400.000 (Mori und Yoshihara, 1995). Geruch ist in der Biologie von großer Bedeutung. Er vermittelt Informationen über Sozialpartner, Geschlechtspartner, Nachkommen, Freund und Feind sowie Futterqualität und Giftstoffe (Malnic et al., 1999; Kaupp, 2010). Es ist bekannt, dass selbst Zellen über Geruch kommunizieren (Dunny et al., 1995).

### **2.2 Anatomie der Riechorgane am Beispiel Hund**

Bezüglich der Ausprägung des Riechsinnens werden Makrosmaten und Mikrosmaten unterschieden. Hunde haben ein großes Riechepithel und eine außergewöhnliche Riechleistung (Makrosmaten) (Schoon und Haak, 2002). Die Riechleistung der Hunde übersteigt die eines Menschen um das 100.000- bis 1.000.000fache (Tomšič und Mušević, 2013).

### 2.2.1 Genetische Ausstattung

Im Erbgut des Hundes gibt es mehr Gene für den Riechsinn als für jeden anderen der fünf Sinne (Mombaerts, 1999). Jedes Gen kodiert einen bestimmten Riechrezeptor (Quignon et al., 2005). Bei Hunden wurden 1.094 Gene identifiziert, die für die Kodierung von Riechrezeptoren verantwortlich sind. Tatsächlich ist diese Anzahl unabhängig von der Rasse des Hundes. Zuchtselektion auf Riechleistung scheint die Zahl und die Variation der tatsächlich exprimierten Riechrezeptoren zu beeinflussen (Issel-Tarver und Rine, 1996). Im Vergleich hat der Mensch 350 funktionale Riechgene (Glusman et al., 2001). Das Huhn hat 78 funktionale Gene, Schimpansen 450, Frösche 410 (Ache und Young, 2005) und Fische 30 bis 100 (Hildebrand und Shepherd, 1997).

### 2.2.2 Die Nase (*Nasus*)

Die Hundennase besteht aus dem Nasenspiegel (*Rhinarium*) mit 2 Nasenöffnungen (*Nares*), durch die Luft und Geruchsmoleküle eingeatmet werden (Tomšič und Mušević, 2013). Die Nase ist durch das *Septum nasale* in zwei symmetrische Teile getrennt. Am weitesten rostral befindet sich der Nasenvorhof (*Vestibulum nasale*) (Craven et al., 2009). Weiter caudal liegt die respiratorische Region mit den dorsalen und ventralen *Conchae nasales*, wobei die ventralen sich nach hinten verzweigen (Negus et al., 1960). Caudal der respiratorischen Region liegt der olfaktorische Anteil der Nase. Die *Concha ethmoidale* besteht aus Ausbuchtungen der Siebplatte, wodurch eine große Oberfläche für die Verarbeitung der Geruchsmoleküle vorhanden ist. Die Ethmoidalregion ist von der Oberfläche etwa doppelt so groß wie die ventrale Nasenmuschel (ventrale *Concha nasale*) (Craven et al., 2007).

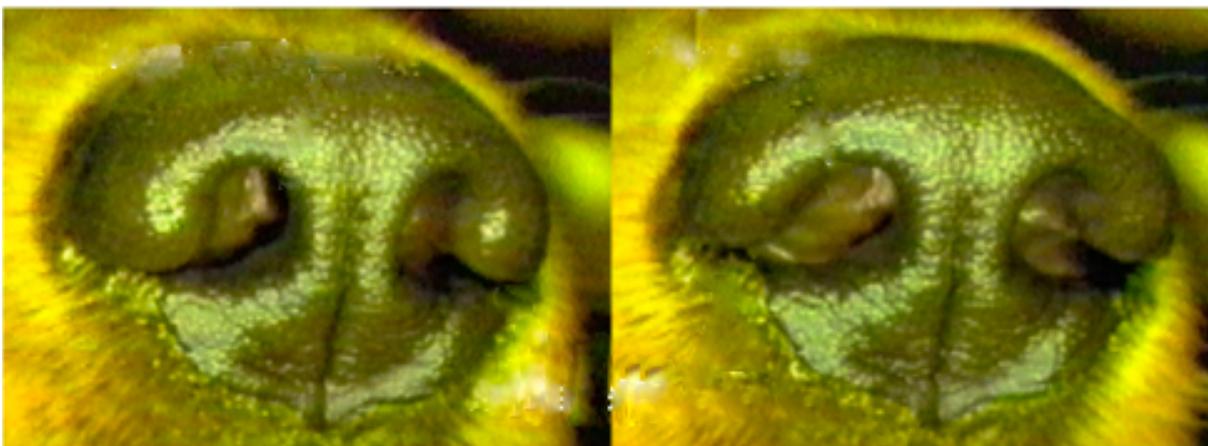


Abbildung 1: Nasenspiegel des Hundes während des Einatmens (links) und Ausatmens (rechts) (Settles, 2003)

### 2.2.3 Das Riechepithel (*Tunica mucosa*)

Das Riechepithel befindet sich im dorso-caudalen Bereich der Nasenhöhle (Abbildung 2, Craven et al., 2010). Bei einem Deutschen Schäferhund umfasst es die Fläche von 150 - 170 cm<sup>2</sup>, verglichen mit 5 bis 10 cm<sup>2</sup> beim Menschen (Rouquier et al., 2000; Schoon und Haak, 2002). Es gibt jedoch keinen nachgewiesenen Zusammenhang zwischen der Größe des Riechepithels und der Riechleistung. Das Riechepithel besteht aus mindestens 6 morphologisch und biochemisch zu unterscheidenden Zellen (Huard et al., 1998). Die 3 wichtigsten Zellentypen sind die Riechzellen, die Basalzellen und die Stützzellen (Lancet, 1986).

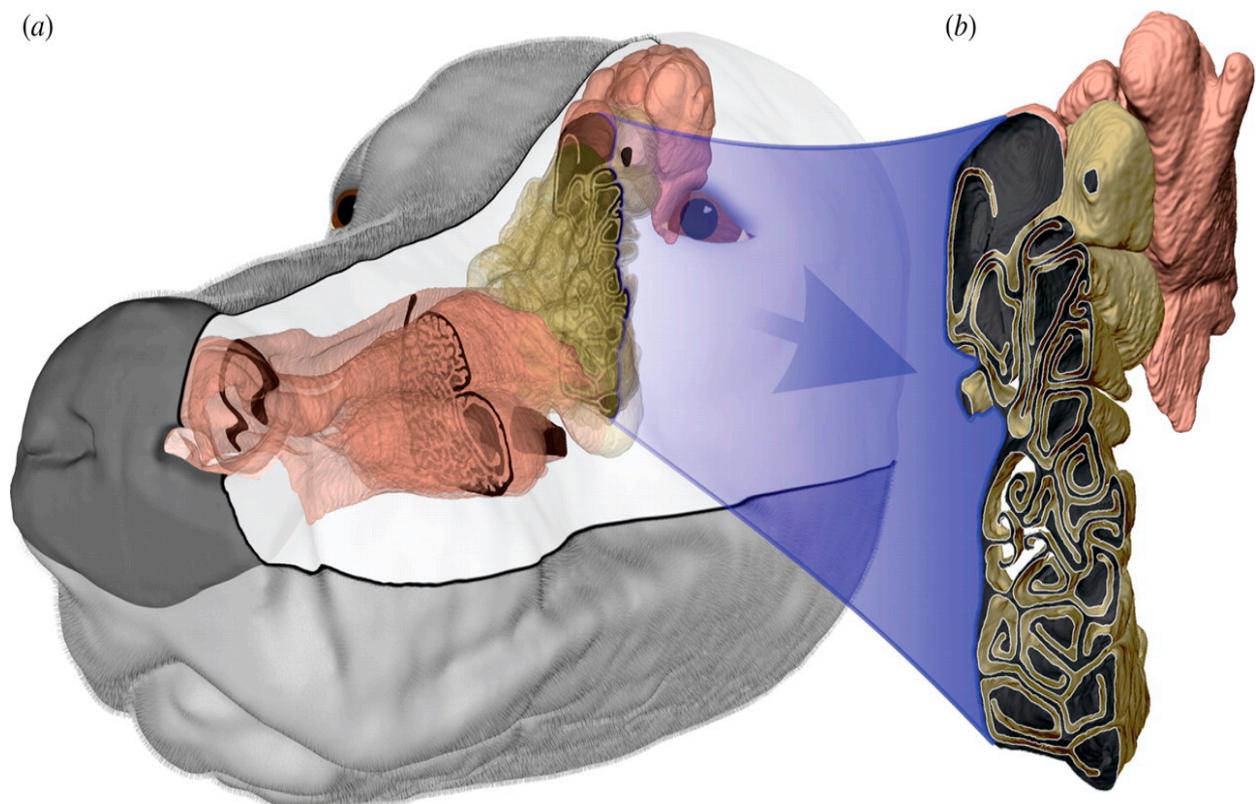


Abbildung 2: Die knöchernen Strukturen der Nasenregion in dreidimensionaler Darstellung (a) die Lage im Hundekopf und b) der Querschnitt vergrößert (Craven et al., 2010)

### 2.2.4 Die Riechrezeptoren und der Riechnerv (*Nervus olfactorius*)

Riechrezeptoren sind Chemorezeptoren, die spezifisch sind für Geruchsmoleküle (Rouquier et al., 2000; Craven et al., 2007). Die Riechrezeptoren befinden sich mit den Basalzellen und den leicht bräunlich pigmentierten Stützzellen auf der Basalmembran der Riechschleimhaut

(Nickel et al., 1992), (Abbildung 3). Riechrezeptoren ragen in die von der Riechschleimhaut gebildeten Schleimschicht und sind Teil von bipolaren Nervenzellen, deren marklose Neuriten zur *Lamina cibrosa* ziehen. Die Neurite der Riechrezeptoren bilden den Riechnerven, den *N. olfactorius*.

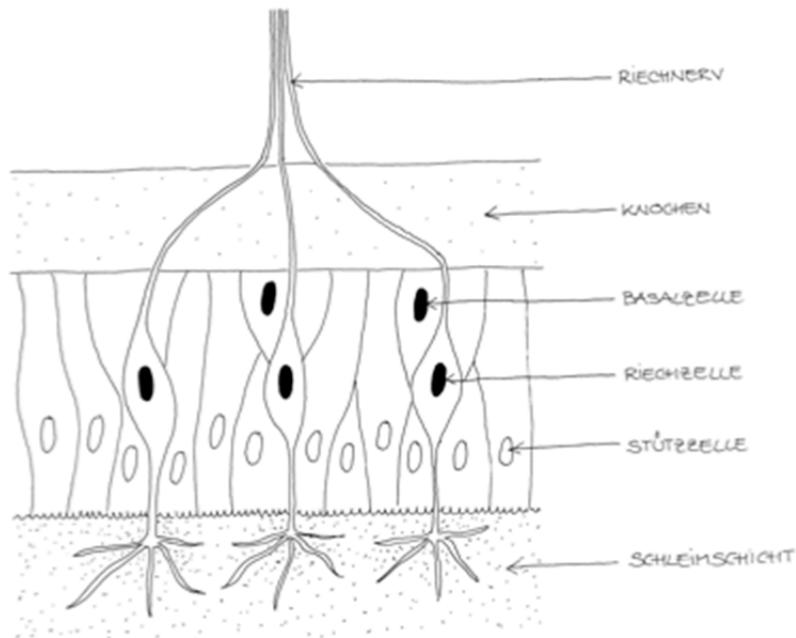


Abbildung 3: Das Riechepithel (Theby und Hares, 2013)

Riechrezeptoren sterben nach ca. 30 bis 60 Tagen ab. Es werden neue Rezeptoren aus den Basalzellen gebildet. Die Neubildung der Riechrezeptoren wird durch die Geruchsmoleküle gesteuert, mit denen das Tier zur Zeit der Bildung in Kontakt kommt. Wird ein Hund auf einen bestimmten Geruch trainiert, dann werden mehr für diese Geruchsmoleküle spezifische Riechrezeptoren gebildet (Schoon und Haak, 2002). Es konnte diese Stimulus-induzierte Plastizität bei Mäusen (Wang et al., 1993) und Ratten (Youngentob and Kent, 1995) im Versuch nachgewiesen werden.

### 2.2.5 Das Riechhirn

Die Anteile des Gehirns beim Hund, die mit der Verarbeitung der olfaktorischen Informationen befasst sind, sind größer als beim Menschen. Obwohl das Gehirn des Hundes nur etwa 10 % der Größe des menschlichen Gehirns hat, ist das Riechhirn 40 x größer im Vergleich zum Menschen (Tomšič and Muševič, 2013). Im Riechhirn befinden sich *Glomerula*, die von Neuriten mehrerer Tausend Riehzellen mit Rezeptoren vom selben Typ, aber von unterschiedlichen Orten auf der Riechschleimhaut gebildet werden (Goldblatt et al.,

2009). Diese Anzahl an *Glomerula* ist mit der Anzahl Gerüche korreliert, die das olfaktorische System selektiv binden kann (Goldblatt et al., 2009). Die Entwicklung und Ausprägung der *Glomerula* wird von den Gerüchen bestimmt, denen das Tier ausgesetzt ist. Trainiert man einen Hund auf einen bestimmten Geruch, wird das entsprechende *Glomerulum* stärker ausgebildet (Takiguchi et al., 2008).

## 2.3 Riechen

Um Gerüche wahrzunehmen, muss eine Interaktion zwischen den Geruchsmolekülen und den spezifischen Riechrezeptoren stattfinden. Dieser Reiz wird an die zentralen Strukturen im Gehirn weitergeleitet (Lledo et al., 2005). Wie genau das Riechen auf Rezeptorebene funktioniert, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt (Brookes et al., 2012).

### 2.3.1 Strömungsverhältnisse der Luft in der Nase

In der Luft befindliche Geruchsmoleküle müssen an die Riechschleimhaut gelangen. Die Atemfrequenz des Hundes beträgt in Ruhe 15/min, in Bewegung 30/min und steigt beim Schnüffeln bis auf 140 bis 200/min (Schoon und Haak, 2002). Hornung (2006) beschreibt, dass Hunde mit einer Frequenz von 4 bis 7 Hz (240 – 420/min) unabhängig von der Körpergröße schnüffeln. Der Mensch kommt beim „Schnüffeln“ auf eine Frequenz von 0,3 – 0,7 Hz.

Beim Einatmen wird die Luft im unmittelbaren Umkreis der Nasenflügel angesogen. Die Nase zieht Geruchsmoleküle etwa aus einer Entfernung von einem Zentimeter (Abbildung 4) an. Diese Reichweite ist dabei kleiner als der Abstand der Nasenlöcher, so dass jedes Nasenloch Luft von einem räumlich versetzten Umfeld ansaugt (Abbildung 4). Diese Tatsache ist wichtig für die Lokalisation einer Geruchsquelle (Craven et al., 2010). Die eingeatmete und ausgeatmete Luft werden über verschiedene Wege in der Nasenhöhle geleitet (Settles et al., 2003).

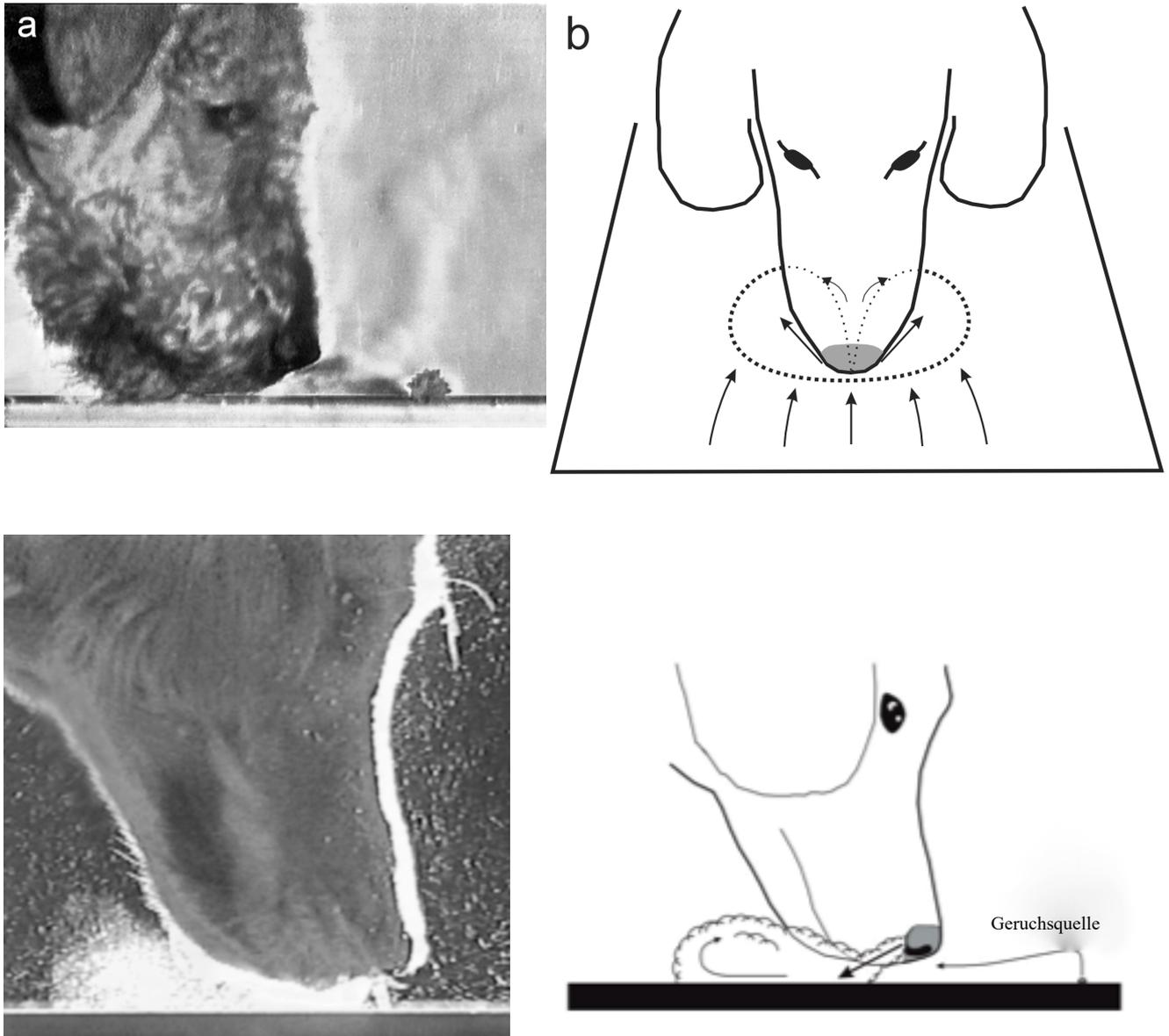


Abbildung 4: Der Luftstrom bei der Ein- (a) und Ausatmung (b) beim Schnüffeln eines Geruches (Settles et al., 2003)

Beim Ausatmen wird die Luft bedingt durch die Form der Nasenöffnung nach ventrolateral ausgestoßen. So wird der schon abgeschnüffelte Bereich noch einmal mit der ausgeatmeten Luft beströmt. Durch die angewärmte Luft können zusätzliche Geruchsmoleküle aufgefangen werden, während der Raum unmittelbar vor der Nase dadurch nicht beeinflusst wird (Abbildung 4). Nach Passieren der Nasenöffnung gelangt die Luft in das *Vestibulum nasi*. Durch Turbulenzen in der Nasenhöhle wird die Luft vermischt. So gelangt ein die Geruchsverhältnisse repräsentierender Anteil über den *Meatus dorsale* mit hoher Geschwindigkeit zum hinteren Teil der Nasenschleimhaut. Dort macht die Luft eine 180° - Wendung und wird dann langsam durch das Labyrinth der Riechgänge gefiltert. So wird die Kontaktzeit der Geruchsmoleküle mit der Riechschleimhaut in die Ausatemungsphase hinein verlängert.

### 2.3.2 Lokalisierung der Riechrezeptoren

Riechrezeptoren für spezifische Moleküleigenschaften sind auf der Riechschleimhaut unterschiedlich lokalisiert. So liegen die Riechrezeptoren, die spezifisch für leicht lösliche und flüchtige Moleküle sind, vorwiegend in der Nähe der Nasenlöcher in der Riechschleimhaut. Riechrezeptoren für unlösliche (lipophile) Moleküle liegen weiter caudal (Lawson et al., 2012). Das garantiert, dass die flüchtigen hydrophilen Moleküle früh abgefangen und wahrgenommen werden, bevor sie verflüchtigt sind.

### 2.3.3 Die Schleimschicht

In der Schleimschicht befinden sich unter anderem sogenannte Geruchsbindungs-Proteine (Buck, 1996). Es wird vermutet, dass Moleküle sich an diese binden und so den Riechrezeptoren „präsentiert“ werden. Ein Molekül benötigt 0,1 s um durch die Schleimschicht zu diffundieren. Am Riechrezeptor verweilt es nur 0,001 s, bevor es entweder durch die Proteine gebunden oder durch Enzyme abgespalten wird. Die Bindung an Proteine ist besonders für Gerüche in geringer Konzentration bedeutsam (Lawson et al., 2012).

### 2.3.4 Funktionsweise des Riechrezeptors

Die Übertragung und Verarbeitung der Gerüche erfolgt über G-Protein-Aktivierung und Stimulation der Adenylatzyklase. Die dadurch entstehenden Aktionspotentiale werden zu den *Glomerula* weitergeleitet, wo die Information noch einmal umgeschaltet wird, um dann in das Riechhirn zu gelangen (Mombaerts, 1999). Jedes Geruchsmolekül hat mehrere Bindungsstellen, die unterschiedliche Rezeptoren aktivieren können (Mombaerts, 1999). Dadurch stimuliert ein einzelnes Geruchsmolekül eine ganz bestimmte Gruppe von Rezeptoren. Malnic et al. (1999) haben Riechrezeptoren von Mäusen isoliert und konnten spezifische Aktivitätsmuster der Riechrezeptoren bei verschiedenen Molekülen nachweisen. Nicht nur mit der Qualität des Geruchsmoleküls sondern auch mit der Konzentration ändert sich dieses Aktivitätsmuster der Riechrezeptoren (Malnic et al., 1999; Tonosaki et al., 1985). Das könnte erklären, warum Hunde beim Training Geruchsstoffe in unterschiedlicher Konzentration als unterschiedliche Gerüche wahrnehmen (Oxley und Waggoner, 2009).

### 2.3.5 Riechreizschwellen

Jedes sensorische System braucht ein Minimum an physikalischer Stimulation, damit der Stimulus überhaupt erkannt werden kann. Unter diesem Limit ist der Reiz nicht wahrnehmbar

(Helton, 2009). Die Reizschwellen sind spezifisch für einzelne Gerüche (Helton, 2009), je nach evolutionärer Bedeutung dieses Geruchs für eine Tierart (Goldblatt et al., 2009). Für Benzoate, Cyclohexanone und Nitroglycerin wurden für den Hund Reizschwellen von 10 ppb (parts per billion) nachgewiesen (Johnston, 1999). Walker et al. (2006) fanden Reizschwellen für n-Amyl-Acetat von 1 - 2 ppt (parts per trillion).

Die Reizschwellen für einen Geruch können beim Training durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Goldblatt et al. (2009) beschreiben die Art der Verstärkung, die Belohnungsrate, Verstärkungspläne, mögliche Signale, den Kontext und Krankheiten als mögliche Faktoren. Die Veränderungen können auf allen Ebenen des Riechvorganges nachgewiesen werden: Es gibt mehr Riechrezeptoren, größere *Glomerula* und Veränderungen im Gehirn (Schoon und Haak, 2002) durch z.B. vermehrte Neurotransmitterbildung.

### **2.4 Suchhunde**

Schon lange machen sich die Menschen die Riechleistung der Hunde zunutze. So werden Hunde seit über 12.000 Jahren als Jagdgehilfen eingesetzt (Furton und Myers, 2001; Lorenzo et al., 2003). In Tabelle 1 sind die Einsatzgebiete von Hunden in der Sucharbeit zusammengefasst. Neben militärischen Aufgaben, der Vermisstensuche und Suchaufgaben in Umwelt und Naturschutz gibt es zahlreiche Suchaufgaben im medizinischen Bereich (Browne et al., 2006). Die Möglichkeit, dass Suchhunde Krebs bei Menschen anhand spezifischer Gerüche erkennen können, spiegelt sich in zahlreichen Publikationen zu diesem Thema wieder (Bijland et al., 2013).

Leider sind die Studien nicht nach einem Standard durchgeführt und von daher kann man sie nicht vergleichen. Die Angaben sind zu unterschiedlich, was auch Johnen (2013) feststellte.

Tabelle 1: Einsatzgebiet für Suchhunde mit Anzahl der Hunde (ursprünglich/am Ende), Trainingszeit, Verblindung und Genauigkeit entweder in Anzahl positiv angezeigter Proben an vorhandenen Proben oder Sensitivität und Spezifität

<b>Einsatzgebiet</b>	<b>Anzahl der Hunde</b>	<b>Trainingszeit</b>	<b>Einfach- /Doppel- blind</b>	<b>Genauigkeit</b>	<b>Quelle</b>
<b>Militärisch</b>					
Landminensuche	2/5	5 Monate	?	16- 80,9 % <sup>1</sup>	Breland und Bailey, 1971
Minensuche (Labor)	4/6	4,5 Monate 5 Tage/Woche	?	ca. 90 %	Fjellanger et al., 2002
Drogensuche	164	?	Ja/Nein	70,3–91,8 % <sup>2</sup>	Jeziarski et al., 2014
Sprengstoffsuche	?	?	?	?	Furton and Myers, 2001
Geruchsspurenvergleich	?	?	?	?	Schoon und Haak, 2002
Brandbeschleuniger	?	?	?	?	Gialamas und Justice, 1996
Waffenlagersuche	?	?	?	?	National Detector Dog Manual, 2003
Banditensuche	?	?	?	?	National Detector Dog Manual, 2003
<b>Vermisstensuche</b>					
Rettungshund	10	?	?	76,4 %	Greatbatch at al., 2015
Mantrailer	7	18 Monate	Ja/?	82 %	Woidtke at al., 2018
Leichenspürhunde	8	2 Monate	Ja/?	55- 95 % <sup>3</sup>	Komar, 1999
<b>Naturschutz</b>					
Termitensuche	6	Tägl. 3 Wochen bis 3 Monate	?	95,93 %	Brooks et al., 2003

Literaturübersicht

Schraubenwurmflye	1	5 Monate	?	99,7 %	Welch, 1990
Feuerameisen	3	?	Ja/Ja	98 %	Lin et al., 2011
Bettwanzen	4/7	3 Monate	?	97,5 %	Pfiester et al., 2008
Bettwanzen	11	variabel	Ja/Ja	10-81%	Cooper et al., 2014
Rote Palmen Rüsselkäfer	3/4	3 x tägl. 3 Monate	Ja/?	78 %	Suma et al., 2014
Frettchensuche	2/4	?	Ja/?	84 %	Reindl, 2004
Wüstenschildkröten	2/5	4 Wochen	?	88 / 93 %	Cablk et al., 2006
Wüstenschildkröten	6/10	10 Wochen	?	80 %	Nussear et al., 2008
Ratten und Mäuse	2	?	?	80-87 %	Gsell et al., 2010
Wal Kot	2	?	?	?	Rolland et al., 2006
Hummelnester	1	3 Monate	Ja/?	100 %	Waters et al., 2011
Fuchs Kot	4	?	?	100 %	Smith et al. 2003
Bären Kot	9/?	?	Ja/?	90 %	Wasser et al., 2004

**Medizinische Indikationen**

Hypoglykämie	3	ohne	?	Einzelfälle	Chen et al., 2000
Blasenkrebs	10	?	?	41 %	Willis et al., 2004
Melanom	2	?	Ja/?	75-85 %	Pickel et al., 2004
Ovarkarzinom	1	12 Monate	Ja/Ja	100 % sens. 97,5 % spez.	Horvath et al., 2008
Prostatakrebs	1	16 Monate	Ja/Ja	91 % sens. 91 % spez.	Cornu et al., 2011

<b>Pathogene</b>					
Nematoden in Schafskot	1	6 Monate	?	85-97,5 %	Richards et al., 2008
BVD-Viren	2	2 Monate	Ja/Nein	98,1/99,3 % spez. 85,0/96,7 % sens.	Angle et al., 2016
<i>Streptomyces spp.</i> in Gebäuden	2	3 Monate	Ja/?	75 %	Kauhanen et al., 2002
Resistente <i>Staphylococcus aureus</i>	1 <sup>1</sup> "several"	1,5 Jahre	Ja/Ja	83-96 % spez. 75-97 % sens.	Koivusalo et al., 2017
<i>Clostridium difficile</i> als Krankenhauskeim	1	2 Monate	Ja/?	98 % spez. 83 % sens.	Bomers et al., 2012
Wasserqualität der Fischzucht	3/6	?	?	30-95 %	Shelby et al., 2004
Laubbaum-Schadinsekten	?	?	?	?	Hoyer-Tomiczek und Sauseng, 2009
<b>Sonstiges</b>					
Versteckte Korrosion	5	2 Jahre	Ja/Ja	92 % sens. 93 % spez.	Schoon et al., 2014
Brünstigkeit bei Kühen	7	7 Tage	Ja/?	80,3 % sens. 97,0 % spez.	Fischer-Tenhagen et al., 2011

<sup>1</sup> Je nach Tiefe

<sup>2</sup> Je nach Stoff

<sup>3</sup> Je nach Hund

#### 2.4.1 Suchhunde für Krankheitserreger

Bezüglich Erregerdiagnostik veröffentlichten Kauhanen et al. (2002) eine Studie zu Schimmelsuchhunden. In dieser Studie identifizierten 2 Hunde Proben, die *Streptomyces spp.* enthielten mit einer Sensitivität von 75% und einer Spezifität von 90%. Bomers et al. (2012) trainierten einen Beagle erfolgreich *Clostridoides* (früher: *Clostridium*) *difficile* im Krankenhaus zu detektieren.

Koivusalo et al. (2017) trainierten ebenfalls Hunde Staphylokokken anzuzeigen und sogar verschiedene Stämme zu unterscheiden. Allerdings wurden nur von einem Hund (dem erfolgreichsten) Werte veröffentlicht. Dieser zeigte nach 16 – 24 h Inkubation eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 92%. Nach 4 h Inkubation lagen die Werte zunächst bei 75% Sensitivität und 83% Spezifität. Nach weiterem Training wurden 93% Sensitivität und 93% Spezifität erreicht. Nach 0 h Inkubation lagen die Werte bei 92% Sensitivität und 96% Spezifität. Über Training und Durchführung des Testes wird in der Studie nicht viel angegeben.

#### 2.4.2 Geruch und Suchhunde in der Tiermedizin

Schon 400 v. Chr. weist Hippocrates auf die Bedeutung des Geruchs für diagnostische Zwecke hin. Aber die industrielle und technische Revolution führten dazu, dass der Geruch weitgehend vernachlässigt wurde (Pavlou und Turner, 2000).

Die Beurteilung von Gerüchen ist Bestandteil der klinischen Untersuchung eines Patienten (Dirksen, 2006). Bei der Beurteilung des Schweregrades von Metritiden ist der Geruch des Vaginalsekretes von hoher diagnostischer Bedeutung (Sannmann et al., 2012).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Hunde die Brunst von Kühen mit hoher Sensitivität und Spezifität (> 80 %) anzeigen können (Kiddy et al., 1978; Fischer-Tenhagen et al., 2011; Johnen et al., 2015). In einer weiteren Studie wurden Hunde für die Diagnose von Nematoden im Schafskot trainiert (Richards et al., 2008).

### 2.5 Training von Suchhunden

Bei der Ausbildung der Hunde für die Sucharbeit müssen 3 Aspekte besonders beachtet werden. 1. Der Zielgeruch einschließlich seiner Präsentation, 2. das Training selbst und 3. mögliche Faktoren, die die Riechleistung beeinflussen können.

### 2.5.1 Der Zielgeruch

Der Zielgeruch ist der Geruch, den die Hunde erkennen und anzeigen sollen. Leider ist über die Geruchswahrnehmung noch wenig bekannt, daher muss in einigen Punkten mit Annahmen und Versuch und Irrtum gearbeitet werden. Schon die Wahl eines Zielgeruchs als Trainingssubstanz ist eine Herausforderung. Rauschmittel oder auch Sprengstoffe zum Beispiel enthalten verschiedene chemische Substanzen und deren Trägerstoffe (Jeziński et al., 2014). Ob Hunde die Geruchsmoleküle der Trägersubstanz oder der chemischen Hauptkomponente zur Identifikation des Stoffes nehmen ist nicht bekannt. Die „chemische Identität“ eines Materials ist also nicht automatisch identisch mit der „geruchlichen Identität“ (Lorenzo et al., 2003). Methylbenzoat ist in chemischen Analysen von Kokain die dominierende flüchtige Komponente. Da Methylbenzoat auch in anderen Pflanzen vorkommt, wurde die Anzeige durch Hunde vor Gericht als Beweis für Kokainfund angezweifelt. Cerreta und Furton (2015) haben daraufhin untersucht, ob geprüfte Drogensuchhunde auch Pflanzen anzeigen, die Methylbenzoat enthalten. Die Hunde haben diese Pflanzen jedoch nicht angezeigt. Es scheint, dass die Hunde Kokain auch anhand anderer Geruchsmoleküle identifizieren. Es wurde versucht einen Trainingsgeruch aus den 5 flüchtigen Substanzen von Marihuana herzustellen. Geprüfte Drogensuchhunde zeigten diesen Trainingsgeruch jedoch nicht an, was die Schwierigkeit deutlich macht, die Geruchsmoleküle zu identifizieren, durch die ein Hund einen Stoff erkennt (Macias et al., 2008). Ähnliche Versuche wurden mit Sprengstoffspürhunden gemacht (Kranz et al., 2014).

Bei anderen Einsatzgebieten ist der gesuchte Geruch chemisch sogar unbekannt, wie beispielhaft bei der Anzeige von Tumoren in Atemluft oder bei Brunstgeruch von Kühen (Fischer-Tenhagen et al., 2011; Ehmman et al., 2012). In diesem Fall wird mit Proben trainiert, von denen angenommen wird, dass der Geruch enthalten ist. Diese werden Proben gegenübergestellt, die den Geruch nicht enthalten sollen (z. B. Proben von gesunden und von an Krebs erkrankten Menschen).

Hinzu kommt, dass Geruch vielfältigen Veränderungen unterworfen ist. Am menschlichen Geruch wurde gezeigt, dass er von der Tageszeit, der Luftzirkulation, der Temperatur, der Umgebung und der Feuchtigkeit abhängig ist (Prada, 2011).

Bei der Gewinnung von Geruchsproben muss darauf geachtet werden, keine systematischen Fehler zu machen. Werden z.B. Geruchsproben von Krebspatienten immer in einer Klinik gewonnen und die Proben der gesunden Menschen in einer anderen Umgebung, ist es wahrscheinlich, dass die Hunde Bestandteile der Klinikluft als Unterscheidungsmerkmal verwenden (Johnen et al., 2017).

Die Lagerung sollte den Geruch möglichst wenig verändern. Goss (2016) empfiehlt Glasbehälter mit Aluminiumverschluss. Diese sollen weitgehend inert für Gerüche sein. Einfrieren scheint keinen Einfluss auf den Geruch zu haben. In einem Versuch mit elektronischen Nasen, war der Unterschied zwischen eingefrorenen und frischen Proben gering (Sannmann et al., 2013). Bei der Lagerung mit Kunststoffen oder Verschlüssen mit Lösungsmitteln, muss beachtet werden, dass sich der Zielgeruch mit Gerüchen dieser Materialien vermischt (Goss, 2016).

Wie oben beschrieben (Kapitel 2.5.1) könnte der Hund den Geruch optimal wahrnehmen, wenn er direkt daran riechen kann (Prada, 2010). Das ist jedoch aus praktischen und hygienischen Gründen häufig nicht möglich. Daher muss der Geruch zur Präsentation gesammelt werden. Dafür werden sterile Baumwolltupfer oder spezielle Vliese (Schallschmidt et al., 2015) verwendet, die den Geruch aufnehmen und langsam wieder abgeben. Die Tupfer werden entweder direkt auf die Geruchsquelle gelegt oder in ihre unmittelbare Nähe (Prada, 2010). Dafür gibt es leider keine standardisierten Verfahren. So benutzt z.B. das FBI Johnson & Johnson sterile Gazetupfer, während die holländische Polizei Tupfer aus King's Cotton verwendet, die nicht steril sind (Schoon and Haak, 2002). Prada (2010) hat eine Übersicht über verschiedene Textilien und deren Einfluss auf die Freigabe von Gerüchen zusammengestellt.

### 2.5.2 Das Training

In einer systematischen Literaturanalyse von 14 Veröffentlichungen fanden Johnen et al. (2013), dass Training und Testen von Suchhunden große Unterschiede in der Methodik und Qualität aufwiesen.

Schon 1965 beschrieb Skinner, dass mit der experimentellen Verhaltensanalyse die Grundlage geschaffen wurde, Protokolle zum Training zu erstellen. Die Gruppe um die Brelands (1951) waren die ersten, die wissenschaftlich validierte Methoden im Training verwendeten (Bailey and Gillaspay, 2005). Es besteht ein deutlicher Unterschied zwischen Training und wissenschaftlicher Verhaltensanalyse (Morris, 2003). Auch professionelle Hundetrainer sind sich der wissenschaftlichen Definitionen von in der Verhaltensanalyse klar definierten Prozessen nicht bewusst und darüber einig (Dorey and Cox, 2018). Entsprechend große Unterschiede gibt es in der Anwendung (Feng et al., 2018). Das ist auch in wissenschaftlichen Arbeiten zum Training von Suchhunden nicht anders (Schoon, 1996). Als Trainingsgrundlage ist in vielen Studien die positive Verstärkung beschrieben. Bei der positiven Verstärkung wird der Hund für richtiges Verhalten belohnt. Damit wird die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Verhalten erneut gezeigt wird, erhöht (Skinner, 1951). Nach Walker et al. (2006) haben Trainingsmethoden, die auf positiver Verstärkung beruhen, einen

deutlichen Vorteil zu denen, die auf aversiven Techniken basieren. In ihrer Studie trainierten die Autoren Hunde n-Amyloazetat (nAA) mittels positiver Verstärkung als Zielgeruch anzuzeigen. Die Hunde konnten die Substanz in einer um 20.000fach niedrigeren Konzentration riechen als in einer Studie von Krestel et al. (1984), bei der Elektroschock und Wasserdeprivation zum Training verwendet wurden. Mit Training über positive Verstärkung konnte im Vergleich zu einer Kombination von positiver und negativer Verstärkung eine größere Exaktheit und Schnelligkeit der Lösung der Trainingsaufgabe erreicht werden (Murrey, 2007).

Die Trainingsdauer könnte einen Hinweis auf Trainingseffektivität oder Schwierigkeitsgrad der Riechaufgaben geben. In verschiedenen Studien variiert die Trainingsdauer von mehreren Tagen (Fischer-Tenhagen et al., 2011) bis zu 16 Monaten (Cornu et al., 2011). Der Einfluss der Erfahrung und Qualifikation der Trainer ist ebenfalls schwer zu bewerten, da es keine verlässliche Bewertung von Trainerqualifikation gibt (Johnen et al., 2013). Die Qualifikation der Trainer könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Trainingsdauer haben. Roth (2012) beschreibt in ihrer Arbeit über Training von Javaaffen (*Macaca fascicularis*), wie ein Trainingsfehler zu einer längeren Trainingszeit geführt hat. Sie hat ein Trainingsprotokoll erstellt mit dem Ziel, Affen ohne Zwangsmaßnahmen telemetrieren zu können. Es sollte dazu dienen physiologische Werte auf Entfernung erfassen zu können.

Die Geruchswahrnehmung und das damit verbundene Lernen findet für den Hundetrainer nicht sichtbar im Gehirn statt (perceptual learning) (Wilson, 2003). Damit weiß der Hundetrainer nicht, was der Hund gerade lernt. Dies ist eine Herausforderung bei dem Training einer Suchaufgabe im Vergleich zu Verhalten, das beobachtet (z.B. hinsetzen, hinlegen) und gegebenenfalls korrigiert werden kann. Es muss kritisch hinterfragt werden, ob der gesuchte Geruch der diskriminative Stimulus ist oder ein anderer Reiz, wie z.B. ein weiterer anwesender Geruch oder sonstige Zeichen aus der Umgebung oder vom Hundeführer (Theby und Hares, 2013).

### 2.5.3 Einflussfaktoren auf die Riechleistung der Hunde

#### 2.5.3.1 Ablenkungen

Identische Reize können je nach Konzentration auf die Aufgabe unterschiedlich verarbeitet und wahrgenommen werden (Zelano und Sobel, 2005). Es wurde gezeigt, dass die Konzentration auf eine bestimmte Aufgabe mit einer gesteigerten Aktivität der Neuronen, die mit dieser Aufgabe beschäftigt sind, einhergeht (Spitzer et al., 1988). So steigerten Ratten ihre Riechfrequenz und ihre Fähigkeit Gerüche zu erkennen, wenn sie eine positive hypothalamische Stimulation bekamen (Clarke et al., 1971). Die Trainingsumgebung sollte

so gestaltet werden, dass die Hunde wenig Ablenkung erfahren und sich auf das Riechen konzentrieren können.

### 2.5.3.2 Der Hundeführer

Bei Suchhunden hängt der Erfolg der Suche zum einen von den Riechfähigkeiten des Hundes ab, aber auch von der Interpretation des Hundeverhaltens durch den Hundeführer (Concha et al., 2014). Viele falsch positive oder falsch negative Anzeigen werden durch den Hundeführer verursacht (Bird, 1996; Hunter, 2002; Jezierski et al., 2014). Falsch positive Anzeigen können zum einen durch falsches Training verursacht werden. Der Hundeführer kann aber auch durch sein Verhalten den Hund zu einer falschen Anzeige bewegen, da Hunde sehr sensibel auf Körpersprache des Menschen reagieren (Lasseter et al., 2003; Wasser et al., 2004; Lit et al., 2011).

### 2.5.3.3 Verblindung

Hunde können sehr sensibel auf die Körpersprache des Menschen reagieren (Lasseter et al., 2003). Deshalb ist es besonders wichtig, schon im Training den Geruch doppelt blind zu trainieren. Doppelt blind zu trainieren heißt, dass weder Hundeführer noch Hundetrainer den Ort des Zielgeruches kennen (Bird, 1996). So wird sichergestellt, dass der Hund durch Riechen den Geruch findet und nicht durch Beobachtung des Hundeführers.

Lit et al. (2011) haben festgestellt, wie sehr die Hundeführer das Suchergebnis der Hunde beeinflussen, wenn sie vermeintlich wissen wo der Zielgeruch ist, was dann auch zu falsch positiven Anzeigen führte. Auch bei Hunden, deren Anzeigeverhalten bei Gericht verwendet werden soll, ist dieses Problem bekannt (Myers, 2006).

In vielen Studien wurde das entweder nicht beachtet oder es ist aus der Veröffentlichung nicht zu erkennen (Johnen et al., 2013).

In der Ausbildung der Hunde geht es darum, dass sie einen diskriminativen Stimulus für ihr Verhalten lernen. Dieser diskriminative Stimulus sollte natürlich in diesem Fall der zu suchende Geruch sein. Wenn der Hundeführer oder ein anderer im Raum weiß, wo die positive Probe ist, dann ist die Gefahr von gleichbleibenden aber für den Menschen unbewussten Signalen sehr hoch, die der Hund dann verknüpfen könnte. Hunde reagieren sehr sensibel auf menschliche Körpersprache, wie Handsignale, Ausrichtung des Körpers oder Blickrichtungen (Soproni et al., 2002; Virányi et al., 2004; Ruffman et al., 2011).

#### 2.5.3.4 Kommunikation und Lernen

Die ethologische Definition von Kommunikation beinhaltet einen Sender, der durch ein spezielles Verhalten (Signal) den inneren Status des Empfängers verändert (Krebs und Davis, 2009). In der Lernpsychologie wird Kommunikation als eine Serie von aneinandergereihten Verhaltensantworten gesehen. Man hat das Signal als diskriminativen Stimulus, das den Empfänger dazu veranlasst, ein bestimmtes Verhalten zu zeigen. Dieses Verhalten schafft einem oder beiden Tieren einen Vorteil (Skinner, 1953). Dabei ist wichtig zu verstehen, dass die Signale in der Kommunikation zwischen Spezies unterschiedliche Rollen spielen. Daher ist es auch sehr schwer Lernstudien, bei denen Menschen und Hunde involviert sind, experimentell zu kontrollieren (Miklósi, 2009).

Bei sozial lebenden Arten ist das Lernen durch Andere sehr wichtig um in der Umwelt zurechtzukommen (Elgier et al., 2009). Assoziatives Lernen spielt dabei eine große Rolle (Bentosela et al., 2009). Szetei et al. (2003) haben in einem Objekt Choice Test herausgefunden, dass Hunde Geruch nutzten, um verstecktes Futter zu finden. Wenn aber Signale durch den Menschen gegeben wurden, haben die Hunde diese Signale bevorzugt. Es ist also anzunehmen, dass Hunde die optimalen Strategien nutzen, um Zugang zu Verstärkern zu erhalten, und dass sie ihr Verhalten auch je nach Situation ändern (Elgier et al., 2009). Diese Fakten sind ein weiteres Argument für die Durchführung einer Doppel-blind-Studie. Aber sie werfen zusätzlich noch die Frage auf, inwieweit es überhaupt möglich ist, eine Suchhundestudie wissenschaftlich korrekt durchzuführen.

## 2.6 Mastitisdiagnostik

Mastitis ist eine bedeutende Erkrankung in Milchviehbetrieben und die häufigste Ursache für Antibiotikabehandlung bei Milchkühen (Krömker and Volling, 2007). Mastitiden werden meist durch eine Infektion mit laktogen aufsteigenden Bakterien verursacht. Für eine erfolgreiche spezifische Therapie beim Einzeltier und für spezifische Behandlungsstrategien zur Verbesserung der Eutergesundheit in der Herde ist die schnelle Identifizierung des Erregers unerlässlich. Der Goldstandard für die Erregerdiagnostik ist die Entnahme steriler Viertelgemelksproben und die Kultivierung der potentiellen Erreger auf Nährmedien (DVG, 2009). Die Anzucht der Keime dauert mindestens 24 h bis 48 h (Sears and McCarthy, 2003). Hinzu kommt der Transport der Milchprobe ins Labor und die Übermittlung der Ergebnisse. So kann es vom Erkennen der Mastitis bis zum Erhalt der mikrobiologischen Diagnose 3 Tage und meistens länger dauern. Um dennoch rechtzeitig mit der antibiotischen Therapie zu sein, wird die Therapie meist vor der mikrobiologischen Diagnose begonnen.

### 2.6.1 Anzucht der Infektionserreger auf Nährmedien im Labor

Die Anzucht der Erreger wird als Goldstandard für die Erregerdiagnostik angesehen (DVG, 2009). Für die Anzucht von Erregern werden in der Regel Aesculin-Blut-Agar-Platten verwendet. Die Erreger werden nach Koloniemorphologie, -farbe, Hämolysevermögen und dem Verhalten in der Gramfärbung unterschieden. Weitere Differenzierungen erfolgen durch biochemische Untersuchungen, Koagulasetest, Stamp-Färbung oder Sedimentausstrich. Mit dieser Methode werden die häufigsten Mastitiserreger erfasst. Bei Verdacht auf besondere Erreger müssen verlängerte Inkubationszeiten (Mykobakterien, Nocardien) oder spezielle Anzuchtmedien (Mykoplasmen, Hefen, Pilze) verwendet werden.

Wissenschaftliche Arbeiten zur Bewertung der Sensitivität und Spezifität sind selten und beziehen sich nur auf einzelne Erreger (z.B. *Staphylococcus aureus*). Hütt (1996) beschreibt für die Unterscheidung von Mono-, Mischinfektion oder Kontamination eine Sensitivität von 89 - 100% und eine Spezifität von 94 - 100% bei klinischen Mastitiden und 88 - 100% Sensitivität und 92 - 100% Spezifität bei subklinischen Infektionen (Infektionen ohne offenkundige klinische Krankheitsanzeichen). Für die Untersuchung wurden 5 Parallelansätze mit drei Verdünnungsstufen für 12 Mastitis relevante Referenzstämme gewählt. Pitkälä et al. (2005) fanden bei einem Ringversuch große Unterschiede zwischen verschiedenen Untersuchungslaboren (63 - 93% richtige Ergebnisse). Dabei lag die Spezifität für die Detektion von *Staphylococcus aureus* und *Echerichia coli* bei 100%. Regelmäßig können bei Milchproben von Kühen mit klinischer oder subklinischer Mastitis keine Keime in der Anzucht nachgewiesen werden. Bei sinnfällig veränderter Milch liegt der Anteil bei 25 - 30% (Bradley et al., 2007; Taponen et al., 2009), bei unveränderter Milch kann der Anteil bei 49,7% liegen (Makovec und Ruegg, 2003). Dafür kann es verschiedene Ursachen geben: 1. Es kann die Anzahl der Erreger in der Probe unter der Nachweisgrenze liegen, 2. durch intermittierende Ausscheidung (z.B. *Staphylococcus aureus*) werden die Erreger bei der Probenentnahme nicht erfasst, 3. die Erreger wachsen nicht auf dem Standardmedium oder 4. die Stoffwechselprodukte und nicht der Erreger selbst verursachen die Entzündungssymptome (Viguiet et al., 2009).

### 2.6.2 Patho-proof™ Mastitis PCR Assay

Dies ist ein in Finnland entwickeltes und kommerziell hergestelltes molekularbiologisches Testverfahren, das auf der Diagnose von Erreger DNA basiert. Durch eine Polymerase – Kettenreaktion (PCR) werden Teile der Erreger DNA exponentiell vervielfältigt. Diese DNA-Kopien werden mit speziell fluoreszierenden Farbstoffen gemessen. Die Testergebnisse können qualitativ und quantitativ ausgewertet werden. Einige Labore in Deutschland wenden

diesen Test an. Mit dem System können alle Keime diagnostiziert werden, für die ein entsprechender Primer existiert (Lam et al., 2009). Derzeit können 16 Mastitiserreger erfasst werden: *Staphylococcus aureus*, Koagulase negative Staphylokokken, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium bovis*, *Serratia marcescens*, *Trueperella pyogenes*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma spp.*, *Prototheken*, *Hefen* und das/ein  $\beta$ -Laktamase Gen der Staphylokokken (Vakkamäki et al., 2017). Die Untersuchungsdauer beträgt 4 h. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass im direkten Vergleich mit der Anzucht auf Nährmedien das Patho-proof™ Assay eine höhere Sensitivität für den Nachweis von Erregern hatte (Bexiga et al., 2011; Koskinen et al., 2010; Taponen et al., 2009). So fanden Taponen et al. (2009) in 43 % kulturell negativer Proben Nachweise von Mastitiserregern, unter anderem *Streptococcus uberis* und *Staphylococcus aureus*. Ursachen der höheren Nachweisraten können darin liegen, dass in der PCR nur geringste Mengen an Erreger DNA und auch abgestorbene Erreger nachgewiesen werden, während mit kulturellen Methoden nur vermehrungsfähige Erreger nachgewiesen werden können. Koskinen et al. (2009) untersuchten 454 Erregerisolate aus Mastitiden und fanden eine analytische Spezifität und Sensitivität von 100 % für die 11 untersuchten Erreger.

### 2.6.3 Diagnostik von Erregern anhand flüchtiger Substanzen

Bei der Vermehrung und dem Zerfall von Bakterien finden Stoffwechselprozesse statt. Dadurch werden flüchtige Substanzen frei, die in Menge und Art oft artspezifisch sind (Turner und Magan, 2004). Das gilt auch für Stoffwechselprozesse von Mastitiserregern. Für die Diagnose von Mastitiserregern anhand flüchtiger Substanzen ist keine Anzuchtzeit nötig.

#### 2.6.3.1 Gaschromatographie mit Massenspektrometer

Eine Technik zur Analyse von gasförmigen Substanzen ist die Gaschromatographie. Dabei werden gasförmige Substanzen mit einer Trägersubstanz über eine Trennsäule geleitet. Die einzelnen Moleküle der Substanz haften unterschiedlich lange an dieser Trennsäule, zur Identifizierung wird die Austrittszeit der Moleküle gemessen. Das Verfahren wird oft mit einem Massenspektrometer gekoppelt. Nach der Trennung erfolgt dann die Detektion mit einem Massenspektrometer, in dem die austretenden Moleküle in Ionen überführt werden. Die Ionen werden in ein messbares Signal nach dem Verhältnis Masse zu Ladung umgewandelt. Als Ergebnis wird ein Graph mit verschiedenen „Peaks“ ausgegeben. Die Fläche unter der Kurve gibt die eingesetzten Analytenmenge wieder. Die Auswertung bzw. Integration erfolgt in der Regel mit einer entsprechenden Auswertungssoftware. Hettinga et al. (2008a) haben zusätzlich zur kulturellen Anzucht 50 Milchproben von klinischen Mastitiden mit Proben von gesunden Kühen mittels Gaschromatographie verglichen. Mit diesen Ergebnissen haben sie ein künstliches neuronales Netzwerk entwickelt, um die

Erreger zu identifizieren. Mit dieser Methode konnten sie Proben von gesunden und kranken Tieren zu 100 % korrekt klassifizieren. Die Zuordnung der Erreger zu Kategorien *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *koagulase-negative Staphylokokken* oder *Streptococcus spp.* gelang mit einer 93 %igen Genauigkeit. Die verschiedenen Streptokokkenspezies ließen sich mit dieser Methode nicht unterscheiden.

#### 2.6.4.2 Elektronische Nasen

In Anlehnung an die biologische Nase wurden sogenannte elektronische Nasen entwickelt. Allerdings erkennen diese Geräte nicht einen Geruch, sondern messen die Gaskonzentration einer Probe. Der Gasüberstand der Probe wird mit meist aus Metalloxiden bestehenden Sensoren gemessen. Bei diesem Prinzip wandeln Sensoren die Zusammensetzung von Gasen in elektrische Signale um. Diese werden durch ein neuronales Netzwerk in zwei- bzw. dreidimensionale Muster umgerechnet. Das errechnete Muster wird mit einem Referenzmuster der gesuchten Substanz bzw. Geruch verglichen (Bruins et al., 2009). Eriksson et al. (2005) konnten mit einer elektronischen Nase zuverlässig Mastitismilch von Milch gesunder Euterviertel unterscheiden. Sie fanden 109 flüchtige Substanzen in den Milchproben, waren aber nicht in der Lage die Erreger in den Milchproben zu unterscheiden. Bruins et al. (2009) differenzierten mit einer elektronischen Nase 11 häufige humanpathogene Keime mit einer Spezifität von 67 - 100 %. Speziell *Staphylococcus aureus* wurden mit der elektronischen Nase bei Lungenentzündungen von Mäusen unterschieden (Bean et al., 2015). Außerdem gelang es auch zwischen resistenten und sensiblen Spezies zu unterscheiden (Jia et al., 2010).

## 2.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es, Hunde zu trainieren, Erreger in Milchproben von an Mastitis erkrankten Kühen zu erkennen und anzuzeigen. Um die Machbarkeit dieses Prinzips zu testen, wurde beispielhaft ein Erreger (*Staphylococcus aureus*) ausgewählt, der von anderen Mastitiserregern (*Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactia*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*) unterschieden werden sollte.

Es sollte vor allem ein reproduzierbares Protokoll für das Training für Hunde zum Erkennen von Erregern in Milchproben erstellt werden. Es sollte die Fähigkeit von Hunden getestet werden, den Geruch von *Staphylococcus aureus* zu identifizieren, der 1) auf Blutagar kultiviert wurde, 2) in Milchproben eingimpft wurde und 3) in Milchproben von an Mastitis erkrankten Kühen vorhanden war.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Hunde und Hundeführer

Elf private Hunde unterschiedlicher Rassen nahmen insgesamt in unterschiedlicher Zusammenstellung an den Experimenten dieser Studie teil (Tabelle 2). Dabei waren nicht alle Hunde an allen Untersuchungen beteiligt. Das lag daran, dass nicht alle Hundehalter über den ganzen Zeitraum für die Untersuchungen verfügbar waren bzw. die Hunde teilweise nicht die Kriterien zur Teilnahme am Versuch erfüllten. Alle Hunde und Hundeführer waren Kursteilnehmer der Tierakademie Scheuerhof, Wittlich. Die Teilnahme erfolgte auf freiwilliger Basis und die Auswahl der Hunde hing von der Bereitschaft der Hundeführer ab.

Tabelle 2: Hunde, die an den verschiedenen Experimenten der Studie teilgenommen haben

Hund	Rasse	Geschlecht	Alter in Jahren	Teilnahme an Experiment			
				1	2	3	4
A	Jack Russel Terrier	Rüde	4	X	X	X	X
B	Border Collie	Rüde	3	X	X	X	X
C	Mischling	Rüde	10	X			
D	Lagotto Romagnolo	Rüde	9	X	X	X	X
E	Lagotto Romagnolo	Rüde	9	X	X	X	X
F	Labrador Retriever	Rüde	2	X			
G	Pudel Mix	Rüde	2	X	X	X	X
H	Labrador Retriever	Rüde	5	X			
I	Lagotto Romagnolo	Rüde	5	X	X		
J	Lagotto Romagnolo	Rüde	2	X			
K	Lagotto Romagnolo	Hündin	2			X	

Alle Hunde waren klinisch gesund. Sowohl Hunde als auch Hundeführer nahmen in den fortgeschrittenen Trainingsgruppen der Tierakademie Scheuerhof teil und die Hunde hatten verschiedene Verhalten mit dem Prinzip der positiven Verstärkung erlernt. Das Training fand unter der Anleitung der Autorin (Übungsleiter) statt. Fünf Hunde (A, B, C, D, E) hatten bereits Erfahrung in Suchaufgaben wie Differenzierung von Kräutern, dem Verfolgen von menschlichen Spuren (Mantrailing), oder dem Aufsuchen von Bettwanzen. Die Hunde F-K wurden im Rahmen dieser Studie erstmalig für eine Suchaufgabe trainiert.

## 3.2 Geruchsproben

### 3.2.1 Experiment 1

Für Experiment 1 wurden acht Mastitiserreger verwendet: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*. Proben mit *Staphylococcus aureus* stellten den Zielgeruch dar (positive Proben), alle anderen Proben galten als negative Proben.

Die Erreger wurden aus Milchproben von Milchkühen mit Zeichen einer klinischen Mastitis isoliert. Als klinische Mastitis wurden abweichende Milchkonsistenz oder Entzündungsanzeichen, wie Schwellung und Verhärtung eines Euterviertels, definiert. Die Milchproben wurden in ein kommerzielles veterinärmedizinisches Labor (Laboklin GmbH & Co KG, Bad Kissingen, Deutschland) eingeschickt und dort kultiviert. Dafür wurden 0,1 ml der Milchproben auf Columbia Agar mit 5% Schafsblut, Columbia CAN Agar, Endo Agar und Saboraud Agar mit Gentamycin und Chloramphenikol (alle Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. Zusätzlich wurde 1 ml jeder Milchprobe in Thioglycolate angereichert. Die Kulturplatten wurden bei  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  18-24 Stunden inkubiert und dann auf Columbia Agar mit 5% Schafsblut und auf Endo Agar ausgestrichen und für weitere 18 - 24 Stunden bei  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  kultiviert. Der Nährboden für die Hefeisolation wurde bei  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  bebrütet. Eine erste Kontrolle, ob Hefewachstum stattgefunden hat, fand nach 48 Stunden statt und dann nach einer Woche. Die gewachsenen Bakterien wurden nach ihrer Morphologie, den Grameigenschaften und biochemischen Reaktionen (Katalase, Hyaluronidase, Oxidase, Aesculin Reaktion) identifiziert. Die Typisierung wurde mit Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie (MALDI-ToF, Shimadzu, Duisburg) abgeschlossen. Bis zum Gebrauch wurden die Stämme bei  $-20^\circ\text{C}$  in Cryoröhrchen (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Canada) gelagert.

Für das Hundetraining wurden die Erreger erneut auf Columbia Agarplatten für 24 Stunden bebrütet. Gleichzeitig wurden auch Agarplatten ohne Erreger bebrütet, damit die Hunde den Geruch der Agarplatten differenzieren konnten. 12 Stunden vor dem Training wurde ein steriler Baumwolltupfer (5 x 5 cm, Fuhrmann Verbandstoffe GmbH, Much, Deutschland) bei  $5^\circ\text{C}$  in den Deckel der Agarplatte gelegt um den Geruch im Luftüberstand der Platte aufzunehmen (siehe Abbildung 5).

Die Agarplatten wurden ca. 2 Wochen verwendet um 2 - 3 x Baumwolltupfer mit Bakteriengeruch herzustellen. Sie wurden bei  $5^\circ\text{C}$  gelagert und dann erneuert, um Kontaminationen und Ausdünnen des Geruches zu minimieren. Für einen Test wurde ein frisches, steril verpacktes Paket Agarplatten verwendet. Zur Kontrolluntersuchung wurde beim Test ein Baumwolltupfer aus jeder Agarplatte zu einem mikrobiologischen Labor (IVD,

Berlin, Deutschland) geschickt. Auf allen positiven Proben wurden nur *Staphylococcus aureus* nachgewiesen. Die quantitative Untersuchung ergab  $3,2 \times 10^9$  KbE pro Tupfer. Auf den Tupfern mit den anderen Bakterien wurden die erwarteten Spezies gefunden mit Ausnahme von *Escherichia coli*. Auf diesen Tupfern wurden *Enterobacter cloacae* identifiziert.



Abbildung 5: Der Tupfer auf der Agarplatte zum Aufnehmen des Geruchs

### 3.2.2 Experiment 2

Für dieses Experiment wurden die Erreger in einer Hirn-Herz-Bouillon 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Bei diesem Verfahren geht man von einer Bakterienkonzentration von  $1,5 \times 10^8$  KbE/ml aus. Anschließend wurde kommerzielle ultrahocherhitze Milch mit den Erregern beimpft. Es wurden Milchproben (1000ml) mit 0 KbE/ml (negativ); 100 KbE/ml (+); 1000 KbE/ml ( ++); und 10.000 KbE/ml ( +++ ) hergestellt.

Die Milchproben wurden in Aliquots à 2 ml (Eppendorf Safe-Lock Tube) umgefüllt und bei - 20°C gelagert. Für das Training und für den Test wurden die Proben ca. 1 Stunde vorher bei Raumtemperatur aufgetaut und dann auf Baumwolltupfer getropft.

### 3.2.3 Experiment 3

In Experiment 3 wurden Zwischenschritte eingebaut, um die Hunde langsamer an niedrigere Bakterienkonzentrationen zu gewöhnen. Zur Herstellung der Geruchsproben für dieses Experiment wurden Pellets mit *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* und *Enterococcus spp.* hergestellt. Nach einer Kultivierung in je 10 ml steriler Hirn-Herz-Boullion über 24 Stunden bei 37°C wurden 2 ml der entstandenen Boullion (Bakteriengehalt ca.  $1,5 \times 10^8$  KbE/ml) des jeweiligen Erregers in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Safe-Lock Tube) überführt und bei 600 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Kolbenhubpipette steril abgezogen. Das jeweils zurückgebliebene Zellpellet wurde mit 100 µl sterilem, wasserfreiem Glycerin versetzt und vermischt. Die entstandenen Bakterien-Glycerin-Suspensionen wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen bei - 20°C gelagert. Für das Training und den Test wurde je ein Pellet aufgetaut und in 1 oder 2 ml Tankmilch (Monatsdurchschnitt: 120.000 Zellen, < 10.000 Keime) aufgelöst und auf Baumwolltupfer getropft. In diesem Experiment wurde Tankmilch verwendet, um die geruchliche Veränderung der Milch durch den Erhitzungsprozess zu vermeiden.

### 3.2.4 Experiment 4

Die Milchproben für Experiment 4 stammten von Kühen mit klinischer Mastitis von 3 Milchviehbetrieben in Brandenburg. Die Milch war zum Teil grobsinnlich stark verändert mit Blut und Eiterbeimengungen. Die Proben wurden von 3 unabhängigen mikrobiologischen Untersuchungslaboren untersucht. Es wurden nur solche Proben eingesetzt, bei denen in den 3 Laboren übereinstimmend der gleiche Erreger nachgewiesen wurde. Bis zur Verwendung im Training oder Test waren die Proben bei - 20°C gelagert.

## 3.3 Präsentation der Proben

### 3.3.1 Probengefäße

Die Geruchsträger wurden in Plastikgefäße (1 Liter, 13 cm hoch, 12 cm Durchmesser, hundeschulen.com, Emmendingen, Deutschland) gelegt, die mit einem perforierten Deckel mit 7 Löchern (1 mm Durchmesser) verschlossen wurden. Beim Befüllen dieser Probengefäße wurden Einmalhandschuhe getragen. Ein Probengefäß wurde immer nur für eine Erregerart verwendet, um die Vermischung von Gerüchen zu vermeiden. Nach jedem Training wurden die Probengefäße mit kochendem Wasser befüllt und nach 5 Minuten

Einwirkzeit in der Spülmaschine (Temperatur des Spülprogrammes: 80°C) gereinigt. Für den Test für Experiment 3 und 4 wurden neue Probengefäße verwendet. Die Deckel der Probengefäße wurden nach jedem Kontakt mit einem Hund mit einem feuchten Tuch gereinigt. Dabei wurden die Gefäße mit den positiven Proben als letzte gereinigt.

### 3.3.2 Anordnung der Probengefäße Abbildung 6: Hund D sucht die 10 kreisförmig aufgestellten Probengefäße ab

Im Training wurden die Probengefäße erst einzeln angeboten. Dann wurde die Zahl der Gefäße schrittweise auf 10 Probengefäße erhöht. In den verschiedenen Trainingsschritten wurden die Gefäße in Reihe bzw. ohne besondere Ordnung aufgestellt. Am Ende des Trainingsprotokolls von Experiment 1 und 2 wurden die Probengefäße in kreisförmige Anordnung aufgestellt (Abbildung 6). In Experiment 3 und 4 wurden nur 7 Probengefäße verwendet und diese in einem Halbkreis aufgestellt. Der Abstand der Gefäße betrug ca. 50 cm.



Abbildung 6: Hund D sucht die 10 kreisförmig aufgestellten Probengefäße ab

### 3.4 Training

#### 3.4.1 Trainingsprotokoll und –methode

Für das Training wurde ein Trainingsprotokoll mit 14 Schritten (Tabelle 3) erstellt. Das Training basierte auf positiver Verstärkung mit Clicker oder Lobwort als sekundärem Verstärker und Futterbelohnungen als primärem Verstärker. Bei fehlerhaftem Verhalten wurden die Hunde nicht belohnt, sondern das Training für eine kurze Zeit unterbrochen, um so dem Hund die Möglichkeit zu nehmen eine Belohnung zu erlangen.

##### 3.4.1.1 Experiment 1

Das Training für Experiment 1 fand von Mai 2012 bis Februar 2013 statt. Die Trainingsschritte 1 bis 10 wurden von den Hundeführern selbstständig unter vorheriger Absprache mit der Autorin zu Hause trainiert. Das Trainingsprotokoll ist in Tabelle 3 zusammengefasst. In Schritt 1 bis 4 wurde den Hunden die positive Probe präsentiert und das gewünschte Verhalten für die Anzeige, z.B. hinlegen, trainiert. In den Schritten 5 bis 10 lernten die Hunde, die positive Probe aus mehreren leeren Probengefäßen zu differenzieren und anzuzeigen. Je nach Lernverhalten des Hundes enthält das Trainingsprotokoll Entscheidungspunkte, an denen das Training für den Hund individuell angepasst werden kann (siehe Anhang, S.84-85). So kann die Erhöhung der Anzahl der Probengefäße unterschiedlich schnell geschehen. Die Dauer eines jeden Trainingsschrittes und der Fortschritt wurden von den Hundeführern dokumentiert.

Die Trainingsschritte 11 bis 14 wurden in den Trainingsräumen der Tierakademie Scheuerhof, Wittlich durchgeführt. Besonderer Wert wurde auch darauf gelegt die Testsituation zu simulieren, um v.a. die Hundeführer optimal auf die Routine vorzubereiten.

Tabelle 3: Die Trainingsschritte von Experiment 1

Trainingsschritt	Inhalt und Ziel des Trainingsschrittes
<b>Klassische Konditionierung auf Geruch</b>	
1	Der Zielgeruch wird dem Hund präsentiert und mit einer Belohnung verknüpft Hund bekommt positive Assoziation mit Zielgeruch
<b>Anzeigeverhalten</b>	
2	Zielgeruch wird im Probengefäß präsentiert; Hund soll die Nase an die perforierte Öffnung des Probengefäßes halten
3	Zielgeruch wird im Probengefäß präsentiert; Hund soll die Nase für 1 sec an die perforierte Öffnung des Probengefäßes halten
4	Zielgeruch wird im Probengefäß präsentiert; Hund soll die Nase für 3 sec an die perforierte Öffnung des Probengefäßes halten
<b>Geruchsunterscheidung</b>	
5	Es werden 2 Probengefäße präsentiert, 1 mit und 1 ohne Zielgeruch. Probe mit Zielgeruch steht näher zum Hund Hund soll mit der Nase das positive Probengefäß berühren
6	Wie Schritt 5 Hund soll die Nase für 3 sec an das Probengefäß halten
7	Wie Schritt 5; beide Probengefäße auf gleicher Höhe
8	Wie Schritt 6; beide Probengefäße stehen in gleicher Entfernung zum Hund, Hund soll 3 sec anzeigen
9	Es werden 3 Probengefäße präsentiert, 1 mit und 2 ohne Zielgeruch, alle Probengefäße stehen in gleicher Entfernung zum Hund Hund soll die Nase für 3 sec an das positive Probengefäß halten
10	Wie Schritt 9, es werden 4 Probengefäße, 1 mit und 3 ohne Zielgeruch präsentiert

**Verblindung und Simulation der Testsituation**

- 11 Dem Hundeführer ist die Position der positiven Probe unbekannt (verblindet)
  - 12 Erhöhen der Zahl der Probengefäße auf 10, 1 mit und 9 ohne Zielgeruch, die kreisförmig angeordnet sind
  - 13 Probengefäße mit Geruch von anderen Mastitiserregern einführen
  - 14 Simulation der Testsituation
- 

3.4.1.2 Experiment 2

Das Training für das Experiment 2 wurde ausschließlich in der Tierakademie Scheuerhof in der Zeit von Mai bis Juli 2014 durchgeführt. Für das Experiment 2 wurden die Trainingsschritte 1-14 in stark verkürzter Form durchlaufen, d.h. Suchablauf und Anzeigeverhalten konnten von Experiment 1 übernommen werden. Das Trainingsprotokoll konzentrierte sich auf die Unterscheidung der Probengefäße in Trainingsschritte 5 - 11.

3.4.1.3 Experiment 3

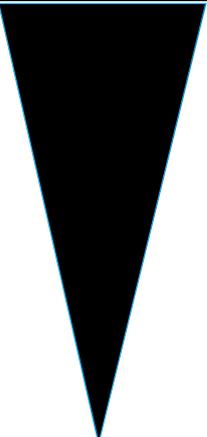
Das Training für Experiment 3 wurde ausschließlich in der Tierakademie Scheuerhof in der Zeit Juni bis Dezember 2015 durchgeführt. Such- und Anzeigeverhalten sind schon in den vorherigen Experimenten trainiert worden. In diesem Trainingsablauf lag der Fokus darauf die Hunde zu trainieren, den Zielgeruch in immer geringeren Geruchskonzentrationen wahrzunehmen. Daher wurde das Training auf das Training von Tabelle 3, mit den Trainingsschritten wie sie in Tabelle 4 dargestellt sind, aufgebaut. Das wurde versucht zu erreichen, indem die Kontaktzeit der Geruchsträger in der Agarplatte schrittweise verkürzt wurde, bzw. die Menge an Milch mit Erregern verringert wurde (Tabelle 5).

Tabelle 4: Trainingsschritte für Experiment 3 (aufbauend auf Schritt 14)

Trainingsschritt	Inhalt und Ziel des Trainingsschrittes
1-6	Training mit abnehmender Geruchskonzentration
7	Einführung der Negativanzeige
8	Es können auch 2 Proben positiv sein
9	Hund und Hundeführer alleine im Raum

---

Tabelle 5: Geruchsproben für Experiment 3

Konzentration	Probe
	Verweildauer des Tupfer in Agarplatte: 45 min
	Verweildauer des Tupfer in Agarplatte: 30 min
	Verweildauer des Tupfer in Agarplatte: 10 min
	Positiv: Tupfer mit 2 ml geimpfter <i>Staph. aureus</i> Milch
	Negativ: Tupfer mit 1 ml <i>Enterococcus</i> / <i>Strep. spp.</i> Milch
	Positiv: Tupfer mit 1,5 ml geimpfter <i>Staph. aureus</i> Milch
	Negativ: Tupfer mit 0,75 ml <i>Enteroc.</i> / <i>Strep. spp.</i> Milch
	Positiv: Tupfer mit 1,0 geimpfte <i>Staph. aureus</i> Milch Negativ: Tupfer mit 1,0 ml <i>Enteroc.</i> / <i>Strep. spp.</i> Milch

Die Konzentration der anderen Erreger (also nicht *Staphylococcus aureus*) in den negativen Proben wurde zunächst niedriger gehalten, um den Hunden eine zusätzliche Hilfestellung zu geben.

Des Weiteren wurde in Experiment 3 eine „Negativanzeige“ trainiert. Damit konnten die Hunde anzeigen, dass keine Probe positiv war. In Experiment 1 war in jedem Durchgang eine positive Probe vorhanden. Die Hunde können dies als Regel lernen. Das birgt die Gefahr, dass die Hunde unbedingt eine Probe in einem Durchgang anzeigen wollen und falsch positive Anzeigen provoziert werden, auch wenn keine positive Probe vorhanden ist. Für die Negativanzeige wurde in ca. 2 Metern Abstand zu den zu untersuchenden Probengefäßen eine dem Hund bekannte positive Probe gestellt. Diese Probe konnte der Hund anzeigen, in dem Fall, dass bei den Probengefäßen keine positive Probe vorhanden war. Das ermöglichte dem Hund, sich trotzdem durch eine Anzeige eine Belohnung zu verdienen (Trainingsschritt 7). In Trainingsschritt 8 wurde trainiert, dass auch 2 Proben positiv sein können, so dass der Hund nach einer positiven Anzeige auch die restlichen Probengefäße absuchen musste.

#### 3.4.1.4 Experiment 4

Für Experiment 4 wurde kein spezifisches Training durchgeführt. Denn damit sollte überprüft werden, ob das in dieser Studie entwickelte Trainingsprotokoll geeignet ist, Hunde zu trainieren, *Staphylococcus aureus* in Mastitismilchproben zu erkennen.

### 3.4.2 Trainingsdauer und Durchgänge

Im Trainingsprotokoll waren 10 Durchgänge pro Trainingseinheit geplant. Die Trainingsdauer wurde aber dem Aufmerksamkeitsvermögen des Hundes angepasst. Wurde der Hund im Training langsamer und häuften sich Fehler, wurde das Training für den Durchgang beendet. Das Training konnte auch verlängert werden, wenn der Hund weitere Wiederholungen brauchte, weil der Fehleranteil noch zu hoch war.

### 3.4.3 Belohnungsvarianten im Training

Die Hunde wurden für jede richtige positive Anzeige belohnt. In den unverblindeten Trainingsschritten entschied der Hundeführer, nach welcher Dauer einer Anzeige der Hund belohnt wurde. Für das Training für die Testsituation (Schritt 14) bekamen die Hundeführer erst nach Bekanntgabe der positiven Proben ihrerseits Feedback vom Übungsleiter. Einige Hundeführer belohnten den Hund schon vor Bekanntgabe des Ergebnisses, auf die Gefahr hin, den Hund an der falschen Probe zu belohnen, andere belohnten den Hund erst nach dem Feedback des Übungsleiters, auf die Gefahr hin, dass der Hund in der Zwischenzeit die Anzeige unterbrochen hat.

## **3.5 Test**

### 3.5.1 Testanordnung

Die Tests wurden im Trainingsraum der Tierakademie Scheuerhof, Wittlich, durchgeführt. Für die Testdurchführung waren neben den Hundeführern mit ihren Hunden folgende Personen anwesend: Versuchsleiterin und Assistentin und Übungsleiterin. Die Versuchsleiterin und die Assistentin erstellten eine randomisierte Liste (Excel, Microsoft Cooperation, Redmond, USA) für die Positionen der Probengefäße, stellten die Probengefäße auf und beobachteten den Testdurchgang von einem 2. Raum per Videoübertragung. So wurde eine doppelt verblindete Testdurchführung ermöglicht. Die Versuchsleiterin gab unmittelbar nach der Bekanntgabe des Suchergebnisses durch den Hundeführer Rückmeldung über die Qualität des Ergebnisses. Der Hundeführer konnte so den Hund entsprechend belohnen. Die Übungsleiterin war während der Testdurchgänge mit den Hundeführern im Trainingsraum, weil das der Trainingssituation entsprach, nahm aber keinen Einfluss auf die Entscheidung der Hundeführer, ob der Hund eine Anzeige gemacht hat. Die Position der positiven Probe war auch der Übungsleiterin nicht bekannt. In Test 1

und 2 sollten die Hunde in jedem Testdurchgang das Probengefäß mit *Staphylococcus aureus* aus insgesamt 10 Probengefäßen heraussuchen. Die negativen Probengefäße enthielten Geruchsträger mit *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*. Die Wahrscheinlichkeit das positive Probengefäß zufällig richtig anzuzeigen lag bei 10 %. Jeder Hund durchlief 10 Testdurchgänge, unterschied somit 100 Probengefäße. Für jeden Durchgang wurden neue oder bei 90°C in der Spülmaschine gereinigte Probengefäße verwendet.

In Experiment 3 und 4 wurden 7 Proben pro Durchgang aufgestellt. Test 3 hatte 15 Durchgänge, wobei es 2 Durchgänge mit 2 positiven und 2 Durchgänge ohne eine positive Probe gab. In 11 Durchgängen wurde je 1 positive Probe aufgestellt. Den Hundeführern war nicht bekannt, um welchen Durchgang es sich handelte. Insgesamt unterschieden die Hunde 105 Probengefäße und die Wahrscheinlichkeit zufällig die positive Probe richtig anzuzeigen lag bei 15 %. Geruchsträger mit Enterokokken und *Streptococcus uberis* waren in je 25 Probengefäßen. In den verbleibenden 40 Probengefäßen waren Geruchsträger mit Milch ohne Erreger.

Test 4 hatte 10 Durchgänge mit je 7 Probengefäßen, wobei es je Durchgang nur eine oder gar keine positive Probe gab (siehe Abbildung 7). Die Wahrscheinlichkeit zufällig die positive Probe richtig anzuzeigen lag bei 10 %. Die Reihenfolge, in welchem Testdurchgang wie viele positive Geruchsträger waren, war randomisiert. Die negativen Probengefäße enthielten Geruchsträger mit *Streptococcus dysgalactia* (6x), *Streptococcus uberis* (25x) und *Trueperella pyogenes* (2x).



Abbildung 7: Der Hund zeigt die richtige Probe mit einem Nasentarget an.

Alle Anzeigen wurden entweder als richtig positiv (RP), richtig negativ (RN), falsch positiv (FP) oder falsch negativ (FN) dokumentiert. Bei RP war die Probe positiv und der Hund zeigte diese richtigerweise als solche an. Bei RN war die Probe negativ und der Hund zeigte diese richtigerweise nicht an. Bei FP war die Probe negativ, der Hund zeigte sie aber an. Bei FN war die Probe positiv, wurde vom Hund aber nicht angezeigt.

Tabelle 6: Anzahl und Zusammensetzung der Geruchsproben in Probengefäßen in den verschiedenen Experimenten

Experiment	Probenmaterial	Anzahl der Proben	Anzahl der positiven Proben ( <i>Staph.aureus</i> )	negative Proben
1	Tupfer aus Anzuchtplatten	10 x 10	1	Tupfer aus unbebrüteten Anzuchtplatten, <i>E. coli</i> , <i>Strep. uberis</i> , <i>Strep. dysgalactiae</i> , <i>P. aeruginosa</i> . und <i>C. albicans</i>
2	Milch mit inokulierten Bakterien ( $10^3$ KbE /ml)	10 x 10	1	ultrahechoerhitze Konsummilch
3	Milch mit inokulierten Bakterien ( $10^3$ KbE /ml)	15 x 7	0-2	Rohmilch, <i>Streptococcus uberis</i> , Enterokokken
4	Mastitis-Milchproben	10 x 7	0-1	Mastitismilch mit <i>Strep. dysgalactiae</i> , <i>Strep. uberis</i> , <i>T. pyogenes</i>

### 3.6 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Office 2010, Microsoft Deutschland GmbH, München, Deutschland) und SPSS Statistik für Windows (SPSS 19.0, SPSS Inc., München, Deutschland) durchgeführt. Sensitivitäten und Spezifitäten wurden mit Kreuztabellen gerechnet. Die Sensitivität misst den Anteil der tatsächlich positiven Proben, die der Hund als solche erkennt, wird daher auch Richtig-positiv-Rate genannt. Sie wird errechnet aus  $RP : (RP + FN)$ . Die Spezifität steht für den Anteil der tatsächlich negativen Proben, die der Hund als solche erkennt. Die ist die Falsch-negativ-Rate. Sie wird errechnet aus  $RN : (RN + FP)$ . Konfidenzintervalle für Sensitivitäten und Spezifität wurden mit der Wilson Score Methode ohne Kontinuität Korrektur (Newcombe, 1998) errechnet. Der Einfluss des Inhalts der Probengefäße, der Hunde, deren Alter, der Hundehalter oder des Testdurchgangs wurden mit dem Fisher Exakt Test gerechnet.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Experiment 1

#### 4.1.1 Training

Acht von 10 Hunden durchliefen alle Trainingsschritte des Protokolls und nahmen am Test teil. Hund I und J zeigten keinen adäquaten Lernfortschritt in Schritt 13 und wurden daher von einem weiteren Training ausgeschlossen. Die absolute Trainingsdauer pro Hund in Minuten war 111 – 290 min ( $164 \pm 70.2$  min). Für Trainingsschritt 12 (Diskriminieren von *Staphylococcus aureus* von anderen Erregern) brauchten die Hunde im Mittel mehr Zeit als für die vorherigen Trainingsschritte.

Tabelle 7: Trainingszeit in Minuten für Experiment 1 (Mai 2012 bis Februar 2013)

Trainings-	Hund	Hund	Hund	Hund	Hund	Hund	Hund	Hund	Hund	Hund
schrift	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1 (a-c)	1	1	1	1	1	9	5	11	10	1
2	1	2	1	1	1	1,5	1	1	1	1
3	12	3	12	2	3	6	5	13	5	10
4	6	6	15	8	7	5	11	18	12	8
5	4	3	5	3,5	3	6	4	7	5	5
6	2	4	10	4	2	6	16	23	15	3
7	2	4	32	3	3,5	8	13	30	22,5	31
8	6	8	22	16	2,5	6	17	32	5	16
9	7	11	50	14	6,5	12	16	30	18	23
10	15	13	28	3	11	10	22	14	5	49
11	4	8,5	17	6	5	5	8	12,5	19	11,5
12	15	20	22,5	15	19,5	11,5	17,5	12,5	18,5	21
13	13	25,5	39,5	20,5	23	8	25	9	20,5	5
14	25	22	35	6	23	20	35	29		
Gesamt	113	131	290	112	111	113,5	195,5	241		

Die Hunde A bis E wurden schon vor der Studie in Suchaufgaben trainiert, und wurden deshalb als erfahren eingestuft. Die Trainingszeit der erfahrenen Hunde (151,4 min ± 77,9; Mittelwert + Standardabweichung) und der unerfahrenen Hunde (183,3 min ± 64,61) zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $P = 0.575$ ), lässt aber eine Tendenz erkennen.

#### 4.1.2 Test

Im Test suchten 8 Hunde je 100 Probengefäße. Von diesen enthielten 10 Geruchsträger mit *Staphylococcus aureus*. Die Wahrscheinlichkeit die richtige Probe zufällig zu finden lag somit bei 1:10. Vier Hunde zeigten fehlerfrei alle positiven Proben richtig an und erreichten damit eine Sensitivität und Spezifität von 100 %. Im Durchschnitt aller Hunde lag die Sensitivität bei 91,3 % und die Spezifität bei 97,9 %. Die Art der Erreger in den negativen Proben hatte keinen Einfluss auf falsch positive Anzeigen. Die Ergebnisse für die einzelnen Hunde sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Differenzierung von Probengefäßen (10 Testdurchgänge mit je 10 Probengefäßen) mit Geruchsträgern aus Anzuchtplatten mit *Staphylococcus aureus* von Probengefäßen mit *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* (Experiment 1)

Anzeige (n)	Hund								alle
	A	B	C	D	E	F	G	H	
richtig positiv	10	9	7	10	10	9	8	10	73
richtig negativ	90	88	80	90	90	89	88	90	705
falsch positiv	0	2	10	0	0	1	2	0	15
falsch negativ	0	1	3	0	0	1	2	0	7
Sensitivität %	100	90	70	100	100	90	80	100	91.3
Spezifität %	100	97.8	88.9	100	100	98.9	97.8	100	97.9

## 4.2 Experiment 2

### 4.2.1 Training

Für das Training standen 6 Hunde zur Verfügung. Alle Hunde in diesem Experiment 2 hatten am Training für Experiment 1 teilgenommen. Die Trainingsdauer betrug 152 bis 215 Minuten (166 ± 25 min). Die Trainingszeit ist in Tabelle 9 dokumentiert.

Tabelle 9: Trainingszeit in Minuten für Experiment 2 (Mai bis Juli 2014)

Trainings- schritt	Hund	Hund	Hund	Hund	Hund	Hund
	A	B	D	E	G	I
1	-	11	10	19	11	12
2	-	26	20	-	29	-
3	-	19	12	14	13	14
4	-	20	9	-	9	-
5	12	15	10	13	11	13
6	13	10	10	9	9	18
7	12	10	9	4	12	10
8	20	9	15	15	-	18
9	10	10	9	13	-	20
10	13	11	8	14	13	13
11	15	14	10	13	12	13
12	13	20	7	16	15	14
13	15	17	10	17	12	15
14	15	18	12	13	14	17
Gesamt	138	210	151	160	160	177

Genauere Angaben zu den Kriterien in den einzelnen Trainingssessions gibt es im Anhang auf S. 84/85.

#### 4.2.2 Test

Im Test sollten 6 Hunde je 100 Probengefäße untersuchen. Davon enthielten 10 Probengefäße Geruchsträger mit *Staphylococcus aureus*. Die Wahrscheinlichkeit die richtige Probe zufällig anzuzeigen, lag bei 1:10. Die Hundeführer von vier Hunden unterbrachen den Test, da ihre Hunde Anzeichen von Stress wie starkes Hecheln, Ohren anlegen und wiederholtes Anspringen des Hundeführers zeigten, bzw. die Hunde sich weigerten, die Proben zu untersuchen. Die Hundeführer schlossen daraus, dass die Hunde die Aufgabe nicht lösen konnten. Bei zwei Hunden brachen die Hundeführer nach 5 Durchgängen ab und bei den anderen beiden nach 7 Durchgängen. In diesen Durchgängen hatten die Hunde keine bzw. 1 oder 2 positive Proben richtig angezeigt. Für die beiden verbleibenden Hunde, die alle 10 Versuchsdurchgänge absolvierten, lag die Sensitivität bei 55 % und die Spezifität bei 95 %. Für alle Hunde lag die Sensitivität bei 33,3 % und Spezifität bei 92,4 % (Tabelle 10).

Tabelle 10: Differenzierung von Probengefäßen (10 Testdurchgänge mit je 10 Probengefäßen) mit Geruchsträgern mit Milch inokuliert mit *Staphylococcus aureus* in einer Konzentration von  $10^3$  KbE/ml von Probengefäßen mit *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* (Experiment 2). Hund G und J brachen nach 5, Hund A und E nach 7 Durchgängen ab.

Anzeigen (n)	Hund						Alle
	A	B	D	E	G	J	
richtig positiv (n)	1	6	5	0	2	0	14
richtig negativ (n)	57	86	85	41	58	40	367
falsch positiv (n)	6	4	5	5	5	5	30
falsch negativ (n)	3	4	5	9	2	5	28
Sensitivität %	25	60	50	0	50	0	33,3
Spezifizität %	90.4	95.6	95.6	89.1	92.1	88.9	92,4

### 4.3 Experiment 3

#### 4.3.1 Training

Für Experiment 3 wurden 6 Hunde (Hund A, B, D, E, G und K) verwendet. Alle Hunde beendeten das Trainingsprotokoll und nahmen an dem Test teil.

Die Trainingszeit betrug 98 – 177 min (141,6 min  $\pm$  27,5, Durchschnitt und Standardabweichung) pro Hund (Tabelle 11). Hund K benötigte weniger Trainingszeit als die anderen Hunde ( $p < 0,05$ ).

Tabelle 11: Trainingszeit in Minuten für Experiment 3 (Juni bis Dezember 2015)

Trainings- session	Hund	Hund	Hund	Hund	Hund	Hund
	A	B	D	E	G	K
1	14	15	8	10	14	-
2	-	13	10	12	11	-
3	-	14	11	13	12	-
4	-	5	3	10	3	-
5	-	15	12	30	25	23
6	-	18	15	14	25	10
7	14	13	15	-	13	-
8	18	15	11	15	14	14
9	17	15	17	-	13	-
10	15	15	11	14	11	14
11	13	-	11	14	14	12
12	12	14	6	-	13	-
13	14	12	6	11	10	10
Gesamt	117	164	136	143	178	83

#### 4.3.2 Test

Jeder Hund suchte in 15 Durchgängen zu je 7 Proben (Abbildung 8) insgesamt 105 Probengefäße mit Geruchsträgern ab. Die Hunde erreichten im Durchschnitt eine Sensitivität von 83,3 % und eine Spezifität von 97,9 %. Die Ergebnisse der einzelnen Hunde sind in Tab. 12 dargestellt.



Abbildung 8: 15 Durchgänge zu je 7 Proben

Tabelle 12: Differenzierung von Probengefäßen (10 Testdurchgänge mit je 10 Probengefäßen) mit Geruchsträgern mit Milch, die mit *Staphylococcus aureus* in einer Konzentration von  $10^8$  KbE/ml inokuliert war, von Probengefäßen mit Geruchsträgern, die mit Enterokokken und *Streptococcus uberis* inokuliert waren (Experiment 3)

Anzeigen (n)	Hund						Alle
	A	B	D	E	G	K	
richtig positiv (n)	11	13	14	13	13	11	75
richtig negativ (n)	88	90	88	89	86	88	529
falsch positiv (n)	2	0	2	1	4	2	11
falsch negativ (n)	4	2	1	2	2	4	15
Sensitivität %	73.3	86.7	93.3	86.7	86.7	73.3	83.3
Spezifizität %	97.8	100	97.8	98.8	95.5	97.8	97.9

#### 4.4 Experiment 4

##### 4.4.1 Training

Für das Experiment wurde kein gesondertes Training durchgeführt.

##### 4.4.2 Test

Fünf von sechs Hunden konnten den Test erfolgreich beenden. Hund K zeigte keinerlei Suchverhalten oder Anzeichen eines Erkennens der *Staphylococcus aureus* positiven Proben, die im Vergleich zu den Proben aus den anderen Tests stark verändert waren (Abbildung 9), so dass der Hundeführer den Test abbrach. Die Hunde erreichten im Durchschnitt eine Sensitivität von 60 % und eine Spezifität von 92.8 % (Tabelle 13).

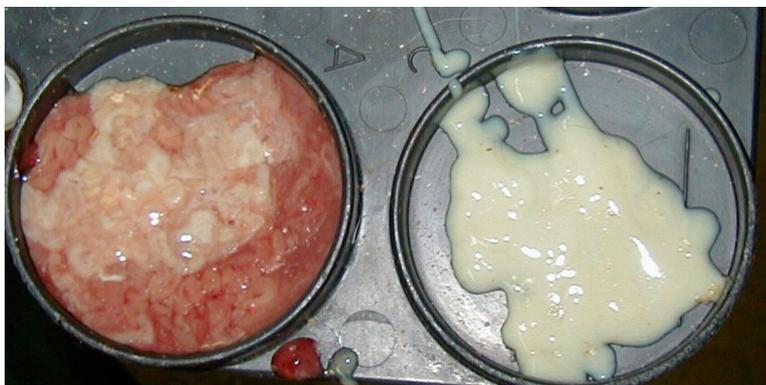


Abbildung 9: Die Milch für diesen Test war stark verändert.

Die Wahrscheinlichkeit, die positive Probe per Zufall zu finden, lag in diesem Test bei 14 %. Das bedeutet, dass selbst bei einer Sensitivität von 33%, die Fähigkeit *Staphylococcus aureus* zu detektieren, höher war als bei einer zufälligen Probenauswahl. Hund D erkannte die meisten positiven Proben und hatte eine Sensitivität von 88.9 % und Spezifität von 95.1 %.

Tabelle 13: Differenzierung von Probengefäßen mit Geruchsträgern mit Mastitis Milchproben mit *Staphylococcus* von Probengefäßen mit *Streptococcus dysgalactia*, *Trueperella pyogenes* und *Streptococcus uberis*

Anzeigen (n)	Hund					Alle
	A	B	D	E	G	
richtig positiv (n)	4	6	8	3	6	27
richtig negativ (n)	54	58	58	57	56	283
falsch positiv (n)	7	3	3	4	5	22
falsch negativ (n)	5	3	1	6	3	18
Sensitivität %	44.4	66.7	88.9	33.3	66.5	60
Spezifizität %	88.5	95.1	95.1	93.4	91.8	92,8

Der Inhalt der negativen Proben hatte keinen Einfluss auf das Testergebnis.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Training

In vielen Studien, die sich mit der Nasenleistung von Hunden beschäftigen, ist der Trainingsweg nicht oder unvollständig dargestellt und daher nicht nachvollziehbar (Helton, 2009; Johnen et al., 2013). Außerdem gibt es immer noch eine große Wissenslücke darüber, wie Hunde Substanzen riechen können (Oxley and Waggoner, 2009). Schon 1996 monierte Schoon, dass keine Standards für Trainingsmethoden für Suchhunde existieren. Dadurch sind die Ergebnisse verschiedener Studien schlecht zu vergleichen und ihre Qualität ist schwierig zu beurteilen.

#### 5.1.1 Trainingsprotokoll

Ziel der Studie war es, Hunde zu trainieren *Staphylococcus aureus* in Milchproben von an Mastitis erkrankten Kühen zu erkennen und anzuzeigen. Dazu wurde ein Trainingsprotokoll mit 14 Schritten erstellt. Das Training von Suchhunden wird eher aufgrund von Erfahrungen der Trainer aus der Praxis heraus als nach wissenschaftlichen Erkenntnissen durchgeführt. Erkenntnisse aus den Verhaltensanalysen im Labor von Skinner (1951) könnten als Grundlage für ein wissenschaftlich basiertes Training dienen (Breland and Breland, 1951). Dazu sind Trainingsprotokolle wichtig, wie sie auch in vielen Bereichen als Lernprotokolle bei Menschen angewandt werden (O'Neill and Bellamy, 1978; Berney et al., 2009; de Bie et al., 2010).

Ein Trainingsprotokoll soll die einzelnen Lernschritte einer gewünschten Verhaltenskette identifizieren und dokumentieren. Auch in wissenschaftlichen Arbeiten mit Tieren werden Trainingsprotokolle entwickelt, z.B. um Affen für eine Untersuchung mit Computertomografie zu trainieren, ohne diese in Narkose legen zu müssen (Howell et al., 2001). Es wurde auch schon gezeigt, dass unterschiedliche Trainingsprotokolle unterschiedliche Ergebnisse liefern (de Hoz et al., 2003). In diesem Experiment wurde an Ratten der Einfluss von Läsionen auf den Hippocampus untersucht und dabei gezeigt, dass z.B. 4 Trainingssessions an 8 Tagen (32 Trainingssessions) bessere Ergebnisse brachten als 8 Trainingssessions an 6 Tagen (48 Trainingssessions).

Ein Trainingsprotokoll muss nachvollziehbar sein, aber auch auf individuelle Situationen eingehen können. Es wurde in Verhaltensexperimenten, bei denen Menschen lernen sollten, über Vorstellungen Bilder auf einem Bildschirm zu steuern, gezeigt, dass ein Trainingsprotokoll, das individuell angepasst werden kann, wirkungsvoller ist als ein starr vorgegebenes Protokoll (Friedrich et al., 2013).

In der hier durchgeführten Studie war die Aufgabenstellung für den Hund „prüfe verschiedene Probengefäße, erkenne den Geruch von *Staphylococcus aureus* und zeige diesen an und zeige andere, ähnliche Gerüche nicht an“. Ein Trainingsprotokoll kann im Laufe des Trainings zur Effizienzsteigerung einer Trainingsaufgabe weiterentwickelt werden. Die einzelnen Schritte des Trainingsprotokolls ermöglichen einem Trainer eine komplexe Verhaltenskette in kleine Schritte aufzugliedern, die der Mensch dem Hund vermitteln kann. Je mehr Zwischenschritte ein Trainingsprotokoll hat, desto eher ist dieses für Hunde und Hundeführer mit unterschiedlichen Begabungen und Vorkenntnissen zu bewältigen (Friedrich et al., 2013). Dann spielen aber auch noch die Zeit und die Wiederholungen eine Rolle (Helton, 2007). So haben wir in Experiment 1 zwei Hunde aus der Studie ausgeschlossen, die das Training in der vorgegebenen Zeit nicht erfolgreich beenden konnten. Jetzt lässt sich diskutieren, ob es eine Qualität eines Trainingsprotokolls ist, dass Hunde aussortiert werden, die Trainingschritte nicht in einer vorgegebenen Zeit erreichen, oder ein Mangel, weil es noch nicht angepasst genug an alle Gegebenheiten ist.

Das Trainingsprotokoll in dieser Studie enthält verschiedene „Entscheidungspunkte“ (siehe Anhang S. 84/85). Je nach Lernverhalten der Hunde konnten unterschiedliche Wege im Trainingsprotokoll beschritten werden, um den Trainingserfolg zu optimieren. In Experiment 1 brauchten erfahrene Hund weniger Zeit für die Beendigung des Protokolls als die unerfahrenen Hunde. Bei den unerfahrenen Hunden wurden einzelne Zwischenschritte in die ursprünglichen Schritte eingefügt.

In Experiment 2 wurde nicht berücksichtigt, dass die Reduktion der Bakterienkonzentration auf dem Geruchsträger in mehrere Trainingsschritte geteilt werden muss. Daher konnten die meisten Hunde in diesem Experiment das Trainingsziel nicht erreichen. In Experiment 3 wurde dieser Fehler im Trainingsprotokoll verbessert und alle Hunde konnten das Trainingsprotokoll und unter Trainingsbedingung die gestellte Trainingsaufgabe bewältigen.

Das Trainingsprotokoll zu Experiment 1 beginnt mit einer klassischen Konditionierung (Pavlov, 1927) auf den Zielgeruch. Bei der klassischen Konditionierung wird ein neutraler Reiz (Geruch von *Staphylococcus aureus*) mit einer unkonditionierten Reaktion (Erwartung einer Belohnung) verknüpft, indem er mit dem unkonditionierten Reiz (Futter) gepaart wird. Nach einigen Wiederholungen führt dann der ehemals neutrale Reiz (Geruch) zu einer konditionierten Reaktion (Erwartung einer Belohnung). So erhält der präsentierte Geruch eine Bedeutung für den Hund und erzeugt eine Motivation, den Geruch zu suchen.

Schoon et al. (2014) wählten beim Training von Hunden auf Rostspuren als ersten Schritt die Anzeige eines Spielzeuges (operante Konditionierung). So wurde das Suchverhalten mit Hilfe des Spielzeuges trainiert. Das Spielzeug wurde dann schrittweise durch den Zielgeruch ersetzt. In beiden Fällen können jedoch klassische und instrumentelle Anteile nicht völlig

getrennt werden, sondern es liegt immer eine Kombination vor. Der Unterschied besteht hauptsächlich darin, wie früh der Geruch ins Spiel kommt.

Herrnstein (1961) postulierte ein „Matching law“, welches annimmt, dass Tiere ihr Verhalten relativ zur erhaltenen Belohnung aufteilen. Gibt es beispielsweise 30 Belohnungen für ein Verhalten A (Spielzeugsuche) und 10 Belohnungen für ein Verhalten B (Zielgeruchssuche), wird ein Tier zur  $\frac{3}{4}$  seiner Zeit Verhalten A und zu  $\frac{1}{4}$  seiner Zeit Verhalten B zeigen. Das würde für die Wahl der klassischen Konditionierung als ersten Trainingsschritt sprechen, weil der Hund auf diese Weise die Anzeige immer mit dem Zielgeruch verknüpft, während er im Aufbau von Schoon (2014) das Anzeigeverhalten zunächst mit dem Spielzeug verknüpft und die Gefahr besteht, dass auch in späteren Trainingssituation eher das Spielzeug als der Zielgeruch angezeigt würde. In der Praxis ist dies vermutlich wenig bedeutend, da der Hund in der Regel das Spielzeug nicht vom Zielgeruch unterscheiden muss. Für das Verfahren von Schoon (2014) spricht, dass eventuelle Trainingsfehler noch nicht mit dem Zielgeruch verknüpft werden.

In dieser Studie wurde nach der Geruchserkennung das Anzeigeverhalten trainiert. Mit dieser Anzeige sollten die Hunde mit einer spezifischen Verhaltensweise zeigen, wenn sie den Zielgeruch wahrnehmen. Die Hundeführer in dieser Studie wählten als Anzeigeverhalten, dass ihr Hund mit der Nase mindestens 3 Sekunden an dem positiven Probengefäß „einfrieren“ (n=6) (Nasentarget), eine Pfote auf das Probengefäß stellen (n=1) oder sich davor hinlegen (n=3) sollte. Alle drei Varianten sind passive Formen der Anzeige, denn der Hund ist bewegungslos. Bei der passiven Anzeige von Sprengstoff sollen die Hunde keinerlei Kontakt mit dem Probengefäß haben. Dann wären sogar die hier gewählten Varianten noch „zu aktiv“. Bei einer aktiven Form der Anzeige soll sich der Hund zum Zielgeruch vorarbeiten. Das war in unserem Aufbau zum einen nicht nötig und zum anderen wäre ein zu aktives Verhalten eher hinderlich, weil die Probengefäße einfach nur auf dem Boden standen. Inwieweit die Anzeigeform Einfluss auf das Ergebnis hat, konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden. Schoon (1996) diskutiert in einer Arbeit, dass Apportieren des Zielobjektes als Anzeige nachteilig sein kann, weil es für den Hund selbstbestätigend sein kann. Apportiert der Hund das falsche Zielobjekt bestätigt er sich selber für das falsche Verhalten.

Der in dieser Studie verwendete Aufbau der Trainingsschritte wird „Rückwärtsaufbau“ genannt, da zuerst das letzte Verhalten der später vollständigen Verhaltenskette trainiert wird. Beim Vorwärtsaufbau würden die Verhalten in der Reihenfolge trainiert, in der sie später vom Hund gezeigt werden sollen. Der Vorteil des Rückwärtsaufbaus liegt darin, dass das Tier im Laufe der Verhaltenskette immer sicherer wird (Pfaller-Sadovsky et al., 2017). Es kennt die Aufgaben, die später in der Kette kommen, durch diesen Trainingsaufbau schon.

Außerdem dienen die besser bekannten Verhalten (Anzeigen) als Verstärker für die noch zu etablierenden Verhalten (Suchen und Finden) (Bellamy et al., 1978; Kelleher et al., 1966). In den Trainingsschritten 5 -10 sollten die Hunde lernen, die positive Probe von den negativen Proben zu unterscheiden. Hierbei wird darauf geachtet, dass durch einen geeigneten Trainingsaufbau, die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler des Hundes sehr gering ist. Es wurde das Prinzip des fehlerfreien Lernens angewendet. Terrace (1963) zeigte, dass Tauben eine Unterscheidungsaufgabe mit fehlerfreiem Lernen stabiler und schneller lernten, als wenn sie im Trainingsaufbau zu viele Fehler machten. Die Fehlerwahrscheinlichkeit wurde zum einem dadurch verringert, dass anfangs mit nur 2 Probengefäßen (eine positive und eine negative Probe) trainiert wurde und zum anderen, dass die positive Probe näher bei dem Hund aufgestellt wurde als die negative Probe. Schrittweise wurde die Anzahl der Proben erhöht und die Aufstellung der Proben in eine kreisförmige Aufstellung adaptiert. Für die Trainingsschritte 12 und 13, in denen unbekannte Gerüche in die „negativen“ Probengefäße als Ablenkung eingeführt werden und 14, in dem das Training doppel blind durchgeführt wird, benötigten die Hunde im Mittel mehr Zeit als für die anderen Trainingsschritte. Es schien, dass es für die Hunde schwieriger war, ähnliche Gerüche verschiedener Erreger von Anzuchtplatten zu unterscheiden, als den Geruch von Anzuchtplatten mit oder ohne Geruch von *Staphylococcus aureus*. Das stimmt auch mit den Ergebnissen von Fischer-Tenhagen et al. (2017) überein. In deren Studie brauchten Hunde weniger Zeit einen Einzelgeruch (Kamille) zu erlernen, als diesen Geruch in einer Geruchsmischung (Kamille als gemeinsame Komponente in Kräutermischung) zu identifizieren.

In Experiment 1 erreichten 8 von 10 Hunden das Trainingsziel, somit war das Trainingsprotokoll geeignet, den Erregergeruch von einer Agarplatte zu trainieren. Die zwei Hunde, die das Ziel nicht erreichten, hätten mehr Zeit gebraucht als im Rahmen der Studie zur Verfügung stand. In Experiment 2 war das Trainingsergebnis allgemein unzureichend (4 von 6 Hunden haben den Test nicht vollendet, weil zu sehen war, dass die Hunde mit der Aufgabe überfordert waren), wogegen durch eine Anpassung des Trainings in Experiment 3 wiederum das Trainingsziel erreicht werden konnte, indem wieder Zwischenschritte im Trainingsprotokoll eingebaut wurden.

Eine wichtige Aufgabe von Trainingsprotokollen ist die, dass sie angepasst werden. Wird im Laufe des Trainings festgestellt, dass es an einer Stelle Probleme gibt (wie hier anfangs bei Experiment 2), dann ist es wichtig, das Trainingsprotokoll zu ändern und anzupassen.

Bei einigen Trainingsprotokollen im Suchhundetraining in der Literatur erreichen nur die Hälfte oder weniger Hunde das Trainingsziel (Hall et al., 2013; Maejima et al., 2007).

Dagegen testeten Polgár et al. (2016) die Eignung von Hunden als Suchhunde in einem Test ohne vorheriges Training. In dieser Studie waren 85% der Hunde in der Lage Futter unter

unterschiedlich schweren Bedingungen zu finden. Es sollte ein Versuchsaufbau getestet werden, der keinerlei Training voraussetzte (Polgár et al., 2016). Man kann also vermuten, dass den Hunden das Suchen nicht beigebracht werden muss, sondern nur der Geruch, nach dem der Hund suchen soll. Ein mangelnder Trainingsfortschritt und ein schlechtes Testergebnis sollten dazu führen, dass das Trainingsprotokoll kritisch hinterfragt wird. Sind exakte Trainingsprotokolle vorhanden, dann ist es auch möglich, unterschiedliche Trainingsprotokolle zu vergleichen und mit der Zeit zu einer Art „Universal-Trainingsprotokoll“ zu kommen.

### 5.1.2 Trainingsmethoden in der Sucharbeit

In der Literatur werden unterschiedliche Trainingsmethoden beschrieben. So werden bei Walker et al. (2006) Hunde trainiert, indem sie an der positiven Probe mit dem Hinterteil auf den Boden gedrückt werden, bis sie sich hinsetzen. Nach der Lerntheorie (Skinner, 1938) ist das als eine negative Verstärkung zu verstehen. In dieser Theorie bedeutet negative Verstärkung, dass ein unangenehmer Reiz (Druck) bei richtigem Verhalten wegfällt. Im Anschluss erhalten die Hunde bei Walker et al. (2006) eine Futterbelohnung, daher bezeichnen die Autoren diese Trainingsmethode auch als positive Verstärkung. Das sind allerdings gemischte Techniken, die bei Hunden zu Stress führen können, weil sie nicht wissen, was sie erwartet (Deldalle et al., 2014). In den Arbeiten von Johnen (2016) und Fischer-Tenhagen et al. (2013) wird auch mit positiver Verstärkung gearbeitet. Hier allerdings erhält der Hund die Belohnung, wenn er selbstständig, ohne körperliche Hilfe; das gewünschte Verhalten zeigt. Unerwünschtes Verhalten wird ignoriert. Genauso wurde auch in dieser Studie verfahren. Das Futter wurde dann von den Hundeführern gegeben. Hall et al. (2013) haben in ihrem „Training mit differentieller Belohnung“ gezeigt, dass die Hunde besser lernen, wenn sie das Futter von ihrem Menschen bekommen, als wenn sie es sich selber nehmen können bei richtiger Anzeige. Die Hunde erhielten bei Hall et al. (2013) einmal das Futter aus dem Behälter mit dem Zielgeruch oder alternativ vom Hundehalter beim Riechen an dem positiven Behälter. Die Hunde, die vom Halter bestätigt wurden, lernten die Aufgabe schneller.

In vielen Studien erfolgt keine Konsequenz, wenn der Hund eine negative Probe anzeigt. Allerdings gibt es auch Beispiele, in denen die Hunde einen leichten Tadel erhalten (Gordon et al., 2008; Walczak et al., 2012) oder eine Auszeit von 10 sec bis 1 min (Zimmerman und Ferster, 1963).

Auch in anderen Arbeitsfeldern mit Hunden, wie z.B. der Arbeit an Vieh, konnte gezeigt werden, dass die Arbeit mit positiver Verstärkung bessere Ergebnisse bringt (Arnott et al., 2014).

### 5.1.3 Trainingszeiten und Kriterien

Obwohl in dieser Studie versucht wurde, das Trainingsprotokoll und damit die Kriterien für die einzelnen Trainingssessions so klar wie möglich zu machen, war die Einhaltung des Planes nicht immer möglich. Das wurde besonders in Experiment 3 deutlich, weil die Probenanzahl beschränkt war. Hund A fiel eine lange Zeit wegen Krankheit aus, die Hunde E und K hatten eine sehr lange Anfahrt, so dass sie nicht immer beim Training dabei waren. Durch die Art und Weise der Probenbereitung konnten die Hunde dann die versäumten Trainingsschritte nicht nachholen, sondern mussten beim jeweilig anstehenden Trainingsschritt weitermachen.

Außerdem waren für unterschiedliche Hunde bzw. Hund-Hundeführer-Teams unterschiedliche Trainingszeiten notwendig aus verschiedenen anderen Gründen. Mal war es ein Trainingsfehler, der wieder ausgegübelt werden musste, mal war es, dass der Hundeführer seinen Hund besser lesen lernen musste und dadurch mehr Wiederholungen brauchte. Ein anderes Mal machten die Hunde aus - für uns - unerklärlichen Gründen Fehler und es mussten für die Motivation der Hundeführer erfolgreiche Sessions erreicht werden. Auch beim Training von Mienensuchhunden wurde schon beschrieben, wie das Trainingsprotokoll individuell auf einzelne Hunde angepasst werden musste, weil die Fehlerhäufigkeit zu groß wurde (Fjellanger et al., 2002).

Es ist noch nicht klar, inwieweit die Pausen zwischen den Trainingssessions oder die Anzahl der Trainingssessions das Training beeinflussen. Meyer und Ladewig (2008) untersuchten in einer Studie ob Hunde schneller lernten, wenn sie einmal pro Woche oder fünfmal pro Woche trainiert wurden. Das Ergebnis war etwas widersprüchlich. Denn es zeigte, dass die Hunde, die einmal pro Woche trainiert wurden, die Übung in signifikant weniger Trainingssessions lernten, als die Hunde, die fünfmal die Woche trainiert wurden. Allerdings brauchten die Hunde, die fünfmal die Woche trainiert wurden, signifikant weniger Trainingstage. Trotzdem war der Schluss der Autoren, dass Hunde besser nur einmal pro Woche trainiert werden sollten. In der Diskussion wurde aber nicht berücksichtigt, dass die Trainer vielleicht auch etwas in den fünf Tagen gelernt haben, was einen Unterschied gemacht haben könnte bei den Tieren, die sie dann in der Folgezeit einmal die Woche trainierten. Das Ergebnis, dass wöchentliche Trainingssessions besser sind, wurde in einer anderen Studie bestätigt (Demant et al., 2011). Dabei wurden vierundvierzig Beagle entweder in einer oder in mehreren Trainingssessions täglich bzw. wöchentlich trainiert. Wenige Trainingssessions wöchentlich führten zum besten Ergebnis. Eine Studie mit Ponys kam zu demselben Ergebnis (Rubin et al., 1980). Die Ponys, die einmal die Woche trainiert wurden, erreichten das Trainingsziel in weniger Trainingssessions als die, die siebenmal in

der Woche trainiert wurden. Allerdings gibt es auch Studien, die das Gegenteil belegen. Kusunose und Yamanobe (2002) zeigten an zwölf jungen Pferden, dass tägliches Training die besten Ergebnisse brachte. Unsere Trainingssession in Experiment 2 und 3 lagen zwei bis sieben Tage auseinander, bei Fehlen der Hunde entsprechend mehr. Es ist also davon auszugehen, dass das nicht ohne Einfluss auf das Training war. Allerdings muss dieser Einfluss in weiteren Studien noch intensiver untersucht werden.

### 5.1.4 Trainingsfehler

Wie in Experiment 2 gezeigt wurde, entstehen auch beim Erstellen und Befolgen eines sehr detaillierten Trainingsprotokolls Trainingsfehler.

Ein Trainingsfehler könnte sein, dass unbewusst ein falsches Verhalten bestätigt wird oder dass die Trainingsschritte zu groß gewählt wurden. So kann es vorkommen, dass der Hundeführer oder die Übungsleiterin die aktuelle Position der positiven Probe verwechselt, und damit das Verhalten des Hundes an der Probe falsch interpretiert. Damit kann es zu verwirrenden Belohnungen für die Hunde kommen. Auch die Hundeführer können so verunsichert werden.

Ein unbeabsichtigtes Belohnen einer negativen Probe kann zu falsch positiven Anzeigen führen. Intermittierende Belohnung führt zu Beibehalten von Verhalten, selbst wenn kein Verstärker mehr da ist (Angle et al., 2016; Nevin, 1988).

Da diese Fehler menschliches Versagen sind, werden sie leider in den Veröffentlichungen selten diskutiert. Nur in einer Studie, in der Primaten trainiert wurden, wird auf Trainingsfehler und deren Folgen eingegangen (Roth, 2012). Ein Tier brauchte für eine Aufgabe 40 Minuten, während zwei andere das in sieben bzw. zehn Minuten erlernten. Es handelte sich um eine Targetaufgabe, d.h. das Tier sollte lernen, ein Objekt (Target) auf eine spezifische Art zu berühren. Bei dem Tier mit der langen Trainingszeit hatte die Trainerin das erste Greifen des Targets übersehen und nicht belohnt. Anschließend wurde häufig nur das Antippen des Targets belohnt, so dass sich das für den Affen als Trainingsziel darstellte. Das vollständige Ergreifen des Targets musste dadurch langwierig eingeübt werden.

Ein weiterer möglicher Trainingsfehler liegt in der Auswahl der Geruchsproben. Wenn sich die negativen Proben noch in anderen Aspekten von den positiven unterscheiden, kann der Hund diese Differenzen als diskriminative Stimuli lernen (Edwards et al., 2017). Wenn z.B. die positiven Milchproben alle von einem Betrieb kämen oder z.B. immer von frischmelkenden Kühen, dann könnten die Hunde das als diskriminativen Stimulus lernen. Auch jede systematische Andersbehandlung der positiven und negativen Proben kann zu anderen Stimuli führen, die die Hunde lernen (Edwards et al., 2017).

### 5.1.5 Können der Trainer

Obwohl Trainingsfehler vermutlich nie vollständig verhindert werden können, kann die Ausbildung der Trainer eine große Rolle für den Trainingserfolg spielen (Ramirez, 1999; Bailey, 2006). Während das Können und die Leistung der Hunde durchaus untersucht wird (Rooney et al., 2007), sind wenige Angaben über das Können der Trainer in Veröffentlichungen zu finden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Qualifikation der Trainer schwer zu beschreiben ist. In einer Arbeit wird die Erfahrung der Trainer in „Jahren Trainingserfahrung“ angegeben (Coleman et al., 2008). Eine genauere Angabe bietet Roth (2012) mit 22 Monaten praktischer Trainingserfahrung von täglich ca. 2 – 3 Stunden an 3 – 4 Tagen pro Woche und einer fünfwöchigen praktischen Ausbildung für Trainer (Modul 1: operante Konditionierung, Timing; Modul 2: Trainingsplan und Trainingskriterien; Modul 3: Kommando und Signalkontrolle; Modul 4: Verhaltenskette; Modul 5: Training unterrichten). Wie auch Alexander et al. (2011) diskutieren, kann man annehmen, dass erfahrene Trainer die Hunde besser ausbilden können als weniger erfahrene. Allerdings konnte in zwei Studien kein Zusammenhang zwischen Trainingserfahrung (Alexander et al., 2001) bzw. zwischen dem Besuch einer Hundeschule (Arnott et al., 2014) und der Leistung der Hunde gefunden werden.

Dieses wichtige Kriterium „Praktische Erfahrung und Können der Trainer“ wird in vielen wissenschaftlichen Arbeiten, in denen es um Training der Hunde geht, vernachlässigt, gerade auch im Hinblick auf das Zusammenbringen von Training und wissenschaftlicher Verhaltensanalyse (Morris, 2003).

### 5.1.6 Kommunikation und Lernverhalten

In der vorliegenden Studie sollten die Hunde den diskriminativen Reiz (Geruch von *Staphylococcus aureus*) mit dem Zeigen eines Anzeigeverhaltens verknüpfen. Wir haben es dabei mit der Kommunikation zwischen Hund und Mensch zu tun. Der Mensch spielt während des Trainingsprozesses eine entscheidende Rolle, da er die Verstärker liefert. Das spezielle Signal des Senders, das der Kommunikation dient (Krebs und Davis, 2009) kommt letztendlich gar nicht vom Menschen, sondern aus der Umgebung. Die Hunde haben also die Aufgabe, den diskriminativen Stimulus (Skinner, 1953) erst herauszufinden. Dabei besteht die zusätzliche Schwierigkeit, dass die Hunde anscheinend bevorzugt Signale durch den Menschen nutzen (Szetei et al., 2003). Elgier et al. (2009) haben in einem Versuch gezeigt, dass Hunde ihr Verhalten den Bedingungen anpassen konnten. Die Hunde lernten auf die Signale der Menschen zu reagieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass das Verhalten gelöscht wurde, wenn es nicht mehr zum Erfolg führte, die Hunde das Verhalten also nicht

mehr zeigten. Die Hunde konnten sogar lernen, die jeweils andere Wahl zu treffen, wenn das Signal der Hundehalter zuverlässig auf die negative Probe hindeutete. Das zeigt wie sehr die Hunde darauf bedacht sind optimale Strategien zu nutzen, um Zugang zu Verstärkern zu erhalten, und dass sie ihr Verhalten auch je nach Situation ändern (Elgier et al., 2009). Inwieweit die Hunde auf der Suche nach anderen diskriminativen Stimuli sind, ist schwer zu beurteilen. Wenn aber schon dreimal hintereinander die positive Probe auf einer ganz bestimmten Stelle steht, (was auch mit Zufallsgenerator passiert), ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass dieser Ort für den Hund zum diskriminativen Stimulus wird. Es könnte auch die Probe sein, die der Hundehalter zuletzt angefasst hat, die am meisten nach Mensch riecht. Weitere, ungewollte Stimuli sind denkbar. Auf manche mögliche falsche Stimuli kann man im Studienaufbau eingehen. So achteten wir darauf, die Probengefäße gleich häufig anzufassen. Die Hunde und Hundeführer waren im Test nicht anwesend beim Aufbau der Probenanordnung. Aber die Ortsverknüpfung kann z.B. nicht ausgeschlossen werden in unserem Aufbau. Allerdings war die Wahrscheinlichkeit, dass die positive Probe immer an der selben Stelle stand, durch die Randomisierung und die hohe Zahl der Probengefäße gering. Wir konnten auch nicht alle Bestandteile des Zielgeruches kontrollieren. Es könnte z.B. sein, dass die positiven Mastitisproben von Tieren mit einer anderen Futterzusammensetzung als die negativen stammen. Beim Training mit Geruch ist es nicht sicher möglich zu kontrollieren, ob wir „das Richtige“ verstärken. Denn wir wissen nicht, was der Hund in dem Moment wahrnimmt und verknüpft, selbst wenn Timing und alle von uns zu kontrollierenden Fakten stimmen würden.

## 5.2 Der Zielgeruch

Eine besondere Herausforderung beim Training auf einen spezifischen Geruch ist es, dass der Trainer nicht einschätzen kann, wie schwer es für den Hund ist, unterschiedliche Geruchskonzentrationen und Geruchsqualitäten zu riechen oder zu differenzieren. Damit kann der Trainer die Stärke des Reizes und damit den Schwierigkeitsgrad der Trainingsaufgabe nicht abschätzen (Lesniak et al., 2008). In einem sinnvollen Trainingsplan würde mit einem starken Reiz begonnen, der dann schrittweise verringert wird. Walker et al. (2006) konnten zeigen, dass Hunde lernen konnten N-Amyl-Azetat in einer Konzentration von  $10^{-9}$  zu erkennen. Die Leistung wurde durch schrittweise Verdünnung des Zielgeruches erreicht. Die Autoren gingen davon aus, dass die Hunde für das Erlernen des Geruches eine höhere Konzentration benötigten.

In unserem 1. Experiment wurde den Hunden der Bakteriengeruch von Reinkulturen, die auf Blutagar kultiviert worden, präsentiert. Es wurde angenommen, dass der Geruch in

ausreichender Menge auf die Baumwolltupfer übertragen wurde. Als Negativprobe wurden anfangs der Geruch von Agarplatten ohne Erreger verwendet, um es den Hunden leicht zu machen, den Bakteriengeruch als Zielgeruch zu identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass ein Geruch schneller gelernt wird, wenn er dem Hund als Einzelgeruch präsentiert wird, als wenn er als Komponente in einer Geruchsmischung vom Hund herausgefiltert werden muss (Fischer-Tenhagen et al., 2017). Erst im weiteren Trainingsverlauf wurde der Geruch von anderen Bakterien, die als Reinkultur angezüchtet wurden, als Negativgeruch eingeführt. In Experiment 1 konnten 8 von 10 Hunden das Trainingsprotokoll bewältigen. Im anschließenden Test konnten wir zeigen, dass die Hunde durch diesen Trainingsaufbau gelernt hatten, den Geruch von *Staphylococcus aureus* von Agarplatten zu erkennen und vom Geruch anderer Bakterienarten zu unterscheiden.

Für Experiment 2 wurden standardisierte Milchproben hergestellt, die eine Erregerkonzentration von ca.  $10^3$  KbE enthielten. Unterschiedliche Autoren zeigten, dass 100 KbE/ml (Barkema et al., 1998) bzw.  $10^5$  KbE/ml (Grönlund et al., 2003) ausreichen, um eine klinische Mastitis bei Milchkühen zu verursachen. Das Trainingsergebnis in unserem Test war unzureichend. Es scheint, dass die Bakterienkonzentration zu niedrig war um einen ausreichend großen Geruchsreiz zu bilden. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Milch die Abgabe von ausreichendem Geruch verhindert hat. In dem Trainingsprotokoll für Experiment 2 wurden so zeitgleich 2 Veränderungen im Vergleich zum Experiment 1 durchgeführt: einmal wurde die Bakterienkonzentration stark reduziert, zum anderen wurde das Medium, in dem die Bakterien präsentiert wurden, geändert. Es hätte vermutlich ein besserer Trainingserfolg erzielt werden können, wenn entweder mit einer niedrigeren Bakterienkonzentration auf Blutagar oder mit einer deutlich höheren Bakterienkonzentration in Milch trainiert worden wäre. Entsprechende Trainingschritte wurden daraufhin ins Protokoll eingefügt.

Es ist bekannt, dass eine Änderung der Geruchskonzentration auch eine Änderung der Geruchsqualität bewirken kann (Gross-Isseroff und Lancet, 1988). In dieser Studie wurden menschlichen Probanden Geruchspaare gezeigt und sie sollten sie als gleich oder unterschiedlich einstufen. Bei ähnlicher Konzentration war das zu 90 % möglich. Aber schon bei einem 100fachen Unterschied in der Konzentration des Geruches waren die Ergebnisse nur noch zu 10 % richtig. Es kann also sein, dass der Geruch von *Staphylococcus aureus* in Milch so verändert war, dass die Hunde ihn nicht erkannt haben. Es kann aber auch sein, dass die Konzentration so niedrig war, dass die Hunde sie nicht mehr wahrnehmen konnten. Training und Übung können in ganz besonderem Maße eine Fähigkeit bis zu dem Punkt verbessern, dass Leistungen erbracht werden können, die andere für unmöglich halten würden (Eriksson, 2007). Die Entwicklung und Ausprägung der *Glomerula* wird ebenfalls von

den Gerüchen bestimmt, denen das Tier ausgesetzt ist. Trainiert man einen Hund auf einen bestimmten Geruch, wird das entsprechende *Glomerulum* größer (Takiguchi et al., 2008), womit eine verbesserte Geruchswahrnehmung, also auch bei geringere Konzentrationen, einhergeht.

Es ist anzunehmen, dass in unserem ursprünglichen Trainingsaufbau in Experiment 2 die Hunde noch an ihre Leistungsgrenze kamen und überfordert waren.

In Experiment 3 wurde mit einer deutlich höheren Bakterienkonzentration in Milch trainiert, in der Annahme, dass die Hunde dann den Zielgeruch besser erkennen können. Das Trainingsprotokoll sah vor, dann die Konzentration schrittweise wieder zu verringern, um Konzentrationen zu erreichen, die in Milch von an Mastitis erkrankten Kühen vorkommen. Alle sechs Hunde, die das Training für Experiment 3 begannen, schlossen dieses Training erfolgreich ab und konnten im anschließenden Test *Staphylococcus aureus* in Milch mit einer Sensitivität von 83,3 % und einer Spezifität von 97,9 % erkennen. Die benötigte Trainingszeit war vergleichbar mit Experiment 1.

Mit Experiment 4 prüften wir, ob die Hunde, die erfolgreich für Experiment 3 trainiert worden sind, den Zielgeruch auch in Milchproben von an Mastitis erkrankten Kühen erkennen konnten. Diese Milchproben waren z.T. grobsinnlich stark verändert, was vermutlich auch einen Einfluss auf deren Geruch hatte. Fünf von den sechs Hunden konnten das Gelernte generalisieren und *Staphylococcus aureus* in den Proben erkennen. Der 6. Hund war zu einem späteren Zeitpunkt in die Studie aufgenommen worden, und wurde in einem kürzeren Zeitraum trainiert. Es ist eine mögliche Annahme, dass dies einen Einfluss hatte, dass er diese Transferaufgabe nicht bewältigen konnte. Oldenburg et al. (2016) zeigten am Beispiel von Otter-Kotproben unterschiedlichen Alters, dass Hunde in der Lage sind von wenigen trainierten Gerüchen auf untrainierte Geruchsvarianten zu generalisieren.

Unsere Hunde erkannten *Staphylococcus aureus* in immer neuen Proben. Im Test wurde keine positive Probe mehrmals verwendet. Negative Proben mussten aus organisatorischen Gründen vereinzelt wiederholt verwendet werden. Auf diese Weise konnten wir weitestgehend ausschließen, dass ein anderer Hinweis zum Wiedererkennen einer Probe gelernt wurde. Wenn Proben getestet werden, die im Training schon verwendet wurden (Edwards et al., 2017), beinhaltet das die Gefahr, dass der Hund nicht den Zielgeruch anzeigt, sondern einen Begleitgeruch anzeigt, der für diese Einzelprobe spezifisch ist. Hunde sollen in der Lage sein, sich zahlreiche Individualgerüche zu merken (Johnston, 1999).

### 5.3 Test

#### 5.3.1 Anordnung der Probengefäße

Die Anordnung der Probengefäße in einem Geruchstest mit Hunden kann einen Einfluss darauf haben, mit welcher Wahrscheinlichkeit die richtig positive Probe angezeigt werden kann. In dem verbreiteten Testaufbau 1 aus X Proben ist die Wahrscheinlichkeit, dass die 1. Probe positiv ist  $1/X$ . Ist die letzte Probe in der Reihe allerdings die positive, und der Hund hat alle negativen Proben abgesucht, ist die Wahrscheinlichkeit, dass die letzte Probe positiv ist, 100%. Das heißt mit jeder richtig negativ abgesuchten Probe verändert sich bei einer Anordnung 1 aus X die Wahrscheinlichkeit der verbleibenden Proben positiv zu sein. Das heißt auch, dass die Anzahl der abzusuchenden Proben möglichst hoch sein sollte. Daher wurde in dieser Untersuchung mit 10 Proben gearbeitet. In Experiment 3 und 4 gab es nur 7 Proben. Dies war einer Ressourcenknappheit geschuldet, weil nur eine bestimmte Anzahl an Proben vorhanden war.

Weiterhin besteht ein Unterschied darin, ob die Proben in einer Reihe („Line up“) mit einem Anfang und Ende oder in einem Kreis ohne definierten Startpunkt angeordnet sind. Bei einer Reihe entwickelt sich bei etwas erfahrenen Hunden eine Erwartungshaltung, dass er vor dem Ende der Reihe etwas anzeigen soll (Oxley and Waggoner, 2009). Das kann zu vermehrt falsch positiven Anzeigen führen. Schoon (1996) hat deshalb ein komplexeres Testsystem mit 2 Reihen und Negativdurchgängen entwickelt. So lernen die Hunde, dass mitunter keine positive Probe in der Versuchsreihe enthalten ist und es wird keine falsche Erwartung erzeugt. Im vorliegenden Experiment wurde die Kreisform gewählt und in Experiment 3 und 4 konnte die Anzahl der positiven Proben von 0 - 2 positiven Proben in einem Durchgang variieren. Bei Koivusalo et al. (2017) suchte der Hund immer nur 3 Probenbehälter ab, was die Wahrscheinlichkeit die richtige Probe anzuzeigen natürlich sehr erhöht und bei der Bewertung der Riechleistung berücksichtigt werden muss.

Um wirklich richtig positive, falsch positive, richtig negative und falsch negative Anzeigen zu testen, ist es nötig, dass die Hunde alle Proben absuchen und dass die Hundeführer nicht wissen, wie viele positive Proben im Test enthalten sind (Schoon, 1996; Edwards et al., 2017). Auch das wurde bei den vorliegenden Experimenten sichergestellt.

#### 5.3.2 Einfluss der Hundeführer auf die Leistung des Hundes

Der Mensch, der den Hund im Test führt, kann auch einen Einfluss auf die Leistung des Tieres haben. Überzeugungen des Menschen können sich auf den Hund übertragen. Lit et al. (2011) konnten zeigen, dass Hunde zuverlässig ein leeres Versteck anzeigten, nachdem

dem Hundeführer mitgeteilt wurde, dass dort der Zielgeruch sei. Trainingsschritt 14 in unserem Trainingsprotokoll diente dazu, dass die Hund-Mensch-Teams üben, unter Testbedingungen zu arbeiten. Das war also sowohl ein Trainingsschritt für die Menschen, unter Testbedingungen zu arbeiten als für die Hunde, unter diesen Bedingungen ihr trainiertes Verhalten zu zeigen. In einer Studie von Keeling et al. (2009) mit Pferden wurde gezeigt, dass sich die Unsicherheit des Menschen auf das Tier überträgt. Hier wurden Pferde vier Mal über eine bestimmte Strecke geführt oder geritten. Beim letzten Durchgang wurde den Menschen suggeriert, es würde neben der Strecke plötzlich ein Schirm geöffnet werden, was aber nicht geschah. Die Erwartung eines überraschenden Ereignisses führte bei den Menschen zu einer erhöhten Herzfrequenz, die wiederum auch bei den Pferden zu einer Erhöhung der Herzfrequenz führte. Bei Suchaufgaben beschrieben sowohl Schoon (1996) als auch Jezierski et al. (2014), dass die Unsicherheit bzw. die Aufregung der Hundehalter einen Einfluss auf das Suchverhalten der Hunde hatten. Die Hundehalter veränderten im Test u.a. ihre Routine, wie die Hunde zur Suche vorbereitet wurden. Die Folgen waren mehr Falsch-Anzeigen oder längere Suchzeiten im Vergleich mit den Trainingssituationen. Die Menschen waren sich der Änderung nicht bewusst und begründeten es mit der Erregung vor dem Test. Hinzu kommt, dass in der Testsituation Hundeführer das Verhalten oft falsch einschätzen. So wurde z.B. in einer Studie beschrieben, dass die Hunde Kadavergeruch anzeigten, diese Anzeige jedoch von den Hundeführern in 10% der Fälle nicht erkannt wurde (Lasseter et al., 2003).

Auch die Hundeführer in der vorliegenden Studie zeigten Stresszeichen und berichteten im Anschluss von ihrer Aufregung.

### 5.3.3 Verblindung der Hundeführer und des Übungsleiters

Die Tests wurden doppel blind durchgeführt. Weder der Hundeführer noch der Übungsleiter kannten die Position der Gefäße mit den positiven Proben. Damit sollten unbewusste Hinweise der Menschen auf die richtige Probenposition vermieden werden. Der Beobachter im Nebenraum, der den Test über einen Bildschirm verfolgte und den Status der Proben kannte, gab Feedback, wenn er vom Hundeführer die positive Probe genannt bekam (Elliker et al., 2014). Damit war ein unbewusstes Beeinflussen der Hunde ausgeschlossen.

In der Studie von Bomers et al. (2012) zur Identifizierung von *Clostridium difficile* wurde beschrieben, dass zwar der Hundeführer, nicht aber der Übungsleiter verblindet war. Das kann das Testergebnis beeinflussen. Engeman et al. (1998) überprüften in ihrer Studie die Effizienz der Hunde und konnten zeigen, dass die Hunde zunächst nur eine Erfolgsrate von 38% hatten. Erst als die Teilnehmer wussten, dass Proben versteckt waren, stieg das Ergebnis auf 70 % und – wenn der Übungsleiter anwesend war – auf 80 %. Allerdings gibt

es auch Studien, in denen gezeigt wird, dass es keinen Unterschied macht, ob einfach blind (d.h. nur der Hundeführer kennt den Probenstatus nicht) oder „doppel blind“ (sowohl Hundeführer als auch Übungsleiter kennen den Probenstatus nicht) gearbeitet wird (McCulloch et al., 2006). Johnen et al. (2013) haben die Testmethoden in Geruchsstudien mit Hunden verglichen und festgestellt, dass in vielen Studien die Tatsache, ob der Test verblindet war, nicht beschrieben wird.

### 5.3.4 Andere Einflüsse auf Ergebnisse von Tests mit Suchhunden

In dieser Studie konnten wir aufgrund einer zu geringen Anzahl an Hunden keinen Einfluss der individuellen Hunde auf das Testergebnis statistisch nachweisen. In Experiment 1 machten vier von acht Hunden keinen Fehler im Test. In Experiment 2 konnten nur zwei von sechs Hunden den Test bewältigen. In Experiment 4 konnte Hund K den Test nicht beenden, wogegen Hund D eine Sensitivität von 88,9 % und Spezifität von 95,1 % erreichte. Der Einfluss von individuellen Hunden auf das Testergebnis müsste in Versuchen mit größerer Tierzahl dargestellt werden. Die Anzahl der Hunde ist in Geruchsstudien häufig ein limitierender Faktor. In einem systematischen Review zu Geruchsstudien mit Hunden war die durchschnittliche Anzahl der Hunde 4,6 (Johnen et al., 2013).

Ein Faktor könnte die Rasse der Hunde sein. Dazu gibt es in der Literatur widersprüchliche Aussagen. Anatomisch konnten keine Unterschiede bei der Anzahl der Riechrezeptorgenen gefunden werden bei Hunden, die auf Riechleistung gezüchtet wurden (Jagdhunde), auf Sicht arbeiten (Collies) oder bei Schoßhunden (Issel-Tarver und Rine, 1996). Aber die Anzahl der Pseudogene, die bei der Expression der Riechrezeptoren beteiligt sind, unterscheidet sich bei den einzelnen Rassen (Tacher et al., 2005). In einer Umfrage von Trainern von Sprengstoffhunden bevorzugten die Trainer Englische Springer Spaniel, Labradore, Border-Collies oder Mischlinge (Rooney et al., 2004). Einige Autoren berichteten über Unterschiede in der Trainierbarkeit und Motivation von verschiedenen Rassen (Maejima et al., 2007). Polgár et al. (2016) konnten zeigen, dass auf Riechleistung gezüchtete Hunde besser suchen als Hunde, die für andere Aufgaben gezüchtet sind, und kurznasige Hunde. Das Alter der Hunde hat vielleicht einen Einfluss auf die Geruchsarbeit. Es gibt widersprüchliche Angaben in der Literatur. Bei Rettungshunden wurde kein signifikanter Unterschied der Arbeit mit dem Alter gefunden (Greatbatch et al., 2015). Der Geruchssinn wird beim Menschen mit zunehmenden Alter schlechter (Doty et al., 1984). In dieser Studie hatte das Alter der Hunde keinen Einfluss auf die Genauigkeit.

Die relative Luftfeuchtigkeit, Wind, Temperatur werden als Einflussfaktoren auf die Riechleistung der Hunde diskutiert, wobei es auch hier unterschiedliche Ergebnisse gibt. In einer Studie gab es keinen signifikanten Einfluss der Luftfeuchtigkeit (55-78,4 %),

Windgeschwindigkeit (0-4,9m/s) und der Temperatur (7,2-27,3°C) (Greatbatch et al., 2015). Höhere Windgeschwindigkeiten führten in einer anderen Studie zu größeren Entfernungen, in denen Schildkröten wahrgenommen wurden (Cablak et al., 2008). Da wir im geschlossenen Raum mit relativ konstanten Werten arbeiteten, kann dieser Einflussfaktor bei uns ausgeschlossen werden.

Es wurde auch gezeigt, dass ein beeinträchtigt Wohlbefinden einen Einfluss auf die Leistung der Hunde hat. Obwohl es schwierig ist Wohlbefinden zu messen (Stafford, 2012), wurde schon gezeigt, dass Angst (Horvath et al., 2008) oder Schmerzen (Salgirli et al., 2012) das Lernen beeinflussen können.

#### **5.4 Geruch als diagnostische Methode für Erreger**

In dieser Studie wurden Hunde trainiert den Geruch von *Staphylococcus aureus*, einem wichtigen Erreger von klinischen Mastitiden von Milchkühen, anzuzeigen. *Staphylococcus aureus* ist ein gram positives fakultativ aerobes Bakterium (Rolle et al., 1984). Durch den Stoffwechsel des Bakteriums werden leicht flüchtige Substanzen frei (Kuzma et al., 1995). Bakterien haben einen Geruch (Schulz and Dickschat, 2007). Hunde können den durch die Substanzen gebildeten Geruch erkennen. Im Experiment 1 konnten die Hunde mit einer Sensitivität von 91,3 % und Spezifität 97,9 % auf Blutagar kultivierte *Staphylococcus aureus* identifizieren. Vergleichbare Ergebnisse erzielten (Bruins et al., 2009) mit einer elektronischen Nase. Sie konnten 11 häufige humanpathogene Keime - u.a. *Staphylococcus aureus* - mit einer Spezifität von 67 - 100% differenzieren.

Koivusalo et al. (2017) erzielten je nach Inkubationszeit der Erreger unterschiedliche Ergebnisse, die von 53 bis 99 % Sensitivität und 69 bis 97 % Spezifität reichten. In dieser Studie wurden allerdings verschiedene Stämme von Staphylokokken unterschieden. Kritisch ist anzumerken, dass die Staphylokokkenstämme aus mehreren Laboren stammten, so dass die Hunde die Proben eventuell auch anhand des spezifischen Geruches der jeweiligen Labore unterscheiden konnten.

In einer niederländischen Studie (Bomers et al., 2012) wurde ein Beagle trainiert *Clostridium difficile* im Stuhl von menschlichen Patienten zu erschnüffeln. Der Hund erreichte eine Sensitivität und Spezifität von 100 % bzw. 94 %. In einer anderen Studie wurden Afrikanische Riesenratten (*Cricetomys gambianus*) trainiert *Mycobakterium tuberculosis spp. tuberculosis* im Sputum von lungenkranken Menschen zu erkennen. In einem 35 Tage dauernden Versuch mit 16 Ratten und 2597 Sputumproben lag die durchschnittliche Sensitivität bei 87,8 % und die Spezifität bei 95,9 % (Weetjens et al., 2009).

Die Ergebnisse der genannten Studien, sind mit den Ergebnissen dieser Studie vergleichbar.

Sie deuten darauf hin, dass verschiedene Erreger anhand ihres Geruches identifiziert werden können.

#### 5.4.1 Geruch in der Mastitisdiagnostik

In Experiment 3 erkannten die Hunde Proben von *Staphylococcus aureus* in Milch mit einer Sensitivität von 83,3 % und einer Spezifität von 97,9. In Experiment 4, in der die Hunde Proben von an Mastitis erkrankten Kühen untersuchten, lag die Sensitivität bei 60 % und Spezifität bei 92,8 %. Soweit bekannt, ist dies die erste Studie, in der Hunde trainiert wurden *Staphylococcus aureus* oder andere Mastitiserreger in Milch zu erkennen.

Hettinga et al. (2008b) gelang mit Gaschromatographie mit Massenspektrometrie bei 50 Milchproben die Zuordnung zu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, koagulase-negative Staphylokokken oder *Streptococcus spp.* mit einer 93 %igen Genauigkeit. Das ist vergleichbar mit dem Ergebnis von Hund D in Experiment 4. Eriksson et al. (2005) konnten mit einer elektronischen Nase zuverlässig Mastitismilch von gesunder Milch aus gesunden Eutervierteln unterscheiden. Sie fanden 109 flüchtige Substanzen in den Milchproben, waren aber nicht in der Lage die Erreger in den Milchproben zu unterscheiden.

#### **Ausblick**

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bestätigen, dass bei bakteriellen Infektionen spezifische Gerüche gebildet werden, die zur Diagnose der Erreger geeignet sind und dass diese Gerüche von Hunden wiedererkannt werden können. Es scheint lohnend zu sein, die technischen Methoden weiterzuentwickeln. Hunde oder andere Makrosmatiker wie Ratten sind wichtige Helfer, um zu ermitteln, bei welchen Erregern und Zuständen es sinnvoll ist, nach technischen Methoden zur Geruchserkennung zu forschen.

Im Hinblick auf die Ausbildung von Suchhunden ist sinnvoller, Trainingsprotokolle systematisch weiterzuentwickeln, anstatt sich immer neue auszudenken, weil es sonst nicht wirklich zu einem Fortschritt kommt. Aus erkannten Fehlern der Vergangenheit kann man lernen und versuchen, sie in weiterentwickelten Trainingsprotokollen zu vermeiden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Hunde und ihre Fähigkeiten Gerüche selbst in extrem schwachen Konzentrationen wahrzunehmen, bieten uns viele Möglichkeiten auch in diagnostischen Bereichen in der Medizin.

In dieser Studie untersuchten wir am Beispiel von *Staphylococcus aureus* als Mastitiserreger bei Milchkühen, ob es möglich ist, ein Trainingsprotokoll für Hunde zu entwickeln, dieses Bakterium in der Milch zu erkennen und anzuzeigen.

Dieses Trainingsprotokoll kann als Anleitung dienen zur Geruchsdifferenzierung von Bakterien und als Grundlage zur Weiterentwicklung und Verbesserung.

An dieser Studie nahmen 10 Hundeführer mit ihren privaten Hunden teil.

Sie wurde in 4 Experimenten durchgeführt.

Die Hunde wurden zunächst darauf trainiert auf Agarplatten angezüchtete *Staphylococcus aureus* anzuzeigen. Im Test untersuchten 8 Hunde je 100 Probengefäße, davon enthielten 10 Geruchsträger mit *Staphylococcus aureus*. Vier Hunde zeigten fehlerfrei alle positiven Proben richtig an und erreichten damit eine Sensitivität und Spezifität von 100 %. Im Durchschnitt aller Hunde lag die Sensitivität bei 91,3 % und die Spezifität bei 97,9 %.

Im zweiten Experiment sollten die Hunde Staphylokokken in Milch erkennen. In diesem Experiment hatten die Hunde Schwierigkeiten den Zielgeruch zu identifizieren. Vermutlich war die Konzentration der Bakterien auf den Geruchsträgern zu gering. Nur 2 von 6 Hunden absolvierten alle 10 Versuchsdurchgänge. Die Sensitivität lag bei 55 % und die Spezifität bei 95 %. Für alle Hunde war die Sensitivität bei 33,3 % und Spezifität bei 92,4 %.

Daraufhin wurde für Experiment 3 das Trainingsprotokoll angepasst, und es wurden Zwischenschritte eingebaut, in denen die Hunde langsam an niedrigere Bakterienkonzentrationen gewöhnt wurden. Jeder Hund suchte im nächsten Test in 15 Durchgängen zu je 7 Proben insgesamt 105 Probengefäße mit Geruchsträgern ab. Die Hunde erreichten im Durchschnitt eine Sensitivität von 83,3 % und eine Spezifität von 97,9%.

Im letzten Experiment wurde getestet, ob so trainierte Hunde in der Lage sind, *Staphylococcus aureus* in Milch zu erkennen, die von an Mastitis erkrankten Milchkühen stammt. Fünf von 6 Hunden konnten den Test erfolgreich beenden. Die Hunde erreichten im Durchschnitt eine Sensitivität von 60 % und eine Spezifität von 92,8 %. Ein Hund erkannte 8 von 9 aus 70 Proben mit dem Zielgeruch und hatte eine Sensitivität von 88,9 % und Spezifität von 95,1 %.

Das Training der Hunde für die Geruchsdifferenzierung von Bakterien ist möglich. Mit dem entwickelten Trainingsprotokoll waren nicht alle Hunde in der vorgegebenen Zeit in der Lage die Aufgabe zu erfüllen. Es gibt viele individuelle Unterschiede, auf die im Trainingsprotokoll noch detaillierter eingegangen werden müsste. Es wurde deutlich, dass kleine Trainingsschritte für die Verhaltensänderung der Hunde wichtig sind, und auch die Konzentrationsänderung des Zielgeruchs als wichtiger Trainingsschritt berücksichtigt werden muss.

Dies ist die erste Arbeit, in der gezeigt wurde, dass Hunde *Staphylococcus aureus* in Milch von an Mastitis erkrankten Milchkühen erkennen und anzeigen können. Es wurde ein Trainingsprotokoll erstellt, mit dem 75% der Hunde das Trainingsziel erreichten und das als Grundlage dienen kann, um Hunde zu trainieren, auch andere Bakterienarten zu unterscheiden.

## 7 SUMMARY

### Training sniffer dogs to detect *Staphylococcus aureus* in mastitis-milk

Dogs and their ability to perceive smells even in extremely weak concentrations offer us many possibilities, even in diagnostic areas in medicine.

In this study, using *Staphylococcus aureus* as a mastitis pathogen in dairy cows, we tested whether it is possible to develop a training protocol for dogs, to recognize and indicate this bacterium in milk.

The training protocol, developed in this study, can serve as a guide to train dogs to differentiate odor of bacteria and is meant as a basis for further development and improvement.

Ten dog handlers took part in this study with their private dogs. It was carried out in 4 experiments.

The dogs were initially trained to indicate *Staphylococci* grown on agar plates. In the test, 8 dogs examined 100 samples each, 10 of which contained odor of *Staphylococcus aureus*. Four dogs correctly displayed all positive samples and achieved a sensitivity and specificity of 100%. On average of all dogs the sensitivity was 91,3 % and the specificity 97,9 %.

In the second experiment, the dogs were asked to recognize *Staphylococcus aureus* in milk. In this experiment, the dogs had difficulty identifying the target smell. We speculate that the concentration of the bacteria for training was probably too low. Only 2 out of 6 dogs completed all 10 trials. The sensitivity was 55 % and the specificity 95 %. For all dogs the sensitivity was 33,3 % and specificity 92,4 %.

The training protocol for experiment 3 was then adapted and intermediate steps were incorporated in which the dogs were slowly accustomed to lower bacterial concentrations. In the next test, each dog searched a total of 105 samples with odorants in 15 rounds of 7 samples each. The dogs achieved an average sensitivity of 83,3 % and a specificity of 97,9 %.

The last experiment tested whether dogs trained in this way are able to recognize *Staphylococcus aureus* in milk that comes from dairy cows suffering from mastitis. 5 out of 6 dogs successfully passed the test. The dogs achieved an average sensitivity of 60 % and a specificity of 92,8 %. One dog recognized 8 of 9 out of 70 samples with the target smell and had a sensitivity of 88,9 % and specificity of 95,1 %.

Dog training for odor differentiation of bacteria is possible. With the developed training protocol, not all dogs were able to complete the task in the given time. There are many individual differences that should be discussed in more detail in the training protocol. It became obvious that small training steps are important for achieving the training objective. , The change in concentration of the target odor must also be considered as an important training step.

This is the first work to show that dogs can recognize and indicate *Staphylococcus aureus* in milk from dairy cows with mastitis. A training protocol was created, with which 75 % of the dogs reached the training goal and which can serve as the basis for training dogs to distinguish other types of bacteria.

,

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Ache, B. W., & Young, J. M. (2005). Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron*, *48*(3), 417-430.
- Alexander, M. B., Friend, T., & Haug, L. (2011). Obedience training effects on search dog performance. *Applied Animal Behaviour Science*, *132*(3-4), 152-159.
- Angle, T. C., Passler, T., Waggoner, P. L., Fischer, T. D., Rogers, B., Galik, P. K., & Maxwell, H. S. (2016). Real-time detection of a virus using detection dogs. *Frontiers in veterinary science*, *2*, 79.
- Arnott, E. R., Early, J. B., Wade, C. M., & McGreevy, P. D. (2014). Environmental factors associated with success rates of Australian stock herding dogs. *PLoS one*, *9*(8), e104457.
- Artursson, K., Nilsson-Öst, M., & Waller, K. P. (2010). An improved method to culture *Staphylococcus aureus* from bovine milk. *Journal of dairy science*, *93*(4), 1534-1538.
- Bailey, B. (2006). Fundamentals of animal training. DVD, Dog sports video
- Bailey, R. E., & Gillaspay, J. A. (2005). Operant psychology goes to the fair: Marian and Keller Breland in the popular press, 1947–1966. *The Behavior Analyst*, *28*(2), 143-159.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Lam, T. J. G. M., Beiboer, M. L., Wilmink, H., Benedictus, G., & Brand, A. (1998). Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *Journal of dairy science*, *81*(2), 411-419.
- Bean, H. D., Jiménez-Díaz, J., Zhu, J., & Hill, J. E. (2015). Breathprints of model murine bacterial lung infections are linked with immune response. *European Respiratory Journal*, *45*(1), 181-190.
- Bellamy, G. T., Inman, D. P., & Schwarz, R. (1978). Vocational training and production supervision: A review of habilitation techniques for the severely and profoundly retarded. *Teaching the severely and profoundly handicapped*, *3*.
- Bentosela, M., Jakovcevic, A., Elgier, A. M., Mustaca, A. E., & Papini, M. R. (2009). Incentive contrast in domestic dogs (*Canis familiaris*). *Journal of Comparative Psychology*, *123*(2), 125.
- Berney, S., Skinner, E. H., Denehy, L., & Warrillow, S. (2009). Development of a physical function outcome measure (PFIT) and a pilot exercise training protocol for use in intensive care. *Critical Care and Resuscitation*, *11*(2), 110.
- Bexiga, R., Koskinen, M. T., Holopainen, J., Carneiro, C., Pereira, H., Ellis, K. A., & Vilela, C. L. (2011). Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *Journal of dairy research*, *78*(1), 49-55.
- Bijland, L. R., Bomers, M. K., & Smulders, Y. M. (2013). Smelling the diagnosis a review on the use of scent in diagnosing. *Neth. J. Med*, *71*(2013), 300-307.
- Bird, R. C. (1996). An examination of the training and reliability of the narcotics detection dog. *Kentucky Law Journal*, *85*, 405.
- Bomers, M. K., van Agtmael, M. A., Luik, H., van Veen, M. C., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Smulders, Y. M. (2012). Using a dog's superior olfactory sensitivity to identify *Clostridium*

difficile in stools and patients: proof of principle study. *BMJ, medizinische Fachzeitschrift*, 345, e7396.

Bradley, A. J., Leach, K. A., Breen, J. E., Green, L. E., & Green, M. J. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160(8), 253-258.

Breland, M., & Bailey, R. E. (1971). *Specialized mine detector dog*. ANIMAL BEHAVIOR ENTERPRISES INC HOT SPRINGS AR.

Breland, K., & Breland, M. (1951). A field of applied animal psychology. *American Psychologist*, 6(6), 202.

Brookes, J., Horsfield, A., & Stoneham, A. (2012). The swipe card model of odorant recognition. *Sensors*, 12(11), 15709-15749.

Brooks, S. E., Oi, F. M., & Koehler, P. G. (2003). Ability of canine termite detectors to locate live termites and discriminate them from non-termite material. *Journal of Economic Entomology*, 96(4), 1259-1266.

Brown, J. (2005). Sniffing with Precision: Detection dogs push the limits of field-monitoring techniques. *Conservation in Practice*, 6(2), 94-95.

Browne, C., Stafford, K., & Fordham, R. (2006). The use of scent-detection dogs. *Irish Veterinary Journal*, 59(2), 97.

Bruins, M., Bos, A., Petit, P. L. C., Eadie, K., Rog, A., Bos, R., ... & van Belkum, A. (2009). Device-independent, real-time identification of bacterial pathogens with a metal oxide-based olfactory sensor. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28(7), 775-780.

Buck, L. B. (1996). Information coding in the mammalian olfactory system. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 61, pp. 147-155). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cablk, M. E., & Heaton, J. S. (2006). Accuracy and reliability of dogs in surveying for desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Ecological Applications*, 16(5), 1926-1935.

Cablk, M. E., Sagebiel, J. C., Heaton, J. S., & Valentin, C. (2008). Olfaction-based detection distance: a quantitative analysis of how far away dogs recognize tortoise odor and follow it to source. *Sensors*, 8(4), 2208-2222.

Cerreta, M. M., & Furton, K. G. (2015). An assessment of detection canine alerts using flowers that release methyl benzoate, the cocaine odorant, and an evaluation of their behavior in terms of the VOCs produced. *Forensic science international*, 251, 107-114.

Chen, M., Daly, M., Williams, N., Williams, S., Williams, C., & Williams, G. (2000). Non-invasive detection of hypoglycaemia using a novel, fully biocompatible and patient friendly alarm system. *BMJ, medizinische Fachzeitschrift*, 321(7276), 1565-1566.

Clarke, S., & Trowill, J. A. (1971). Sniffing and motivated behavior in the rat. *Physiology & behavior*, 6(1), 49-52.

Coleman, K., Pranger, L., Maier, A., Lambeth, S. P., Perlman, J. E., Thiele, E., & Schapiro, S. J. (2008). Training rhesus macaques for venipuncture using positive reinforcement

- techniques: a comparison with chimpanzees. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 47(1), 37-41.
- Concha, A., Mills, D. S., Feugier, A., Zulch, H., Guest, C., Harris, R., & Pike, T. W. (2014). Using sniffing behavior to differentiate true negative from false negative responses in trained scent-detection dogs. *Chemical senses*, 39(9), 749-754.
- Cooper, R., Wang, C., & Singh, N. (2014). Accuracy of trained canines for detecting bed bugs (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of economic entomology*, 107(6), 2171-2181.
- Cornu, J. N., Cancel-Tassin, G., Ondet, V., Girardet, C., & Cussenot, O. (2011). Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: a step forward in early diagnosis. *European urology*, 59(2), 197-201.
- Craven, B. A., Paterson, E. G., & Settles, G. S. (2010). The fluid dynamics of canine olfaction: a new explanation for macrosmia. *Journal of The Royal Society Interface*, 1, 1-11.
- Craven, B. A., Neuberger, T., Paterson, E. G., Webb, A. G., Josephson, E. M., Morrison, E. E., & Settles, G. S. (2007). Reconstruction and morphometric analysis of the nasal airway of the dog (*Canis familiaris*) and implications regarding olfactory airflow. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(11), 1325-1340.
- Craven, B. A., Paterson, E. G., & Settles, G. S. (2009). The fluid dynamics of canine olfaction: unique nasal airflow patterns as an explanation of macrosmia. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(47), 933-943.
- de Bie, H. M., Boersma, M., Wattjes, M. P., Adriaanse, S., Vermeulen, R. J., Oostrom, K. J., ... & Delemarre-Van de Waal, H. A. (2010). Preparing children with a mock scanner training protocol results in high quality structural and functional MRI scans. *European journal of pediatrics*, 169(9), 1079-1085.
- de Hoz, L., Knox, J., & Morris, R. G. (2003). Longitudinal axis of the hippocampus: both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze spatial learning depending on the training protocol. *Hippocampus*, 13(5), 587-603.
- Deldalle, S., & Gaunet, F. (2014). Effects of 2 training methods on stress-related behaviors of the dog (*Canis familiaris*) and on the dog-owner relationship. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 9(2), 58-65.
- Demant, H., Ladewig, J., Balsby, T. J., & Dabelsteen, T. (2011). The effect of frequency and duration of training sessions on acquisition and long-term memory in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 133(3-4), 228-234.
- Dirksen, G. (Ed.). (2006). *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Georg Thieme Verlag.
- Dorey, N. R., & Cox, D. J. (2018). Function matters: a review of terminological differences in applied and basic clicker training research. *PeerJ*, 6, e5621.
- Doty, R. L., Shaman, P., Applebaum, S. L., Giberson, R., Siksorski, L., & Rosenberg, L. (1984). Smell identification ability: changes with age. *Science*, 226(4681), 1441-1443.
- Duden, D. U. (2015). Stichwort: Geruch.
- Dunny, G. M., Leonard, B. A., & Hedberg, P. J. (1995). Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *Journal of bacteriology*, 177(4), 871.

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische GesellschaftL). (2009). Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem, Gießen

Edwards, T. L., Browne, C. M., Schoon, A., Cox, C., & Poling, A. (2017). Animal olfactory detection of human diseases: Guidelines and systematic review. *Journal of veterinary behavior*, 20, 59-73.

Ehmann, R., Boedeker, E., Friedrich, U., Sagert, J., Dippon, J., Friedel, G., & Walles, T. (2012). Canine scent detection in the diagnosis of lung cancer: revisiting a puzzling phenomenon. *European respiratory journal*, 39(3), 669-676.

Elgier, A. M., Jakovcevic, A., Barrera, G., Mustaca, A. E., & Bentosela, M. (2009). Communication between domestic dogs (*Canis familiaris*) and humans: dogs are good learners. *Behavioural processes*, 81(3), 402-408.

Elliker, K. R., Sommerville, B. A., Broom, D. M., Neal, D. E., Armstrong, S., & Williams, H. C. (2014). Key considerations for the experimental training and evaluation of cancer odour detection dogs: lessons learnt from a double-blind, controlled trial of prostate cancer detection. *BMC urology*, 14(1), 22.

Engeman, R. M., Rodriguez, D. V., Linnell, M. A., & Pitzler, M. E. (1998). A review of the case histories of the brown tree snakes (*Boiga irregularis*) located by detector dogs on Guam. *International biodeterioration & biodegradation*, 42(2-3), 161-165.

Engeman, R. M., Vice, D. S., Rodriguez, D. V., Gruver, K. S., Santos, W. S., & Pitzler, M. E. (1998). Effectiveness of the detector dogs used for deterring the dispersal of brown tree snakes. *Pacific Conservation Biology*, 4(3), 256-260.

Eriksson, Å., Waller, K. P., Svennersten-Sjaunja, K., Haugen, J. E., Lundby, F., & Lind, O. (2005). Detection of mastitic milk using a gas-sensor array system (electronic nose). *International dairy journal*, 15(12), 1193-1201.

Feng, L. C., Howell, T. J., & Bennett, P. C. (2018). Practices and perceptions of clicker use in dog training: A survey-based investigation of dog owners and industry professionals. *Journal of Veterinary Behavior*, 23, 1-9.

Firestein, S. (1991). A noseful of odor receptors. *Trends in neurosciences*.

Fischer-Tenhagen, C., Johnen, D., Heuwieser, W., Becker, R., Schallschmidt, K., & Nehls, I. (2017). Odor perception by dogs: evaluating two training approaches for odor learning of sniffer dogs. *Chemical senses*, 42(5), 435-441.

Fischer-Tenhagen, C., Tenhagen B.-A., Heuwieser, W. (2013). Ability of dogs to detect cows in estrus from sniffing saliva samples. *Journal of Dairy Science*, 96(2):1081-1084.

Fischer-Tenhagen, C., Wetterholm, L., Tenhagen, B. A., & Heuwieser, W. (2011). Training dogs on a scent platform for oestrus detection in cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 131(1-2), 63-70.

Fjellanger, R., Andersen, E. K., & McLean, I. (2002). A training program for filter-search mine detection dogs. *International Journal of Comparative Psychology*, 15(4).

Fogle, B. (1988). Search-and-rescue Dogs. *The Canadian Veterinary Journal*, 29(6), 536.

Friedrich, E. V., Neuper, C., & Scherer, R. (2013). Whatever works: a systematic user-centered training protocol to optimize brain-computer interfacing individually. *PLoS one*, 8(9).

- Furton, K. G., & Myers, L. J. (2001). The scientific foundation and efficacy of the use of canines as chemical detectors for explosives. *Talanta*, 54(3), 487-500.
- Gazit, I., Goldblatt, A., & Terkel, J. (2005). Formation of an olfactory search image for explosives odours in sniffer dogs. *Ethology*, 111(7), 669-680.
- Gerritsen, R., & Haak, R. (2010). *K9 Fraud!: Fraudulent Handling of Police Search Dogs*. Brush Education.
- Gialamas, D. M. (1996). Enhancement of fire scene investigations using accelerant detection canines. *Science & Justice*, 1(36), 51-54.
- Glusman, G., Yanai, I., Rubin, I., & Lancet, D. (2001). The complete human olfactory subgenome. *Genome research*, 11(5), 685-702.
- Goldblatt, A., Gazit, I., & Terkel, J. (2009). Olfaction and explosives detector dogs. *Canine ergonomics: The science of working dogs*, 135-174.
- Gordon, R. T., Schatz, C. B., Myers, L. J., Kosty, M., Gonczy, C., Kroener, J., ... & Arthur, N. (2008). The use of canines in the detection of human cancers. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 14(1), 61-67.
- Goss, K.-U. (2016) in Schüler, C., & Kaul, P. (2017). Faszinosum Spürhunde: Gefahren sichtbar machen–Gefahren abwenden. Tagungsergebnisse des 3. Symposiums für Odorologie im Diensthundewesen an der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Schriften der Arbeitsgemeinschaft Odorologie e.V., Band 1, Hamburg 2017, 310 Seiten
- Greatbatch, I., Gosling, R. J., & Allen, S. (2015). Quantifying search dog effectiveness in a terrestrial search and rescue environment. *Wilderness & environmental medicine*, 26(3), 327-334.
- Grönlund, U., Hultén, C., Eckersall, P. D., Hogarth, C., & Waller, K. P. (2003). Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Research*, 70(4), 379-386.
- Gross-Isseroff, R., & Lancet, D. (1988). Concentration-dependent changes of perceived odor quality. *Chemical senses*, 13(2), 191-204.
- Gsell, A., Innes, J., de Monchy, P., & Brunton, D. (2010). The success of using trained dogs to locate sparse rodents in pest-free sanctuaries. *Wildlife Research*, 37(1), 39-46.
- Hall, N. J., Smith, D. W., & Wynne, C. D. (2013). Training domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) on a novel discrete trials odor-detection task. *Learning and Motivation*, 44(4), 218-228.
- Heffner, H. E. (1983). Hearing in large and small dogs: Absolute thresholds and size of the tympanic membrane. *Behavioral Neuroscience*, 97(2), 310.
- Helton, W. S. (2007). Deliberate practice in dogs: a canine model of expertise. *The Journal of general psychology*, 134(2), 247-257.
- Helton, W. S. (2009). Overview of scent detection work. *Canine ergonomics: the science of working dogs*, 83.

- Herrnstein, R. J. (1961). Relative and absolute strength of response as a function of frequency of reinforcement 1, 2. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 4(3), 267-272.
- Hettinga, K. A., Van Valenberg, H. J. F., Lam, T. J. G. M., & Van Hooijdonk, A. C. M. (2008a). Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile bacterial metabolites. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 3834-3839.
- Hettinga, K. A., van Valenberg, H. J. F., Lam, T. J. G. M., & van Hooijdonk, A. C. M. (2008b). Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile metabolites. *Mastitis control*, 199.
- Hildebrand, J. G., & Shepherd, G. M. (1997). Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annual review of neuroscience*, 20(1), 595-631.
- Hornung, D. E. (2006). Nasal anatomy and the sense of smell. In *Taste and Smell* (Vol. 63, pp. 1-22). Karger Publishers.
- Horváth, Z., Dóka, A., & Miklósi, Á. (2008). Affiliative and disciplinary behavior of human handlers during play with their dog affects cortisol concentrations in opposite directions. *Hormones and behavior*, 54(1), 107-114.
- Horvath, G., Järverud, G. A. K., Järverud, S., & Horváth, I. (2008). Human ovarian carcinomas detected by specific odor. *Integrative cancer therapies*, 7(2), 76-80.
- Howell, L. L., Hoffman, J. M., Votaw, J. R., Landrum, A. M., & Jordan, J. F. (2001). An apparatus and behavioral training protocol to conduct positron emission tomography (PET) neuroimaging in conscious rhesus monkeys. *Journal of neuroscience methods*, 106(2), 161-169.
- Hoyer-Tomiczek, U. T. E., & Sauseng, G. (2009). Spürhunde erschnüffeln Quarantäneschädlinge ALB und CLB. *Forstschutz Aktuell*, 48, 3.
- Huard, J. M., Youngentob, S. L., Goldstein, B. J., Luskin, M. B., & Schwob, J. E. (1998). Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *Journal of Comparative Neurology*, 400(4), 469-486.
- Hunter, D. (2002). Common scents: Establishing a presumption of reliability for detector dog teams used in airports in light of the current terrorist threat. *U. Dayton L. Rev.*, 28, 89.
- Hütt, A. (1996). Nachweis boviner Mastitiserreger mit industriell gefertigten Selektivmedien und klassischen Methoden mit einem Beitrag zur Empfindlichkeitsprüfung, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Issel-Tarver, L., & Rine, J. (1996). Organization and expression of canine olfactory receptor genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10897-10902.
- Jeziarski, T., Adamkiewicz, E., Walczak, M., Sobczyńska, M., Górecka-Bruzda, A., Ensminger, J., & Papet, E. (2014). Efficacy of drug detection by fully-trained police dogs varies by breed, training level, type of drug and search environment. *Forensic Science International*, 237, 112-118.
- Jia, W., Li, G., Zhao, Z., Shi, Z., Yang, X., & Wei, J. (2010). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital environment an epidemiological investigation. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 20(6), 818-820.

- Johnen, D. (2017). *How to train dogs to detect cows in heat by smell: Lessons learned by training scent detection dogs* (Doctoral dissertation, Freie Universität Berlin).
- Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2013). Canine scent detection—Fact or fiction? *Applied Animal Behaviour Science*, *148*(3-4), 201-208.
- Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2015). How to train a dog to detect cows in heat—training and success. *Applied animal behaviour science*, *171*, 39-46.
- Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2017). An approach to identify bias in scent detection dog testing. *Applied Animal Behaviour Science*, *189*, 1-12.
- Johnston, J. M. (1999). Canine detection capabilities: Operational implications of recent R & D findings. *Institute for Biological Detection Systems, Auburn University*, *1*(7), 1-7.
- Kauhanen, E., Harri, M., Nevalainen, A., & Nevalainen, T. (2002). Validity of detection of microbial growth in buildings by trained dogs. *Environment international*, *28*(3), 153-157.
- Kaupp, U. B. (2010). Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(3), 188-200.
- Keeling, L. J., Jonare, L., & Lanneborn, L. (2009). Investigating horse–human interactions: The effect of a nervous human. *The Veterinary Journal*, *181*(1), 70-71.
- Kelleher, R. T. (1966). Chaining and conditioned reinforcement. *Operant behavior: Areas of research and application*, 160-212.
- Kerley, L. L. (2010). Using dogs for tiger conservation and research. *Integrative zoology*, *5*(4), 390-396.
- Koivusalo, M., Vermeiren, C., Yuen, J., Reeve, C., Gadbois, S., & Katz, K. (2017). Canine scent detection as a tool to distinguish meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, *96*(1), 93-95.
- Komar, D. (1999). The use of cadaver dogs in locating scattered, scavenged human remains: preliminary field test results. *Journal of Forensic Science*, *44*(2), 405-408.
- Koskinen, M. T., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, H. W., ... & Kelton, D. (2009). Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, *92*(3), 952-959.
- Koskinen, M. T., Wellenberg, G. J., Sampimon, O. C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L., ... & Pyörälä, S. (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science*, *93*(12), 5707-5715.
- Kranz, W., Kitts, K., Strange, N., Cummins, J., Lotspeich, E., & Goodpaster, J. (2014). On the smell of Composition C-4. *Forensic science international*, *236*, 157-163.
- Krebs, J. R., & Davies, N. B. (Eds.). (2009). *Behavioural ecology: an evolutionary approach*. John Wiley & Sons.
- Krestel, D., Passe, D., Smith, J. C., & Jonsson, L. (1984). Behavioral determination of olfactory thresholds to amyl acetate in dogs. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *8*(2), 169-174.

- Krömker, V., & Volling, O. (2007). Therapeutisches Eutergesundheitsmanagement in Milchviehbetrieben des ökologischen Landbaus.
- Kusunose, R., & Yamanobe, A. (2002). The effect of training schedule on learned tasks in yearling horses. *Applied Animal Behaviour Science*, 78(2-4), 225-233.
- Kuzma, J., Nemecek-Marshall, M., Pollock, W. H., & Fall, R. (1995). Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. *Current microbiology*, 30(2), 97-103.
- Lam, T. J. G. M., Riekerink, R. O., Sampimon, O. C., & Smith, H. (2009). Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. *Irish veterinary journal*, 62(4), S34.
- Lancet, D. (1986). Vertebrate olfactory reception. *Annual review of neuroscience*, 9(1), 329-355.
- Lasseter, A. E., Jacobi, K. P., Farley, R., & Hensel, L. (2003). Cadaver dog and handler team capabilities in the recovery of buried human remains in the Southeastern United States. *Journal of forensic sciences*, 48(3), 617-621.
- Lawson, M. J., Craven, B. A., Paterson, E. G., & Settles, G. S. (2012). A computational study of odorant transport and deposition in the canine nasal cavity: implications for olfaction. *Chemical senses*, 37(6), 553-566.
- Lesniak, A., Walczak, M., Jeziarski, T., Sacharczuk, M., Gawkowski, M., & Jaszczak, K. (2008). Canine olfactory receptor gene polymorphism and its relation to odor detection performance by sniffer dogs. *Journal of heredity*, 99(5), 518-527.
- Lin, H. M., Chi, W. L., Lin, C. C., Tseng, Y. C., Chen, W. T., Kung, Y. L., ... & Chen, Y. Y. (2011). Fire ant-detecting canines: a complementary method in detecting red imported fire ants. *Journal of economic entomology*, 104(1), 225-231.
- Lit, L., Schweitzer, J. B., & Oberbauer, A. M. (2011). Handler beliefs affect scent detection dog outcomes. *Animal cognition*, 14(3), 387-394.
- Lledo, P. M., Gheusi, G., & Vincent, J. D. (2005). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiological reviews*, 85(1), 281-317.
- Lorenzo, N., Wan, T., Harper, R. J., Hsu, Y. L., Chow, M., Rose, S., & Furton, K. G. (2003). Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var. familiaris* active odor signature chemicals from drugs, explosives, and humans. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 376(8), 1212-1224.
- Macias, M. S., Harper, R. J., & Furton, K. G. (2008). A comparison of real versus simulated contraband VOCs for reliable detector dog training utilizing SPME-GC-MS. *American laboratory*, 40(1), 16-19.
- Maejima, M., Inoue-Murayama, M., Tonosaki, K., Matsuura, N., Kato, S., Saito, Y., ... & Ito, S. I. (2007). Traits and genotypes may predict the successful training of drug detection dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 107(3-4), 287-298.
- Makovec, J. A., & Ruegg, P. L. (2003). Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of dairy science*, 86(11), 3466-3472.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96(5), 713-723.

- McCulloch, M., Jezierski, T., Broffman, M., Hubbard, A., Turner, K., & Janecki, T. (2006). Diagnostic accuracy of canine scent detection in early-and late-stage lung and breast cancers. *Integrative cancer therapies*, 5(1), 30-39.
- Meyer, I., & Ladewig, J. (2008). The relationship between number of training sessions per week and learning in dogs. *Applied animal behaviour science*, 111(3-4), 311-320.
- Miklósi, A. (2009). Evolutionary approach to communication between humans and dogs. *Veterinary research communications*, 33(1), 53-59.
- Mombaerts, P. (1999). Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annual review of neuroscience*, 22(1), 487-509.
- Mori, K., & Yoshihara, Y. (1995). Molecular recognition and olfactory processing in the mammalian olfactory system. *Progress in neurobiology*, 45(6), 585-619.
- Morris, E. K. (2003). Behavior analysis and a modern psychology. In *Behavior theory and philosophy* (pp. 275-298). Springer, Boston, MA.
- Murrey, N.A. (2007). *The effects of combining positive and negative reinforcement during training* (Doctoral dissertation, University of North Texas).
- Myers, R. E. (2006). Detector dogs and probable cause. *Geo. Mason L. Rev.*, 14, 1.
- Negus, V., Straatsma, C.R. and R. (1960). The comparative anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 25(4):379.
- Nevin, J. A. (1988). Behavioral momentum and the partial reinforcement effect. *Psychological Bulletin*, 103(1), 44.
- Newcombe, R. G. (1998). Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statistics in medicine*, 17(8), 857-872.
- Nickel, R., Schummer, A., & Seiferle, E. (1992). Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band IV, Nervensystem, Gehirnnerven; Sinnesorgane, Gehör-und Gleichgewichtsorgan. *Stuttgart: Parey*.
- Nussear, K. E., Esque, T. C., Heaton, J. S., Cablk, M. E., Drake, K. K., Valentin, C., ... & Medica, P. A. (2008). *Are wildlife detector dogs or people better at finding desert tortoises (Gopherus agassizii)?*. DESERT RESEARCH INST RENO NV.
- O'Neill, C. T., & Bellamy, G. T. (1978). Evaluation of a procedure for teaching saw chain assembly to a severely retarded woman. *Mental Retardation*.
- Oldenburg Jr, C., Schoon, A., & Heitkönig, I. M. (2016). Wildlife detection dog training: a case study on achieving generalization between target odor variations while retaining specificity. *Journal of Veterinary Behavior*, 13, 34-38.
- Oxley, J. C., & Waggoner, L. P. (2009). Detection of explosives by dogs. In *Aspects of explosives detection* (pp. 27-40). Elsevier.
- Pavlou, A. K., & Turner, A. P. F. (2000). Sniffing out the truth: clinical diagnosis using the electronic nose. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 38(2), 99-112.
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Translated and edited by Anrep, GV (Oxford University Press, London, 1927).

- Pfaller-Sadovsky, N., Medina, L. G., & Hurtado-Parrado, C. (2017). It is mine! Using clicker training as a treatment of object guarding in 4 companion dogs (*Canis lupus familiaris*). *Journal of Veterinary Behavior*, 22, 57-65.
- Pfiester, M., Koehler, P. G., & Pereira, R. M. (2008). Ability of bed bug-detecting canines to locate live bed bugs and viable bed bug eggs. *Journal of economic entomology*, 101(4), 1389-1396.
- Pickel, D., Manucy, G. P., Walker, D. B., Hall, S. B., & Walker, J. C. (2004). Evidence for canine olfactory detection of melanoma. *Applied Animal Behaviour Science*, 89(1-2), 107-116.
- Pitkälä, A., Gindonis, V., Wallin, H., & Honkanen-Buzalski, T. (2005). Interlaboratory proficiency testing as a tool for improving performance in laboratories diagnosing bovine mastitis. *Journal of dairy science*, 88(2), 553-559.
- Polgár, Z., Kinnunen, M., Újváry, D., Miklósi, Á., & Gácsi, M. (2016). A test of canine olfactory capacity: comparing various dog breeds and wolves in a natural detection task. *PLoS one*, 11(5).
- Prada, P. A. Curran, A.M., Furton, K.G. (2011). The Evaluation of Human Hand Odor Volatiles on Various Textiles: A comparison between between contact and non-contact sampling methods. *Journal of Forensic Science* 56(4) 866-888
- Quignon, P., Giraud, M., Rimbault, M., Lavigne, P., Tacher, S., Morin, E., ... & Galibert, F. (2005). The dog and rat olfactory receptor repertoires. *Genome biology*, 6(10), R83.
- Ramirez, K. (1999). Animal training: successful animal management through positive reinforcement. Shedd Aquarium Chicago, IL.
- Reindl, S. A. (2004). Efficacy of scent dogs in detecting black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) at a reintroduction site in South Dakota (pHD, South Dakota State University).
- Richards, K. M., Cotton, S. J., & Sandeman, R. M. (2008). The use of detector dogs in the diagnosis of nematode infections in sheep feces. *Journal of veterinary behavior*, 3(1), 25-31.
- Rolland, R. M., Hamilton, P. K., Kraus, S. D., Davenport, B. A. R. B. A. R. A., Gillett, R. M., & Wasser, S. K. (2007). Faecal sampling using detection dogs to study reproduction and health in North Atlantic right whales (*Euhalaena glacialis*). *Journal of Cetacean Research and Management*, 8(2), 121.
- Rolle, M., Mayr, A., & Bachmann, P. A. (1984). *Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre fur Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler*. Enke.
- Rooney, N. J., & Bradshaw, J. W. (2004). Breed and sex differences in the behavioural attributes of specialist search dogs—a questionnaire survey of trainers and handlers. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(1-2), 123-135.
- Rooney, N. J., Gaines, S. A., Bradshaw, J. W. S., & Penman, S. (2007). Validation of a method for assessing the ability of trainee specialist search dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 103(1-2), 90-104.
- Rouquier, S., Blancher, A., & Giorgi, D. (2000). The olfactory receptor gene repertoire in primates and mouse: evidence for reduction of the functional fraction in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2870-2874.

- Roth, M. (2012). Erstellung und Evaluierung eines Positive Reinforcement Training Programms für Javaneraffen *Macaca fascicularis*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Rubin, L., Oppegard, C., & Hintz, H. F. (1980). The effect of varying the temporal distribution of conditioning trials on equine learning behavior. *Journal of animal science*, 50(6), 1184-1187.
- Ruffman, T., & Morris-Trainor, Z. (2011). Do dogs understand human emotional expressions? *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 1(6), 97-98.
- Salgirli, Y., Schalke, E., Boehm, I., & Hackbarth, H. (2012). Comparison of learning effects and stress between 3 different training methods (electronic training collar, pinch collar and quitting signal) in Belgian Malinois Police Dogs. *Revue De Medecine Veterinaire*, 163, 530-535.
- Sannmann, I., Arlt, S., & Heuwieser, W. (2012). A critical evaluation of diagnostic methods used to identify dairy cows with acute post-partum metritis in the current literature. *Journal of dairy research*, 79(4), 436-444.
- Sannmann, I., Burfeind, O., Suthar, V., Bos, A., Bruins, M., & Heuwieser, W. (2013). Evaluation of odor from vaginal discharge of cows in the first 10 days after calving by olfactory cognition and an electronic device. *Journal of dairy science*, 96(9), 5773-5779.
- Schallschmidt, K., Becker, R., Jung, C., Rolff, J., Fichtner, I., & Nehls, I. (2015). Investigation of cell culture volatiles using solid phase micro extraction: Options and pitfalls exemplified with adenocarcinoma cell lines. *Journal of Chromatography B*, 1006, 158-166.
- Schoon, A., Fjellanger, R., Kjeldsen, M., & Goss, K. U. (2014). Using dogs to detect hidden corrosion. *Applied Animal Behaviour Science*, 153, 43-52.
- Schoon, A., Haak, R. (2002). K9 suspect discrimination: Training and practicing scent identification line-ups. Dog Training Press.
- Schoon, G. A. A. (1996). Scent identification lineups by dogs (*Canis familiaris*): experimental design and forensic application. *Applied Animal Behaviour Science*, 49(3), 257-267.
- Schulz, S., & Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural product reports*, 24(4), 814-842.
- Sears, P. M., & McCarthy, K. K. (2003). Management and treatment of staphylococcal mastitis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 19(1), 171-85.
- Settles, G. S., Kester, D. A., & Dodson-Dreibelbis, L. J. (2003). The external aerodynamics of canine olfaction. In *Sensors and sensing in biology and engineering* (pp. 323-335). Springer, Vienna.
- Shelby, R. A., Schrader, K. K., Tucker, A., Klesius, P. H., & Myers, L. J. (2004). Detection of catfish off-flavour compounds by trained dogs. *Aquaculture Research*, 35(9), 888-892.
- Skinner, B. F. (1938). *The behavior of organisms: an experimental analysis*. Appleton-Century. Oxford, England.
- Skinner, B. F. (1965). *Science and human behavior*. No. 92904. Simon and Schuster.

- Skinner, B. F. (1951). How to teach animals. *Scientific American*, 185(6), 26-29.
- Skramlik, E. V. (1924). Die physiologische Charakteristik von riechenden Stoffen. *The Science of Nature*, 12(40), 813-824.
- Smith, D. A., Ralls, K., Hurt, A., Adams, B., Parker, M., Davenport, B., ... & Maldonado, J. E. (2003, November). Detection and accuracy rates of dogs trained to find scats of San Joaquin kit foxes (*Vulpes macrotis mutica*). In *Animal Conservation Forum* (Vol. 6, No. 4, pp. 339-346). Cambridge University Press.
- Soproni, K., Miklósi, Á., Topál, J., & Csányi, V. (2002). Dogs'(Canis familiaris) responsiveness to human pointing gestures. *Journal of comparative psychology*, 116(1), 27.
- Spitzer, H., Desimone, R., & Moran, J. (1988). Increased attention enhances both behavioral and neuronal performance. *Science*, 240(4850), 338-340.
- Stafford, K. (2012). Canine welfare: we know everything, don't we?. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 192(3), 257.
- Suma, P., La Pergola, A., Longo, S., & Soroker, V. (2014). The use of sniffing dogs for the detection of *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica*, 42(2), 269-274.
- Szetei, V., Miklósi, Á., Topál, J., & Csányi, V. (2003). When dogs seem to lose their nose: an investigation on the use of visual and olfactory cues in communicative context between dog and owner. *Applied Animal Behaviour Science*, 83(2), 141-152.
- Tacher, S., Quignon, P., Rimbault, M., Dreano, S., Andre, C., & Galibert, F. (2005). Olfactory receptor sequence polymorphism within and between breeds of dogs. *Journal of Heredity*, 96(7), 812-816.
- Takiguchi, N., Okuhara, K., Kuroda, A., Kato, J., & Ohtake, H. (2008). Performance of mice in discrimination of liquor odors: behavioral evidence for olfactory attention. *Chemical senses*, 33(3), 283-290.
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., & Pyörälä, S. (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of dairy science*, 92(6), 2610-2617.
- Taverna, G., Tidu, L., Grizzi, F., Torri, V., Mandressi, A., Sardella, P., ... & Hurle, R. (2015). Olfactory system of highly trained dogs detects prostate cancer in urine samples. *The Journal of urology*, 193(4), 1382-1387.
- Terrace, H. S. (1963). Discrimination learning with and without "errors" 1. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 6(1), 1-27.
- Theby, V. and M. Hares. (2013). Das große Schnüffelbuch–Nasenspiele für Hunde; Kynos.
- Tomšič, U., & Muševič, I. (2013). Detection of explosives: Dogs vs. CMOS capacitive sensors.
- Tonosaki, K. E. I. I. C. H. I., & Tucker, D. (1985). Responsiveness of the olfactory receptor cells in dog to some odors. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, 81(1), 7-13.

- Turner, A. P., & Magan, N. (2004). Electronic noses and disease diagnostics. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 161-166.
- USDA. (2003). National Detector Dog Manual
- Vakkamäki, J., Taponen, S., Heikkilä, A. M., & Pyörälä, S. (2017). Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 33.
- Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & O'Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in biotechnology*, 27(8), 486-493.
- Virányi, Z., Topál, J., Gácsi, M., Miklósi, Á., & Csányi, V. (2004). Dogs respond appropriately to cues of humans' attentional focus. *Behavioural processes*, 66(2), 161-172.
- Walczak, M., Jezierski, T., Górecka-Bruzda, A., Sobczyńska, M., & Ensminger, J. (2012). Impact of individual training parameters and manner of taking breath odor samples on the reliability of canines as cancer screeners. *Journal of veterinary behavior*, 7(5), 283-294.
- Walker, D. B., Walker, J. C., Cavnar, P. J., Taylor, J. L., Pickel, D. H., Hall, S. B., & Suarez, J. C. (2006). Naturalistic quantification of canine olfactory sensitivity. *Applied Animal Behaviour Science*, 97(2-4), 241-254.
- Wang, H. W., Wysocki, C. J., & Gold, G. H. (1993). Induction of olfactory receptor sensitivity in mice. *Science*, 260(5110), 998-1000.
- Wasser, S. K., Davenport, B., Ramage, E. R., Hunt, K. E., Parker, M., Clarke, C., & Stenhouse, G. (2004). Scat detection dogs in wildlife research and management: application to grizzly and black bears in the Yellowhead Ecosystem, Alberta, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 82(3), 475-492.
- Waters, J., O'Connor, S., Park, K. J., & Goulson, D. (2011). Testing a detection dog to locate bumblebee colonies and estimate nest density. *Apidologie*, 42(2), 200-205.
- Weetjens, B. J., Mgode, G. F., Machang'u, R. S., Kazwala, R., Mfinanga, G., Lwilla, F., ... & Kahwa, A. (2009). African pouched rats for the detection of pulmonary tuberculosis in sputum samples. *The International journal of tuberculosis and lung disease*, 13(6), 737-743.
- Welch, J. B. (1990). A detector dog for screwworms (Diptera: Calliphoridae). *Journal of economic entomology*, 83(5), 1932-1934.
- Willis, C. M., Church, S. M., Guest, C. M., Cook, W. A., McCarthy, N., Bransbury, A. J., ... & Church, J. C. (2004). Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. *Bmj*, 329(7468), 712.
- Wilson, D. A. (2003). Rapid, experience-induced enhancement in odorant discrimination by anterior piriform cortex neurons. *Journal of neurophysiology*, 90(1), 65-72.
- Woidtke, L., Dreßler, J., & Babian, C. (2018). Individual human scent as a forensic identifier using mantrailing. *Forensic science international*, 282, 111-121.
- Youngentob, S. L., & Kent, P. F. (1995). Enhancement of odorant-induced mucosal activity patterns in rats trained on an odorant identification task. *Brain research*, 670(1), 82-88.
- Zelano, C., & Sobel, N. (2005). Humans as an animal model for systems-level organization of olfaction. *Neuron*, 48(3), 431-454.

Zimmerman, J., & Ferster, C. B. (1963). INTERMITTENT PUNISHMENT OF SΔ RESPONDING IN MATCHING TO SAMPLE 1. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 6(3), 349-356.

## **9 ANHANG**

### **9.1 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Nasenspiegel des Hundes während des Einatmens (links) und Ausatmens (rechts) (Settles, 2003)

Abbildung 2: Die knöchernen Strukturen der Nasenregion in dreidimensionaler Darstellung (a) die Lage im Hundekopf und b) der Querschnitt vergrößert (Craven et al., 2010)

Abbildung 3: Das Riechepithel (Theby and Hares)

Abbildung 4: Der Luftstrom bei der Ein- (a) und Ausatmung (b) beim Schnüffeln eines Geruches (Settles et al., 2003)

Abbildung 5: Hund D sucht die 10 kreisförmig aufgestellten Probengefäße ab

Abbildung 6: Der Tupfer auf der Agarplatte zum Aufnehmen des Geruchs

Abbildung 7: Der Hund zeigt die richtige Probe mit einem Nasentarget an

Abbildung 8: 15 Durchgänge zu je 7 Proben

Abbildung 9: Die Milch für den Test war stark verändert

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einsatzgebiet für Hunde zur Geruchserkennung

Tabelle 2: Hunde, die an den verschiedenen Experimenten der Studie teilgenommen haben

Tabelle 3: Die Trainingsschritte von Experiment 1

Tabelle 4: Trainingsschritte für Experiment 3

Tabelle 5: Geruchsproben für Experiment 3

Tabelle 6: Anzahl und Zusammensetzung der Geruchsproben in Probengefäßen in den verschiedenen Experimenten

Tabelle 7: Trainingszeit in Minuten für Experiment 1 (Mai 2012 bis Februar 2013)

Tabelle 8: Differenzierung von Probengefäßen (10 Testdurchgänge mit je 10 Probengefäßen) mit Geruchsträgern aus Anzuchtplatten mit *Staphylococcus aureus* von Probengefäßen mit *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* (Experiment 1)

Tabelle 9: Trainingszeit in Minuten für Experiment 2 (Mai bis Juli 2014)

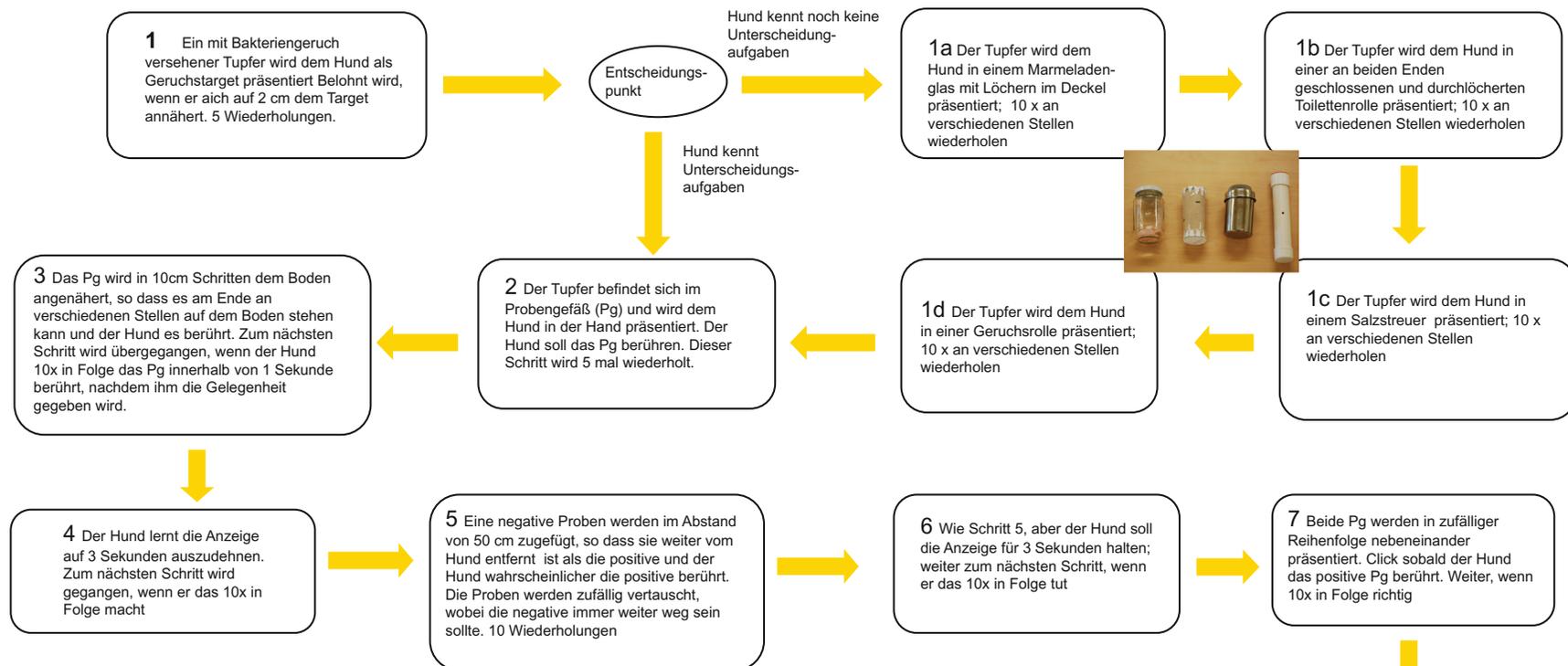
Tabelle 10: Differenzierung von Probengefäßen mit Geruchsträgern mit Milch inokuliert mit *Staphylococcus aureus* in einer Konzentration von  $10^3$  KFU/ml von Probengefäßen mit *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*

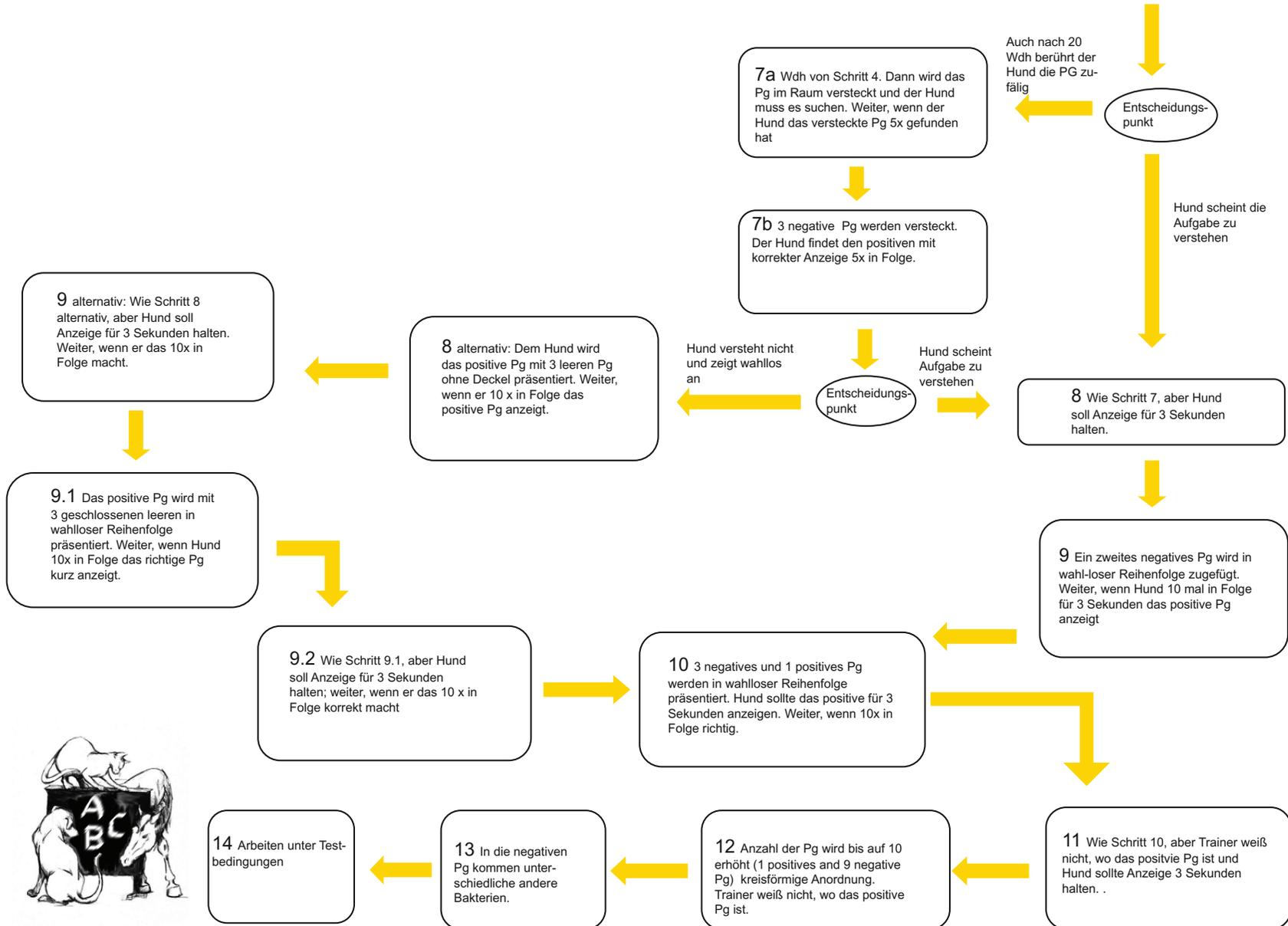
Tabelle 11: Trainingszeit in Minuten für Experiment 3 (Juni bis Dezember 2015)

Tabelle 12: Differenzierung von Probengefäßen (10 Testdurchgänge mit je 10 Probengefäßen) mit Geruchsträgern mit Milch, die mit *Staphylococcus aureus* in einer Konzentration von  $10^8$  KbE/ml inokuliert war, von Probengefäßen mit Geruchsträgern, die mit Enterokokken und *Streptococcus uberis* inokuliert waren (Experiment 3)

Tabelle 13: Differenzierung von Probengefäßen mit Geruchsträgern mit Mastitis Milchproben mit *Staphylococcus aureus* von Probengefäßen mit *Streptococcus dysgalactia*, *Trueperella pyogenes* und *Streptococcus uberis*

## 9.3 Trainingsprotokoll

V.M Theby<sup>1</sup>, C Fischer-Tenhagen<sup>2</sup>, W Heuwieser<sup>2</sup><sup>1</sup> Tierakademie Scheuerhof, Wittlich, Germany; [www.tierakademie.de](http://www.tierakademie.de)<sup>2</sup> Tierklinik für Fortpflanzung, Freie Universität Berlin, [www.tierqyn.de](http://www.tierqyn.de)



## 9.4 Trainingsdokumentation

### Trainingsphase Experiment 2 (Mai – Juli 2014):

#### 3.5.14 Pos. Probe +++, neg. und leere Proben, eine Hilfsprobe aus Agarplatte, 3 Proben

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Ole G	1	0	16	17 mit 3	11
Romeo E	0	2	12	14 mit 3	19
Shakespeare	0	0	18	18 mit 3	12
Lamo B	0	2	11	13 mit 3	11
Damon D	6	4	2	12 mit 3	10

#### 5.5.14 Pos. Probe +++, neg. und leere Proben, eine Hilfsprobe aus Agarplatte, 3 Proben

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Ole G	6	5	12	23 mit 3	29
Lamo B	5	6	4	15 mit 3	26
Damon D	12	4	7	23 mit 3	20

#### 12.5.14 Pos. Probe +++, neg. und leere Proben, eine Hilfsprobe aus Agarplatte

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Ole G	5	6	6	17 mit 3	13
Romeo E	0	9	13	22 mit 3	14
Shakespeare	2	9	5	16 mit 3	14
Lamo B	2	4	5	13 mit 3	19
Damon D	3	8	6	17 mit 3	12

#### 19.5.14 Pos. Probe +++, neg. und leere Proben, eine Hilfsprobe aus Agarplatte

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Ole G	2	6	3	11 mit 5	9
Lamo B	3	4	5	13 mit 5	20
Damon D	3	3	4	10 mit 5	9

24.5.14 Pos. Probe +++, neg. und leere Proben, eine Hilfsprobe aus Agarplatte

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Romeo E	4	4	4	12 mit 10	13
Shakespeare	3	5	5	13 mit 10	13
Oskar	1	6	7	14 mit 10	12
Ole	3	2	3	8 mit 10	11
Lamo B	2	3	2	7 mit 10	15
Damon D	2	4	2	8 mit 10	10

31.5.14 Pos. Probe +++, neg. und leere Proben, eine Hilfsprobe aus Agarplatte

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Oskar	3	3	5	11 mit 10	13
Ole	4	2	3	9 mit 10	9
Romeo	4	2	5	11 mit 10	9
Lamo	4	1	3	8 mit 10	10
Shakespeare	1	4	5	10 mit 10	18
Damon D	0	6	5	11 mit 10	10

05.06.14 Pos. Probe +++, Probe ++, neg. und leere Proben, ohne Hilfsproben

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Ole	4	2	0	6 mit 10	12
Romeo	0	4	3	7 mit 10	4
Oskar	5	5	2	12 mit 10	12
Shakespeare	3	4	2	9 mit 10	10
Lamo	6	5	0	11 mit 10	10
Damon	6	3	0	9 mit 10	9

9.6.14 Pos. Probe +++, ++, neg. und leere Proben, ohne Hilfsprobe aus Agarplatte

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Romeo	6	8	0	14 mit 10	15
Lamo	3	6	0	9 mit 10	9
Shakespeare	5	13	0	18 mit 10	18
Damon	1	10	0	11 mit 10	15
Oskar	9	7	2	18 mit 10	20

## 16.6.14 Pos. Probe ++, +, neg. und leere Proben, mit Hilfsprobe

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Oskar	8	4	0	12 mit 10	10
Romeo	5	5	0	10 mit 10	13
Lamo	7	2	0	9 mit 10	10
Shakespeare	5	1	0	6 mit 10	20
Damon D	5	3	2	10 mit 10	9

## 23.6.14 Pos. Probe +++, +, neg. und leere Proben

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Oskar	7	3	0	10 mit 10	13
Ole	4	4	0	8 mit 10	13
Romeo	6	3	0	9 mit 10	14
Shakespeare	4	1	0	5 mit 10	13
Damon	4	1	0	5 mit 10	8
Lamo	4	1	0	5 mit 10	11

## 28.06.14 Pos. Probe +++, ++ und +, neg. Proben

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Oskar	1	7	1	10 mit 10	15
Ole	2	5	2	10 mit 10	12
Romeo	5	5	0	10 mit 10	13
Lamo	6	4	0	10 mit 10	14
Shakespeare	0	0	5	5 mit 10	13
Damon D	2	6	2	10 mit 10	10

## 01.07.14 Pos. Probe +++, ++ und neg. Proben

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Romeo	6	3	1	10 mit 10	16
Oskar	5	3	2	10 mit 10	13
Shakespeare	6	3	1	10 mit 10	14
Ole	4	2	4	10 mit 10	15
Lamo	10	0	0	10 mit 10	20
Damon	0	0	6	6 mit 10	7

## 03.07.14 Pos. Probe +++ und neg. Proben

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Romeo	6	3	1	10 mit 10	17
Oskar	5	0	5	10 mit 10	15
Shakespeare	0	0	10	10 mit 10	15
Ole	7	2	1	10 mit 10	12
Lamo	3	5	2	10 mit 10	17
Damon D	2	3	5	10 mit 10	10

## 07.07.14 Pos. Probe++, +++ und neg. Proben

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Romeo	6	4	0	10 mit 10	13
Shakespeare	6	4	0	10 mit 10	17
Lamo	8	2	0	10 mit 10	18
Damon	7	3	0	10 mit 10	12
Oskar	9	1	0	10 mit 10	15
Ole	3	4	3	10 mit 10	14

**Trainingsphase Experiment 3:**

7.6. 15 Training mit Tupfer, die 45 Minuten in der Agarplatte waren

Hund	% fehlerfreier Durchgang	% falscher Durchgang	% Mit Hilfestellung	Durchgänge	Zeit in min
Ole G	42	16	42	12 mit 10	14
Romeo E	75	-	25	9 mit 10, 3 mit 3	10
Lovelyn K	-	-	-	-	-
Lamo B	70	10	20	10 mit 10	15
Damon D	36	28	36	10 mit 3, 4 mit 10	8
Oskar A	-	-	100	7 mit 10, 11 mit 3	14

11.6. 15 Training mit Tupfer, die 30 Minuten in der Agarplatte waren

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	90	10	-	10 mit 10	11
Romeo	90	10	-	10 mit 10	12
Lovelyn	-	-	100	15 mit 10	15
Lamo	100	-	-	10 mit 10	13
Damon	100	-	-	10 mit 10	10
Oskar	-	-	-	-	-

16.8. 15 Training mit Tupfer, die 10 Minuten in der Agarplatte waren

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	75	25	-	8 mit 7	12
Romeo	58	42	-	12 mit 7	13
Lovelyn	-	-	-	-	-
Lamo	64	36	-	11 mit 7	14
Damon	67	33	-	12 mit 7	11
Oskar	-	-	-	-	-

16.8. 15 Training mit Bakterien in Milch

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	100	-	-	3 mit 7	3
Romeo	27	36	37	11 mit 7	10
Lovelyn	-	-	-	-	-
Lamo	75	-	25	4 mit 7	5
Damon	100	-	-	4 mit 7	3
Oskar	-	-	-	-	-

19.8.15 Milch abgekocht, pos. 2 ml, neg. 1 ml

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	50	37	13	16 mit 7	25
Romeo	22	39	39	23 mit 7	30
Lovelyn	6	33	61	6 mit 3, 12 mit 7	23
Lamo	80	20	-	10 mit 7	15
Damon	75	25	-	8 mit 7	12
Oskar	-	-	-	-	-

28.8. 15 Tankmilch, pos. 1,5 und 2 ml, neg. 0,75 ml

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	17	27	56	18 mit 7	25
Romeo	100	-	-	10 mit 7	14
Lovelyn	43	-	57	7 mit 7	10
Lamo	39	46	15	13 mit 7	18
Damon	69	31	-	13 mit 7	15
Oskar	-	-	-	-	-

Alles in 2ml Tankmilch aufgelöst und 1 ml Probe

3.10.15

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	70	10	20	10 mit 10	12
Romeo	-	-	-	-	-
Lovelyn	-	-	-	-	-
Lamo	100	-	-	10 mit 10	13
Damon	75	25	-	8 mit 10	15
Oskar	60	-	40	10 mit 10	14

Pos. 1,5 ml oder ½ x 2ml

15.10. 15

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	90	10	-	10 mit 7	14
Romeo	92	8	-	12 mit 7	15
Lovelyn	90	10	-	10 mit 7	14
Lamo	100	-	-	7 mit 7	15
Damon	100	-	-	7 mit 7	11
Oskar	33	-	67	8 mit 5, 4 mit 7	18

Pos. ½ x 2 ml

1.11. 15

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	73	-	27	11 mit 6	13
Romeo	-	-	-	-	-
Lovelyn	-	-	-	-	-
Lamo	73	9	18	11 mit 6	15
Damon	47	37	16	19 mit 6	17
Oskar	54	-	46	13 mit 6	17

Einführung Negativanzeige

5.11.15

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	80	-	20	10 mit 7	11
Romeo	67	16	17	12 mit 7	14
Lovelyn	82	-	18	11 mit 7	14
Lamo	62	7	31	13 mit 7	15
Damon	10	90	-	10 mit 7	11
Oskar	38	62	-	13 mit 7	15

21.11.15

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	71	21	8	12 mit 7	14
Romeo	45	18	37	11 mit 7	14
Lovelyn	89	-	11	9 mit 7	12
Lamo	-	-	-	-	-
Damon	85	15	-	10 mit 7	11
Oskar	40	3	57	10 mit 7	13

Es konnten auch 2 positiv sein

29.11.15

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	70	30	-	10 mit 10	13
Romeo	-	-	-	-	-
Lovelyn	-	-	-	-	-
Lamo	73	27	-	11 mit 10	14
Damon	90	10	-	5 mit 10	6
Oskar	70	30	-	10 mit 10	12

Prüfungssituation, ohne Versuchsleiter im Raum

3.12.15

Hund	% richtig	% falsch	% Mit Hilfe	Durchgänge	Zeit in min
Ole	86	14	-	7	10
Romeo	64	36	-	9	11
Lovelyn	100	-	-	8	10
Lamo	94	6	-	9	12
Damon	100	-	-	6	6
Oskar	64	9	27	11	14

## PUBLIKATIONSVERZEICHNIS:

Fischer-Tenhagen, C., **Theby, V.**, Krömker, V., Heuwieser, W. (2018). Detecting *Staphylococcus aureus* in milk from dairy cows using sniffer dogs. *Journal of Dairy Science*, 101:4317-4324.

## **DANKSAGUNG**

Diese Arbeit entstand an der Tierklinik für Fortpflanzung der Freien Universität Berlin. Daher gilt mein Dank dort Professor Heuwieser für die Überlassung des Themas und für das viele kritische Hinterfragen.

Ich danke Dr. Carola Fischer-Tenhagen für die gute Betreuung, die Motivation und Unterstützung. Ohne diesen guten Austausch wäre die Arbeit sicher nicht entstanden. Es war mit Sicherheit viel Geduld erforderlich, meinen „Buchschreibstil“ in wissenschaftliches Schreiben zu verbessern.

In dieser Hinsicht auch danke an Dr. Bernd Tenhagen für seine Unterstützung und die kritische Durchsicht des Textes. Auch Dr. Dorothea Johnen, meiner Doktorandenkollegin in der ersten Zeit, bin ich sehr dankbar. Letztendlich war es ihre Arbeit an der Tierklinik und ein kollegiales „Rumspinnen“, die den Grundstein für diese Arbeit legten.

Auch allen anderen Doktoranden und Mitarbeitern an der Tierklinik für Fortpflanzung meinen Dank. Ich habe mich, wenn ich dort war, immer wohlfühlt und als einen Teil vom Ganzen. Ganz speziell möchte ich Dr. Peter Venjakob danken, dem Tabellenspezialisten.

Ein herzliches Dankeschön auch an Dr. Babette Klein von der Firma Laboklin und ihr Team, besonders Julia Elze, für die Bereitstellung und Untersuchung der Bakterienproben.

Professor Krömker und seinem Institut möchte ich für die Unterstützung mit der Beschaffung der Milchproben danken.

Für die „Nachhilfestunden“ in Sachen Statistik bedanke ich mich bei Dr. Michaela Artwohl.

Ein ganz besonderer Dank gilt aber auch meinen Trainerinnen und ihren Hunden, die mich so gut mit unermüdlichem Training unterstützt haben. Danke also an Ingrid und Oskar, Jacqueline und Romeo, Shakespeare und Lovelyn, Anke und Puma, Nina und Jack, Ilona und Tommy, Nicole und Aaron, Steffi und Ole und natürlich ganz besonders meiner Kollegin Michaela und Lamo.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Bob Bailey, meinen Freund und Mentor, von dem ich so viel über Training lernen durfte.

Danke an alle, die bei der Durchsicht des Manuskriptes geholfen haben.

Meinen Eltern und meiner Schwester, durch die ich maßgeblich geworden bin, was ich bin, gebührt ein großes Dankeschön.

Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie Karl, Chiara, Delia und Matz bedanken, die es bestimmt nicht immer leicht haben mit einem Familienmitglied mit so vielen Ideen.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation zum Thema: „Training von Hunden für Suchaufgaben am Beispiel von *Staphylococcus aureus* als Mastitiserreger der Milchkuh“ selbstständig und eigenhändig angefertigt habe. Die benutzten Hilfsmittel und die verwendete Literatur habe ich angegeben.

Berlin, den 14.7.2020

Viviane Theby











9 783967 290608

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-060-8