

Aus dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde
und dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Klicker-Training als angewandte Refinement-Maßnahme beim Huhn

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

vorgelegt von
Gordon Mähli
Tierarzt aus Bad Belzig

Berlin 2023
Journal-Nr.: 4399

Aus dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde
und dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Klicker-Training als angewandte Refinement-Maßnahme beim Huhn

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

vorgelegt von
Gordon Mählis
Tierarzt
aus Bad Belzig

Berlin 2023

Journal-Nr.: 4399

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke
Zweiter Gutachter: PD Dr. Roswitha Merle
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Bäumer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

hen, broilers, animal welfare, training of animals, animals behaviour,
animal husbandry, immobilization, stress, corticosterone, metabolic profiling

Tag der Promotion: 05.05.2023

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: 978-3-96729-212-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2023

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 2023 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Den Freunden zur Freude,
Oma zum Dank.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
2. Literatur.....	3
2.1 Tierschutz in der Versuchstierkunde	3
2.2 Die Physiologie des Stresses	4
2.3 Handling und Immobilisation als Stressor beim Huhn	5
2.4 Stressoren im Bereich der Tierhaltung	5
2.5 Stress und Hormone	6
2.5.1 Hormonelle Wege der Stressverarbeitung	6
2.5.2 Katecholamine.....	7
2.5.3 Corticosteron	8
2.5.4 Die Messung der Corticosteron-Konzentration	8
2.5.4.1 Corticosteron im Blut.....	8
2.5.4.2 Corticosteron in Federn.....	9
2.5.4.3 Corticosteron im Speichel	11
2.6 Stress und Blutzellen	12
2.6.1 Stressleukogramm.....	12
2.6.2 Hämatokrit.....	13
2.7 Stress und Kotabsatz	14
2.8 Stress und Verhalten	15
2.8.1 Open field Test / New Area Test.....	15
2.8.2 New Object Test / Novel Object Test / Novel Object Recognition Test	16
2.8.3 Ethogramm.....	16
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Tiere	19
3.2 Material.....	19
3.2.1 Tierunterbringung	19
3.2.2 Klicker-Training	20
3.2.3 Probenentnahme	21
3.2.4 Probenaufbereitung	21
3.2.5 Corticosteron-Extraktion	23
3.2.6 Probenanalyse	25
3.3 Methoden.....	26

3.3.1 Ethik-Statement	26
3.3.2 Tierunterbringung	27
3.3.3 Klicker-Training	27
3.3.3.1 Klicker-Belohnungs-Kombination	27
3.3.3.2 Gruppentraining	27
3.3.3.3 Einzeltiertraining	28
3.4 Probenentnahme	29
3.4.1 Personenkonstellation während der jeweiligen Probenentnahme	29
3.4.2 Probenart- und Entnahmezeitpunkt	29
3.4.2.1 Erste Probenentnahme	29
3.4.2.2 Zweite Probenentnahme	29
3.4.2.3 Dritte Probenentnahme	30
3.4.2.4 Vierte Probenentnahme	30
3.4.3 Blutprobenentnahme	31
3.4.4 Blutprobenaufbereitung	31
3.4.4.1 Aufbereitung für Hämatokrit-Bestimmung.....	31
3.4.4.2 Aufbereitung für Differentialblutbild	31
3.4.4.3 Aufbereitung für Corticosteron-ELISA	32
3.4.5 Speichelprobenentnahme und –aufbereitung	32
3.4.6 Federprobenentnahme und –aufbereitung.....	32
3.4.7 Probenanalyse	33
3.4.7.1 Hämatokrit	33
3.4.7.2 Gesamtleukozytenzahl, Differentialblutbilder und H:L-Ratio	33
3.4.7.3 Corticosteron-ELISA	34
3.4.7.3.1 Spezifität bzw. Kreuzreaktivität des eingesetzten ELISA-Kits	34
3.4.7.3.2 Extraktion Plasmacorticosteron	34
3.4.7.3.3 Verdünnung Speichel-Probe.....	34
3.4.7.3.4 Extraktion Federcorticosteron	35
3.4.7.3.5 Durchführung Corticosteron-ELISA.....	36
3.4.7.3.6 Verifizierung des Corticosteron-ELISAs.....	37
3.4.7.3.6.1 Verifizierung	37
3.4.7.3.6.2 INTRA-Assay-Präzision	38
3.4.7.3.6.3 INTER-Assay-Präzision	38
3.4.7.3.7 Vorversuch zur Messung des Feder-Corticosterons	38
3.5 Verhaltenstests	38
3.5.1 New Area Test 1.....	38
3.5.2 New Area Test 2.....	39
3.5.3 Kotbeurteilung	39

3.5.4 New Object Test.....	40
3.6 Statistische Auswertung.....	40
3.7 Erfassung der Ei-Gewichte	41
4. Ergebnisse.....	43
4.1 Klicker-Training.....	43
4.1.1 Gruppentraining.....	43
4.1.2 Einzeltiertraining.....	43
4.1.3 Tier-Charaktere	46
4.2 Hämatokrit und H:L-Ratio.....	47
4.3 Corticosteron-ELISA	50
4.3.1 Verifizierung Corticosteron-ELISA.....	50
4.3.2 Vorversuch: Feder-Corticosteron bei Hühnern aus Auslaufhaltung.....	51
4.3.3 Corticosteron-Konzentrationen in Plasma-, Feder- und Speichelproben.....	51
4.4 New Area Test 1+2.....	55
4.5 Kotabsatz im New Area Test 1 und 2.....	58
4.6 New Object Test	61
4.6.1 Anzahl der Tiere am Trog.....	61
4.6.2 Entfernung der Tiere zum New Object.....	62
4.7 Ei-Gewichte	63
5. Diskussion.....	65
5.1 Gewählte Parameter zur Beurteilung der Wirkung eines Klicker-Trainings.....	65
5.2 H:L-Ratio.....	65
5.3 Hämatokrit	67
5.4 Corticosteron-ELISA	68
5.4.1 Verifizierung	68
5.4.1.1 INTRA-Assay-Präzision	68
5.4.1.2 INTER-Assay-Präzision	68
5.4.2 Feder-Corticosteron.....	69
5.4.2.1 Feder-Corticosteron als Parameter zur Stressbeurteilung.....	69
5.4.2.2 Feder-Corticosteron und H:L-Ratio als Parameter zur Praktikabilitäts- Beurteilung des Klicker-Trainings.....	70
5.4.3 Plasma- und Speichel-Corticosteron.....	71
5.4.3.1 Unterschied zum Feder-Corticosteron.....	71
5.4.3.2 Speichelprobe 2+3.....	71
5.4.3.3 Plasmaprobe 2+3.....	71
5.4.3.4 Gruppenunterschiede in Probe 1.....	72
5.4.4 Einflussfaktoren auf den Corticosteronspiegel und Maßnahmen zur Eindämmung im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit.....	74

5.4.4.1 Stallparameter und Corticosteron.....	74
5.4.4.2 Fütterung und Corticosteron.....	76
5.4.4.3 Legeperiode, Mauser, Pathogene und Corticosteron	76
5.4.5 Eignung von Feder-, Speichel- und Plasma-Corticosteron zur Beurteilung von Stresssituationen.....	77
5.5 Verhaltenstests	78
5.5.1 Open Field Test / New Area Test 1 + 2.....	78
5.5.1.1 Fortbewegung.....	79
5.5.1.2 (Futter-) Picken	80
5.5.1.2.1 Ethologische Betrachtung.....	80
5.5.1.2.2 Biochemisch-ethologische Betrachtung	81
5.5.1.3 Schütteln als „Verhalten der Neuordnung“	82
5.5.1.4 Kotabsatz.....	83
5.5.1.5 Zusammenfassung New Area Test	83
5.5.2 New Object Test.....	83
5.6 Zusammenfassende Betrachtung der Untersuchungsergebnisse	84
5.7 Beleuchtung anderer Parameter zur Beurteilung des Klicker-Trainings.....	85
5.7.1 Corticosteron im Kot.....	86
5.7.2 Corticosteron im Ei	87
5.7.3 Corticosteron in Tränenflüssigkeit.....	88
5.7.4 Corticosteron im Gewebe	88
5.7.5 Metabolische Stressparameter	88
5.7.5.1 Glucose.....	89
5.7.5.2 Harnsäure und Gesamtprotein	90
5.7.5.3 Freie Fettsäuren, andere Blutfette.....	90
5.7.6 Katecholamine und klinische Stressparameter	91
5.8 Kannibalismus und die Rolle des „aktiven kognitiven Enrichments“	92
5.9 Einfluss verschiedener Tiercharaktere auf das Klicker-Training und Steigerung des Lernerfolges durch Beobachtungslernen.....	93
5.9.1 Tiercharaktere	93
5.9.2 Steigerung des Lernerfolges durch Beobachtungslernen.....	94
6. Zusammenfassung.....	97
7. Summary.....	101
8. Literaturverzeichnis	105
Vortrags- und Publikationsverzeichnis.....	144
Danksagung.....	145
Finanzierungsquellen.....	147
Selbstständigkeitserklärung.....	148

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Material zur Tierunterbringung.....	19
Tabelle 2: Material für das Klicker-Training	20
Tabelle 3: Material zur Probenentnahme.....	21
Tabelle 4: Material zur Probenaufbereitung	21
Tabelle 5: Material zur Corticosteron-Extraktion.....	23
Tabelle 6: Material zur Probenanalyse.....	25
Tabelle 7: Personenkonstellation während der jeweiligen Probenentnahme	30
Tabelle 8: Vorbereitung der Standardreihe nach der Vorgabe NEOGENS.....	36
Tabelle 9: Pipettierschema.....	36
Tabelle 10: Definitionen des beobachteten Verhaltens im New Area Test 1+2	39
Tabelle 11: Kotparameter und die Art ihrer Bewertung	39
Tabelle 12: Tier-Charaktere und deren Einfluss auf das Klicker-Training	46
Tabelle 13: Test auf Normalverteilung für die hämatologischen Parameter	48
Tabelle 14: Gruppenvergleich anhand der H:L-Ratio	48
Tabelle 15: Gruppenvergleich anhand des Hämatokrits	49
Tabelle 16: Verifizierung, INTRA-Assay, Corticosteron-Konzentration in ng/ml.....	50
Tabelle 17: Verifizierung, INTER-Assays, Corticosteron-Konzentration in ng/ml.....	51
Tabelle 18: Feder-Corticosteronkonzentrationen aus Poolproben im Vorversuch.....	51
Tabelle 19: Test der Plasma-, Feder- und Speichel-Corticosteronwerte auf Normalverteilung	52
Tabelle 20: Gruppenvergleich anhand der Corticosteron-Konzentration.....	53
Tabelle 21: Test auf Normalverteilung des beobachteten Verhaltens in den New Area Tests	56
Tabelle 22: Gruppenvergleiche anhand des beobachteten Verhaltens in den New Area Tests	56
Tabelle 23: Test der Kot-Parameter auf Normalverteilung	59
Tabelle 24: Gruppenvergleich anhand der Kot-Parameter	59
Tabelle 25: Gruppenvergleich anhand der Anzahl der Tiere am Trog im New Object Test ...	61
Tabelle 26: Test auf Normalverteilung der Werte zur Entfernung vom neuen Objekt	62
Tabelle 27: Gruppenvergleich anhand der Entfernung zum neuen Objekt im New Object Test	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einzeltraining auf der Hand; keine Anzeichen von Anspannung oder Abwehr .	44
Abbildung 2: Einzeltraining auf der Hand; Positionierung für Blutprobenentnahme	44
Abbildung 3: Huhn auf der Waage.....	45
Abbildung 4: Handling im Rahmen der Allgemeinuntersuchung.....	45
Abbildung 5: Blutprobenentnahme.....	46
Abbildung 6: Gruppenvergleich anhand der H:L-Ratio-Differenz zwischen Probe 1 und 3....	49
Abbildung 7: Gruppenvergleich anhand des Hämatokrits.....	50
Abbildung 8: Gruppenvergleich anhand des Plasma-Corticosterons.....	54
Abbildung 9: Gruppenvergleich anhand des Feder-Corticosterons.....	54
Abbildung 10: Gruppenvergleich anhand des Speichel-Corticosterons.....	55
Abbildung 11: Gruppenvergleich anhand der Fortbewegung in Tierlängen.....	57
Abbildung 12: Gruppenvergleich anhand der Pick-Aktionen	57
Abbildung 13: Gruppenvergleich anhand des axialen Körperschüttelns	58
Abbildung 14: Gruppenvergleich anhand der Anzahl der abgesetzten Kothaufen	60
Abbildung 15: Gruppenvergleich anhand der Kot-Konsistenz.....	60
Abbildung 16: Gruppenvergleich anhand der Anzahl der Tiere am Trog im New Object Test	61
Abbildung 17: Gruppenvergleich anhand der Entfernung zum neuen Objekt im New Object Test.....	63

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADT	Avoidance Distance Test
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BMJ	Bundesministerium für Justiz
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CBP	Corticosteron bindendes Protein
cm	Zentimeter
CORT	Corticosteron
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
EIA	Enzymatisches Immunadsorptionsverfahren
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENS	enterisches Nervensystem
et al.	et alii (= und andere)
g	Gramm
h	Stunde(n)
H:L-Ratio	Heterophilen:Lymphozyten-Verhältnis
HPLC	high performance liquid chromatography
Hz	Hertz
IgA	Immunglobulin A
kg	Kilogramm
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
N	Normalität (veraltet für Äquivalentkonzentration)
ng	Nanogramm
N:L-Ratio	Neutrophilen:Lymphozyten-Verhältnis
PCV	packed cell volume / gepacktes Zellvolumen

pg	Picogramm
PTFE	Polytetrafluorethylen
RIA	Radioimmunoassay
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchNutzV	Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
u.a.	unter anderem
VC	Variationskoeffizient
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Das Handling und die Immobilisation/Fixation von Hühnervögeln können bei deren Verwendung in wissenschaftlichen Untersuchungen auf Grund ihrer Beutetier-Natur als für diese Tiere potentiell belastende Situationen eingestuft werden. Die Möglichkeit, dieses Stressempfinden durch das bereits vielfach bei anderen (Versuchs-)Tierarten erfolgreich angewandte Klicker-Training zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit erprobt und bewertet.

Hierfür wurden, aufgeteilt auf drei Versuchsdurchläufe, insgesamt 21 konventionell aufgezogene Legehennen der Hybrid-Linie Lohmann Selected Leghorn über einen Zeitraum von jeweils 23 Tagen mittels positivem Reinforcement dahingehend trainiert, selbstständig auf einen bereitgestellten Behandlungstisch zu fliegen, um von dort aus durch ihren Trainer ohne Gegenwehr in die entsprechenden Positionen für die Entnahme von Blut- und Speichelproben gebracht zu werden. Anschließend daran sollten sich die Tiere in einer 10-minütigen Allgemeinuntersuchung ohne Fluchtversuche handeln lassen und im Anschluss daran erneut beprobt werden. Mögliche Effekte des Klicker-Trainings auf das Stress- und Angstempfinden sowie auf das Selbstbewusstsein und die Resilienz der Tiere wurden daraufhin anhand unterschiedlicher Parameter bewertet und mit den Ergebnissen einer untrainierten Kontrollgruppe verglichen.

Der direkte Einfluss des Klicker-Trainings auf das Empfinden der Hühner in der akuten Stresssituation des Handlings wurde anhand der Spiegel des bei Vögeln vorherrschenden Stresshormons Corticosteron in den vor und nach der Allgemeinuntersuchung gewonnenen Blut- und Speichelproben beurteilt. Eine Einschätzung des mittel- bis längerfristigen Stressempfindens über den Gesamtzeitraum der 23-tägigen Trainingsphase erfolgte anhand von Veränderungen im Verhältnis zwischen Heterophilen Granulozyten und Lymphozyten (= H:L-Ratio). Dies erlaubte ein Urteil darüber, ob die während der Trainingsphase tägliche Konfrontation der Trainingsgruppentiere mit den Stressoren Handling und Immobilisation/Fixation in diesen Tieren eventuell höhere Stresspegel bewirkt hat als in den unangetasteten Tieren der Kontrollgruppe. Eine Einschätzung des vollständigen, fünfwöchigen Zeitraumes eines jeden Versuchsdurchganges (exklusive zweiwöchiger Eingewöhnungszeit; inklusive Zeitraum der Verhaltenstests), wurde durch die Messung des in die Federn des Interscapularbereichs eingelagerten Corticosterons möglich.

In Ergänzung dieser serologischen und hämatologischen Parameter erfolgte im Weiteren eine ethologische Bewertung des Klicker-Trainings hinsichtlich dessen potentiellen Einflusses auf das Selbstbewusstsein bzw. die Resilienz der Tiere sowie auf deren Umgang mit neuartigen

Situationen. Hierzu wurde jedes Einzeltier im Rahmen von zwei New Area Tests sowohl einmal nach einer stressigen Situation, als auch einmal aus der Ruhe heraus außerhalb seines gewohnten Stallumfeldes mit einem zuvor unbekanntem Raum konfrontiert. Abschließend folgte für jede komplette Trainings- und Kontrollgruppe ein New Object Test im gewohnten Stallumfeld.

In Ergänzung zu den in dieser Arbeit praktisch durchgeführten Tests zur Beurteilung des mehrwöchigen Klicker-Trainings wurden im weiteren Verlauf andere, theoretisch zur Beurteilung von Stresssituationen geeignete klinische, serologische und blutchemische Parameter hinsichtlich ihrer generellen Praktikabilität sowie im Hinblick auf die Bewertung eines zuvor durchgeführten Klicker-Trainings beleuchtet.

Diese vielschichtige Herangehensweise zur Beurteilung des Klicker-Trainings als Maßnahme zur Stressreduzierung bei zu Versuchszwecken genutzten Hühnern dient als erste Orientierung hinsichtlich der Eignungseinschätzung dieser Trainingsmethode im generellen, versuchstierkundlichen Umgang mit Vögeln. Hiermit kann dem bisher vor allem durch Erkenntnisse im Umgang mit Säugetieren stetig erweiterten 3-R-Prinzip als Fundament aller für den Schutz von Versuchstieren relevanten Gesetzgebungen ein weiterer Baustein hinzugefügt werden.

2. Literatur

2.1 Tierschutz in der Versuchstierkunde

Ersatz, Reduzierung, Verfeinerung (engl.: *replacement, reduction, refinement*, = 3R). Diesen drei Zielsetzungen für die Optimierung in der Nutzung von Tieren für wissenschaftliche Versuche widmen sich seit Jahren zahlreiche Publikationen (De Angelis et al. 2019; Schlüter 2019; Leidinger et al. 2017; O'Connor 2013; Erkekoglu et al. 2011; Manciooco et al. 2009; Spielmann 2002). Erdacht im Jahre 1959 durch den britischen Zoologen William Russell und seinen Kollegen den Mikrobiologen Rex Burch und veröffentlicht in ihrem Buch „The Principles of Humane Experimental Technique“, ist das 3-R-Prinzip heute in die europäische und deutsche Tierschutzgesetzgebung eingegangen (Richtlinie 2010/63/EU, BMJ: Tierschutzgesetz, BMJ: Tierschutz-Versuchstierverordnung) und somit von großer Bedeutung für die Planung, Genehmigung und Ausgestaltung von Tierversuchen.

Kann ein geplanter Tierversuch nicht durch eine tierfreie Alternativmethode *ersetzt* – *also replaced* - werden und ist die für den Versuch notwendige Tierzahl auf das unerlässliche Maß *reduziert* worden, so gewinnt das *Refinement* an Bedeutung, um in Tierversuchen die Standards in allen Bereichen so weit zu *verfeinern*, dass mögliche Schmerzen, Leiden oder dauerhafte Schäden von den genutzten Tieren abgewendet oder zumindest minimiert werden können. Neben stetigen Optimierungen in der Haltung von Tieren oder Verbesserungen der Methoden in Tierversuchen, werden auch unterschiedliche Methoden des Tiertrainings erprobt, die es ermöglichen sollen, ein hohes Wohlbefinden der Tiere während der Haltung und über den gesamten Versuchszeitraum hinweg zu gewährleisten. Als eine diesbezüglich vielversprechende Methode hat sich in den letzten Jahren besonders das Klicker-Training erwiesen (Leidinger et al. 2017; Gillis et al. 2012; Laule et al., 2003). Diese Art des Trainings ist eine auf der „Operanten Konditionierung“ nach Edward Lee Thorndike und Burrhus Frederic Skinner aus dem Jahre 1913 beruhende Methode, die sich nicht nur in der Ausbildung von Haus- und Begleittieren großer Beliebtheit erfreut (Kogan et al. 2017; Ellis und Greening 2016; Strychalski et al. 2015), sondern auch im Umgang mit landwirtschaftlichen Nutztieren (Puppe et al. 2007) und seit einiger Zeit auch als Medical Training in Zoos und Versuchstierhaltungen eingesetzt wird (Jønholt et al. 2021; Callealta et al. 2020; Leidinger et al. 2017; Armbrecht und Wilkens 2016; Dadone et al. 2016; Gillis et al. 2012; Laule et al. 2003; Weiss und Wilson 2003). Hierbei wird das zu trainierende Tier mittels Klick-Geräusch während der Ausführung eines vom Trainierenden gewünschten Verhaltens mit anschließender Belohnung (meist Futter) darin bestärkt, dieses Verhalten öfter zu zeigen. Das Klick-Geräusch ist dabei ein dem Tier vor dem eigentlichen Training mittels klassischer Konditionierung ankonditionierter Verstärker, der ferner während des eigentlichen Trainings als „Brücke“ zwischen dem gewünschten Verhalten

und der Belohnung als positivem Verstärker dient und letztere mit zunehmender Trainingszeit mehr und mehr ersetzen kann.

Blickt man auf die 2021 in Deutschland veröffentlichten Versuchstierzahlen (Online-Präsenz des Bundesinstitutes für Risikobewertung 2021), so finden sich, neben den meistgenutzten Tieren Maus, Ratte und Fisch, auch verschiedene Vogelspezies – und hierbei vor allem Hühnervögel - in tierexperimentellen Versuchsvorhaben. Während Hühner in früheren Jahren häufig in der Krebsforschung oder für ernährungs- und chemotherapeutische Versuche eingesetzt wurden (Russell und Burch 1959; Rous 1911), sind sie bis heute vor allem Bestandteil mikrobiologischer und immunologischer Studien sowie im Bereich der Impfstoffentwicklung oder der Grundlagenforschung zu Aspekten aus Verhaltens- und Futtermittelkunde (animaltestinfo, Online-Präsenz des Bundesinstitutes für Risikobewertung 2022; Davison 2003). Als „Tierversuch“ definiert das deutsche Tierschutzgesetz im Paragraphen 7 jedoch nicht nur diese rein wissenschaftlichen Untersuchungen, in denen die Antwort auf eine spezifische Frage gesucht wird, sondern auch „Eingriffe oder Behandlungen, [...] zu Aus-, Fort- oder Weiterbildungszwecken“. Somit findet sich diese Art des Tierversuches auch im Rahmen der universitären, veterinärmedizinischen Lehre. Hier erlernen die Studierenden neben dem ordnungsgemäßen Handling der Tiere im Rahmen einer Allgemeinuntersuchung auch die gute veterinärmedizinische Praxis, z.B. im Hinblick auf die Entnahme einer Blutprobe. Sowohl das Einfangen, das Handling, als auch die Probenentnahme an sich, stellen jedoch für das Beutetier Huhn, welches den Säugetieren auf psychischer Ebene und hinsichtlich sozialer Intelligenz häufig keineswegs nachsteht (Marino 2017), einen erheblichen Stressfaktor dar (Bortolotti et al. 2008; Knowles und Broom 1993; Knowles und Broom 1990; Lagadic et al., 1990).

2.2 Die Physiologie des Stresses

Der oftmals im allgemeinen Sprachgebrauch durchweg negativ konnotierte Begriff „Stress“ muss generell aus zwei Blickwinkeln betrachtet werden. Immer unterschieden werden sollten hierbei die Begriffe Eustress und Distress (Selye 1976a). Als Eustress wird die Art von Stressoren bezeichnet, die einen Organismus stimulieren und dadurch seine Leistungsfähigkeit steigern. Als diese gelten im Allgemeinen Situationen, die als angenehm und auf nicht bedrohliche Art fordernd wirken, z.B. in Form eines kontinuierlichen Trainings mit adäquaten Trainingsschritten, Zwischenzielen und Belohnungen. Diese Art von Stress wirkt sich auch über längere Zeiträume positiv auf den jeweiligen Organismus aus und ist gar essentiell für dessen Erhalt bzw. dessen Weiterentwicklung. So gilt Stress gar als eine der maßgeblichen Triebkräfte in der Evolution (Rowiński und Rogell 2017; Chera et al. 2009; Yancey et al. 1982). Als immer wiederkehrende physische und psychische Konfrontation eines

Organismus mit unterschiedlichsten äußeren oder inneren, biotischen oder abiotischen Reizen (= Stressoren) führt Stress seit jeher bei einigen Individuen auch zu einer entsprechenden Toleranz gegenüber diesen. Diese Toleranz kann jenen Einzeltieren ferner als Selektionsvorteil dienen und somit schlussendlich gar zur Entstehung neuer Arten führen. Im Gegensatz zum Eustress erfüllt der sogenannte Dystress die allgemein weit verbreiteten Vorurteile über den Stressbegriff. Denn kann ein Organismus die ihn konfrontierenden Stressoren weder physisch noch psychisch bewältigen, so haben diese über kurz oder lang einen negativen Einfluss auf seine Gesundheit. Beispiele hierfür finden sich in der Haltung von Nutz-, Heim-, Zoo- oder Versuchstieren, welche nicht selten auf Haltungs-, Handlings- oder stoffwechselbedingten Stress mit Verhaltensstörungen oder Krankheiten reagieren (Rietmann et al. 2004; Carlstead und Shepherdson 2000; Tuchscherer und Manteuffel 2000; Beerda et al. 1997; Vestergaard et al. 1997; Bickhardt et al. 1983).

2.3 Handling und Immobilisation als Stressor beim Huhn

Zwar erkannten Ericsson et al. (2014), dass sich die durch Corticosteron vermittelte Stressreaktion des wildlebenden Bankivahuhnes im Laufe seiner Domestikation hin zum Haushuhn abgeschwächt hat, doch zählen dennoch jegliche Formen der Immobilisation zu bedeutenden Stressoren im Umgang mit Hühnervögeln. So beschreiben Dereli Fidan et al. (2018) einen Corticosteronanstieg beim gefesselten Huhn ab einer Zeit von 2 Minuten. Ähnlich äußern sich auch Chloupek et al. (2011), die von einer „Verfälschung“ der gemessenen Corticosteron-Werte sprechen, sollte eine Blutprobe später als 2 Minuten nach dem Einfangen gezogen werden. Scanes et al. (2020) belegen eine schnelle Stressreaktion auch für die gefesselte Pute, messen aber einem Transport der Tiere noch größeres Stressor-Potenzial bei. Knowles und Broom (1993) berichten von höheren Corticosteronwerten bei Hühnern, die vor einer Blutprobenentnahme in Kisten gesperrt wurden, als bei Tieren, die ohne zeitlichen Verzug und direkt aus ihren Käfigen heraus beprobt wurden.

2.4 Stressoren im Bereich der Tierhaltung

Als typische innere Stressoren bei von Menschen gehaltenen Tieren gelten z.B. Entzündungen, Tumore und Krankheiten aber auch eine Trächtigkeit oder die Legeperiode (Götz 2007; Bauer und Fölsch 2005). Äußere Stressoren finden sich dahingegen oftmals im Bereich des jeweiligen Haltungssystems oder auch in der Interaktion mit den betreuenden Personen oder Artgenossen (Scholz et al. 2008; Craig und Adams 1984; Autrum und Von Holst 1968). Zusätzlich zu dieser Differenzierung in innere und äußere, soll auch die Unterscheidung zwischen abiotischen und biotischen Stressoren benannt werden. Sind die biotischen Stressoren - in Ergänzung zu den ihnen sehr ähnlichen, inneren Stressoren - oft in Minderversorgung mit bestimmten Nährstoffen bzw. restriktiver Fütterung (Yan et al. 2021;

Vizcarra et al. 2018; Lieboldt 2015), aber auch in Infektionen oder Intoxikationen (Antonissen et al. 2017) zu finden, so werden abiotische Stressoren im Bereich der Tierhaltung vor allem durch Fehler im Licht-, Temperatur-, Frischluft- oder Lärmmanagement sowie durch fehlerhafte Mineralstoffversorgung beschrieben (del Barrio et al. 2020; Ramiah et al. 2019; Huth und Archer 2015; Sax et al. 2012; Kauke und Savary 2010; McFarelane et al. 1989). Nicht selten bedingen gerade in der Tierhaltung vor allem die abiotischen bzw. äußeren Stressoren die biotischen bzw. inneren Stressoren. Ein typisches Beispiel hierfür wäre, wenn es z.B. durch Fehler in der Haltung von Legehennen (u.a. schlechtes Lichtmanagement = äußerer + abiotischer Faktor) zu Verhaltensstörungen der Tiere (z.B. Kannibalismus = äußerer + biotischer Faktor) und hierdurch wiederum ferner zu verletzten Tieren mit entzündeten Wunden (= innerer + biotischer Faktor) kommt. Zusätzlich zu den bereits genannten, soll hier noch kurz die Unterscheidung nach Bickhardt (1992) erwähnt werden, bei der zwischen emotionalen und somatischen Stressoren differenziert wird. Unter emotionalen Stressoren werden über das Sensorium und somit über das limbische System wirkende Noxen, wie z.B. Angst, zusammengefasst. Denen gegenüber stehen die somatischen, über endogene Rezeptoren wirkenden Stressoren - wie z.B. Hitze - die im Großen und Ganzen mit den abiotischen/äußeren Noxen identisch sind. Auch ein Zusammenwirken emotionaler und somatischer, in Form von diffizilen psychosomatischen Stressoren findet sich nach Bickhardt (1992), u.a. in verletzungsbedingtem Schmerz.

2.5 Stress und Hormone

2.5.1 Hormonelle Wege der Stressverarbeitung

Bei der Verarbeitung von Stressreizen kommt zwei endokrinen Systemen besondere Bedeutung zu. Das schnellere Sympathikus-Nebennieren-System hilft dem Organismus, umgehend nach Reiz-Kontakt in einen Zustand zu kommen, in dem er mit dem „*fight or flight*“-Prinzip (Cannon 1929) auf den jeweiligen Stressor reagieren und sich diesem somit anpassen kann. Demgegenüber dient die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Wojtaś et al. 2020; Ellis et al. 2006; Selye 1976b) eher der Verarbeitung von solchen Reizsituationen, die vom Organismus nur noch bedingt kompensiert werden können.

Wird ein Reiz durch die Großhirnrinde wahrgenommen, so folgt zunächst eine Übermittlung des Impulses an den Hypothalamus und so eine Anregung des autonomen Nervensystems (Spinas und Fischli 2011; Rensing et al. 2006). Infolgedessen kommt es zu einer Ausschüttung von an dieser Stelle als Neurotransmitter fungierenden Noradrenalins aus den postganglionären Neuronen des sympathischen Nervensystems sowie ferner von weiterem als Körperhormon wirkendem und mit Adrenalin gepaartem Noradrenalin aus den Nebennieren (Spinas und Fischli 2011). Diese beiden Katecholamine bewirken eine Reihe

kardiovaskulärer und metabolischer Reaktionen, die den Organismus in „Alarmbereitschaft“ bringen sollen. Hierzu zählen unter anderem die Steigerung der Herzfrequenz aber auch die Erweiterung der Bronchien, die Freisetzung von Energiereserven durch Glukogenolyse sowie die Umverteilung des Blutvolumens aus Haut und Magendarmtrakt in ZNS und Muskulatur (Spinas und Fischli 2011; Loeffler und Gäbel 2009). Gelingt es dem Organismus allerdings nicht, sich durch diese schnellen Mechanismen an den Reiz anzupassen, so folgt im weiteren Verlauf die Ausschüttung des sogenannten Corticotropin-Releasing-Hormones (=CRH) aus dem Hypothalamus. Dieses gelangt durch die Blutbahn zur Hypophyse und veranlasst dort die Bildung und Freisetzung des Adrenocorticotropen Hormones (= ACTH). Nachdem ACTH aus dem Vorderlappen der Hypophyse abgegeben wurde, stimuliert es in den Nebennieren die vermehrte Bildung von Glucocorticoiden, mit Hilfe derer u.a. die Glucoseneubildung und damit die Energiebereitstellung aus Aminosäuren induziert wird (Rassow et. al. 2012; Spinas und Fischli 2011; Loeffler und Gäbel 2009). Beim Säugetier erfolgt die Bildung des Adrenalins im Nebennierenmark und die der Corticoide in der Nebennierenrinde (Spinas und Fischli 2011). Zwar sind gleiche Gewebsstrukturen auch beim Vogel zu finden, doch verweisen u.a. Freeman (1971a) und Wittmann (1994) auf die beim Vogel nicht vorhandene strikte Trennung dieser, was die Verwendung der Begriffe Nebennierenmark und -rinde hier nicht gebräuchlich macht. Vielmehr finden sich in den Nebennieren der Vögel benachbart liegende Adrenal- und Interrenalzellen, von denen letztgenannte sowohl das Glucocorticoid Corticosteron als auch das u.a. im Elektrolythaushalt bedeutende Mineralocorticoid Aldosteron produzieren (König und Weissengruber 2001).

2.5.2 Katecholamine

Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin sind die Mediatoren der akuten, Sympathikus-vermittelten „*fight or flight*“-Stressreaktion. Kaum aus der Nebenniere freigesetzt, sind diese Hormone durch eine sehr kurze Halbwertszeit ihrer Plasma-Konzentrationen gekennzeichnet, welche Berne und Levy (1983, zitiert nach Baum und Grunberg 1997) für den Menschen mit nur 1-3 Minuten beziffern. Durch diesen sehr schnellen und oft schon durch die Probenentnahme ausgelösten Anstieg sowie den ebenso schnellen Abfall dieser Hormone im Blutkreislauf, empfehlen Baum und Grunberg (1997), aber auch Freeman (1985) und Wittmann (1994), auf deren kosten- und zeitintensive Messung zur alleinigen Beurteilung einer Stresssituation zu verzichten. Stattdessen befürworten sie hierfür die Messung von durch eben jene Hormone beeinflussten Parametern, wie z.B. Blutdruck oder Herzfrequenz, denen sie für diese Fragestellung eine ähnlich gute Aussagekraft zuschreiben. Da eine vermehrte Katecholamin-Ausschüttung u.a. auch zu erhöhter Muskelaktivität bzw. zu sogenannter stressbedingten Hyperthermie (Edgar et al. 2013) führt, können zudem auch Werte zur Körpertemperatur hilfreiche Aussagen liefern. Ross et al. (2020) machen sich die

Körpertemperatur dahingehend zunutze, als dass sie die in Stresssituationen durch Minderdurchblutung der Körperperipherie bewirkte Abkühlung bzw. die anschließend notwendige Erholungszeit des Hühner-Kammes als Marker für das Stressempfinden dieser Tiere heranziehen.

2.5.3 Corticosteron

Corticosteron ist das beim Vogel dominierende Stresshormon (Cockrem 2007a) der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (engl. *HPA axis* für *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*). Ähnlich dem chemisch eng verwandten bzw. äquivalenten (Prickaerts und Steckler 2005) Cortisol beim Menschen, wird Corticosteron nach Stimulierung der HPA axis und der damit einhergehenden Stimulation durch das adrenocorticotrope Hormon (= ACTH) aus Cholesterol über Pregnenolon gebildet (Buckingham 2007; Prickaerts und Steckler 2005) und findet anschließend Beteiligung an vielzähligen Stoffwechselabläufen. So trägt es - als typisches Glucocorticoid – durch eine Verstärkung der Gluconeogenese aus Aminosäuren sowie einer gesteigerten Glykogenbildung in der Leber zu einer vermehrten Energiebereitstellung für den Organismus bei (Rassow et. al. 2012; Spinass und Fischli 2011; Loeffler und Gäbel 2009), wodurch dieser angemessen auf eine ihn konfrontierende stressige Situation reagieren kann. Nach der Ausschüttung aus der Nebenniere in die systemische Zirkulation (Buckingham 2007) gelangt Corticosteron im Blutkreislauf so in alle hierdurch versorgten Organe. Gleich dem Cortisol beim Säugetier, gelangt Corticosteron somit auch in Drüsen sowie in Haar- bzw. Federfollikel und wird ferner über die entsprechenden Se- und Exkrete ausgeschieden bzw. in wachsende Haare und Federn eingelagert (Häffelin et al. 2021; Häffelin et al. 2020; Bortolotti et al. 2008; Kirschbaum und Hellhammer 2000).

2.5.4 Die Messung der Corticosteron-Konzentration

2.5.4.1 Corticosteron im Blut

Die Messung der Corticosteronkonzentration erfolgt mittels Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (= ELISA) oder Radio-Immunoassay (= RIA). Je nach Probenmaterial und verwendetem Testkit muss eine vorherige Extraktion des Corticosterons durchgeführt werden.

Corticosteron kann im Blut frei oder an bestimmte Proteine gebunden vorliegen. Während der Großteil des Hormons an ein hochaffines, sogenanntes Corticosteron bindendes Protein (CBP) - dem Transcortin - gebunden ist, liegt der freie Anteil entweder gänzlich ungebunden oder in einer nur losen Bindung mit dem niederaffinen Albumin vor (Malisch und Breuner 2010; Slaunwhite und Sandberg 1959). Da in Wirbeltieren mit 80 – 95 % der Großteil des im Blut befindlichen Corticosterons an Transcortin gebunden ist (Richard et al. 2010; Mendel 1989), gibt es seit langer Zeit unterschiedliche Ansichten bezüglich der biologischen Aktivität des

gebundenen bzw. ungebundenen Corticosterons. Die Autoren Mendel (1989) sowie Breuner und Orchinik (2002) vertreten die Ansicht, dass nur freies Corticosteron im Regelkreis einer Stressreaktion von Bedeutung ist. Nach dieser „*free hormone hypothesis*“ (Mendel 1989) dient das CBP zum Ausgleich von erhöhten Corticosteron-Konzentrationen oder dem Freisetzen des Hormons an den Zielgeweben und hat damit vorrangig eine regulatorische Funktion (Breuner und Orchinik 2002). Als Vertreter einer anderen Theorie messen Strel'Chyonok und Avvakumov (1983) oder Nakhla et al. (1988) hingegen dem CBP eine entscheidende Bedeutung auch beim Einbringen des Corticosterons in die Zielzellen bei.

Ähnlich dem CBP finden sich auch hinsichtlich der Basalkonzentration des Corticosteron-Spiegels in der verfügbaren Literatur unterschiedliche Angaben. Betrachtet man hierbei ausschließlich Studien, in denen die Probenanalyse mit Hilfe eines ELISAs erfolgte, so lagen die in Plasma bzw. Serum ermittelten Basalkonzentration des Corticosterons in einem Bereich von unter 0,14 ng/ml bis über 20ng/ml (Badmus et al. 2021; Al-Maksousi et al. 2019; Weimer et al. 2018; Abobaker et al. 2017; Antonissen et al. 2017; Huth und Archer 2015; Mirfendereski und Jahanian 2015; Xie et al. 2015; Olanrewaju et al. 2014; Vosmerova et al. 2010; Zhang et al. 2009; Post et al. 2003). Ein Anstieg der Corticosteronwerte kann bereits innerhalb der ersten zwei Minuten nach Stressexposition beobachtet werden (Dereli Fidan et al. 2018; Chloupek et al. 2011; Romero und Reed 2005).

Für die Bestimmung der Blut-Corticosteron-Konzentration mittels ELISA oder RIA findet Serum oder Heparin-Plasma Verwendung (Hedlund und Jensen 2021; Weimer et al. 2018; Scanes 2016). Hinsichtlich eines möglichen Einfrierens der Blutproben vor Durchführung des jeweiligen Testsystems fanden Li et al. (2015) in einer Untersuchung zu Mäuseplasma, dass dieses keinen negativen Effekt auf die später gemessene Corticosteronkonzentration in der Probe zu haben scheint. Je nach verwendetem Untersuchungsmaterial und Testkit muss das Corticosteron vor einer Analyse aus dem jeweiligen Material extrahiert werden. Für die Extraktion von Corticosteron aus sehr geringen Mengen Plasma finden meist organische Lösungsmittel wie Dichlormethan, Diethylether, Hexan oder auch Ethanol (Gross und Siegel 1983) Verwendung.

2.5.4.2 Corticosteron in Federn

Die Einlagerung von Corticosteron in Federn beruht auf der Gegebenheit, dass wachsende Federn stark vaskularisiert sind und sich infolgedessen das im Blut zirkulierende Hormon in der Keratinstruktur der Federn ablagern kann (Bortolotti et al. 2008). Dort eingelagert, ist Corticosteron auch über längere Zeit stabil, zeigt sich als resistent gegenüber Störfaktoren wie

z.B. Hitze oder Frost und kann auch in musealen Federproben bzw. Federn verendeter Tiere gemessen werden (Bortolotti et al. 2009; Bortolotti et al. 2008).

Findet die Messung des Feder-Corticosterons seit längerer Zeit schon in Studien zu Wildvögeln Verwendung (Haase et al. 2021; Voit et al. 2021; Reese et al. 2020; Voit et al. 2020; Harris et al. 2017; Will et al. 2014; Lattin et al. 2011; Strohlic und Romero 2008), so zeigte sich gerade in den letzten Jahren vermehrtes Interesse auch im Bereich der Haltung von Hühnervögeln. Carbajal et al. (2014) sehen hierin eine gute Möglichkeit zur Bewertung von Tierschutzfragen in der Broiler-Haltung, Häffelin et al. (2020) erkennen zudem einen Parameter, auf dessen Grundlage Haltungssysteme oder Züchtungsschemata im Hinblick auf stressresistentere Legehennenlinien verbessert werden können. Zur Bestimmung der Corticosteronkonzentration können sowohl Schwanz- und Körperfedern als auch die Hand- und Armschwingen genutzt werden. Während Bortolotti (2008) den in seiner Arbeit genutzten Tieren noch die großen Handschwingen sowie Federn im Flankenbereich herauszog, sehen Häffelin et al. (2021) Federn aus dem Flanken- sowie aus dem Bauchbereich auf Grund ihrer vergleichsweise hohen Brüchigkeit als ungeeignet an. In den letzten Jahren fanden für die Corticosteron-Bestimmung vermehrt Interscapularfedern (Monclús et al. 2020; Reese et al. 2020; Carbajal et al. 2014) Verwendung für die u.a. Häffelin et al. (2020 und 2021) im Vergleich zu Schwanzfedern deutlich höhere Corticosteronkonzentrationen feststellen konnten. Voit et al. (2020) diskutieren das Abschneiden der Federn als tierschutzgerechte Alternative zum Herausziehen.

Je nach Rasse, Alter, Vorbehandlung, dem verwendeten Feder-Typus oder der Art der Probenbearbeitung, finden sich für die Corticosteronkonzentration in Federn recht unterschiedliche Angaben. So ermittelten Ataallahi et al. (2020) für zermahlene Federn von Broiler-Flügeln eine Corticosteronkonzentration von ca. 5,5 pg/mg und für solche, die lediglich zerschnitten wurden, eine Konzentration von 4,5 pg/mg. Nordquist et al. (2020) fanden in der 2. Handschwinge von 16 Wochen alten Hühnern Corticosteronkonzentrationen von ca. 2 pg/mg und in der 8. Handschwinge von ca. 2,75 pg/mg. Bei 28 Wochen alten Hühnern fanden sie sowohl in der 2. als auch in der 8. Handschwinge Konzentrationen von jeweils ca. 3 pg/mg. Häffelin et al. (2020) fanden in tot in kommerziellen Bodenhaltungen aufgefundenen Legehennen eine mittlere Corticosteron-Konzentration von 19.3 pg/mg in geschnittenen Schwanz-/Steuerfedern, 23.3 pg/mg in gemahlen Schwanz/Steuerfedern und 80.0 pg/mg in Interscapularfedern. In einer an diese Arbeit anschließenden Studie fanden sie in den Federn von im Rahmen anderer Versuche geschlachteter Junghennen in deren Interscapularfedern Corticosteron-Konzentrationen von durchschnittlich 61,3 pg/mg (Häffelin et al. 2021). Weimer et al. (2018) erhielten nach Zugabe von Corticosteron ins Trinkwasser von Masthähnchen

Corticosteronkonzentrationen in Interscapularfedern von durchschnittlich 1494,5 (Studie 1) und 598,8 pg/mm (Studie 2), verglichen mit 905,9 bzw. 84,1 pg/mm bei den Kontrolltieren. In der 3. Handschwinge ermittelten sie durchschnittlich 114,41 und 534,0 pg/mm bei den Versuchstieren, verglichen mit 310,0 und 206,9 pg/mm bei den Kontrolltieren. Carbajal et al. (2014) fanden zudem mit einer mittleren Corticosteronkonzentration von 0.71 ± 0.55 pg/mm in Interscapularfedern männlicher und 0.76 ± 0.52 pg/mm in denen weiblicher Broiler an das Geschlecht gekoppelte Konzentrations-Unterschiede.

Die Messung der Corticosteronkonzentration in Federn stellt nach Romero und Fairhurst (2016) auf Grund der durch sie möglichen, retrospektiven Bewertung der Corticosteron-Physiologie eine gute Ergänzung zur Bestimmung der akuten Plasma-Corticosteronspiegel dar. Die Autoren sehen hier eine gute Möglichkeit, einen bestimmten zurückliegenden Zeitabschnitt hinsichtlich seiner Belastung für die untersuchten Tiere einzuschätzen, geben allerdings auch zu bedenken, dass hierbei nur die Stressexposition während des Wachstums der Federn erfasst wird. Zusätzlich sollten ihrer Ansicht nach kurzfristige Einflussfaktoren, wie z.B. die Mauser - in welcher die Ablagerungsdynamiken eventuell nicht repräsentativ für den Großteil des Jahres sind - hierbei ebenso beachtet werden, wie z.B. die Feder-spezifischen Parameter Größe und Farbe. Zu einem weiteren Feder-spezifischen Parameter - dem Federtyp - fanden u.a. auch Häffelin et al. (2020 und 2021) große, sowohl intra- als interindividuelle Unterschiede. Infolge dessen empfehlen sie, beim Vergleich unterschiedlicher Tiere stets Federn gleicher Bereiche zu wählen.

2.5.4.3 Corticosteron im Speichel

Die Analyse von glucocorticoiden Stresshormonen in Speichelproben wird von vielen Autoren als eine der stressärmsten Methoden zur Beurteilung der adrenalen Stressantwort beschrieben. Während zur Messung von Corticosteron im Hühnerspeichel bisher keine Erfahrungen vorliegen, findet sich im Bereich der Haussäugetiere bzw. der Humanmedizin eine bereits über Jahrzehnte gewachsene Expertise im Hinblick auf das Säuger-Äquivalent Cortisol. Ob Mensch (Kobayashi und Miyazaki 2015; Teruhisa et al. 1981), Pferd (Sauer et al. 2020; Pell und McGreevy 1999), Rind (Kovács et al. 2020; Schaefer et al. 2004), Schwein (López-Arjona et al. 2020; Parrott und Misson 1989), Schaf (Contreras-Aguilar et al. 2019; Fell et al. 1985), Ziege (Samir et al. 2020; Greenwood und Shutt 1992), Hund (Wojtaś et al. 2020; Vincent und Michell 1992), Katze (Yozova et al. 2021; Siegford et al. 2003) oder Meerschweinchen (Nemeth et al. 2016) – in allen Fällen findet Speichelcortisol zur Beurteilung von Stressempfinden Verwendung. Nachdem die Speichelproben durch entsprechende Wattebällchen, -tupfer, -stäbchen (Wojtaś et al. 2020; Nemeth et al. 2016; Parrot und Misson 1989) oder auch durch spezielle Pumpen, wie z.B. bei Fell et al. (1985) gewonnen wurden,

folgt anschließend eine Analyse mittels RIA oder EIA. Bei Studien, in denen zusätzlich zum Speichel auch die Cortisolwerte im Blutplasma ermittelt wurden, zeigte sich eine positive Korrelation der in beiden Probenarten gemessenen Konzentrationen (Samir et al. 2020; Teruhisa et al. 1981; Vincent und Michell 1992). Während Vincent und Michell (1992) nur 4-10% der Plasma-Corticosteronkonzentration im Speichel nachwies, konnten Teruhisa et al. (1981) 70% der gemessenen Konzentrationen und Greenwood und Shutt (1992) gleiche Konzentrationen freien Cortisols in Blut und Speichel feststellen. Den Grund für diese gute Korrelation sehen Kirschbaum und Hellhammer (2000) darin, dass Steroide aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes und ihrer guten Lipidlöslichkeit sehr leicht durch die Zellmembranen der Speicheldrüsenzellen diffundieren können. Diese Eigenschaft sprechen die Autoren allerdings nur der ungebundenen, also freien Hormon-Fraktion zu, die beim Cortisol – vergleichbar dem Corticosteron - nur einem geringen Teil der Gesamtkonzentration entspricht.

2.6 Stress und Blutzellen

2.6.1 Stressleukogramm

Aus unterschiedlichen Studien an Vögeln und Säugetieren ist bekannt, dass ein Organismus auf Stress und der damit einhergehenden Erhöhung des Corticosteron- bzw. Cortisolspiegels auch mit einer Veränderung der quantitativen Leukozytenzusammensetzung im peripheren Blut reagieren kann. Diese Veränderung zeigt sich in einem Anstieg der heterophilen (H) bzw. neutrophilen (N) Granulozyten und einem Rückgang der Lymphozyten (L), infolgedessen sich deutlich erkennbare Änderungen im Verhältnis dieser beiden Zelltypen ergeben. Eine Veränderung dieser sogenannten H:L- bzw. N:L-Ratio stellt eine Anpassungsreaktion dar, durch die vermehrt die für die unspezifische Immunabwehr notwendigen heterophilen (beim Vogel) bzw. neutrophilen Granulozyten (beim Säuger) ins periphere Blut gelangen und Lymphozyten aus dem Blut heraus in Organe wie Milz, Lunge, Haut, Lymphknoten und Darmwand umverteilt werden (Al-Murrani et al. 2002; Dhabhar 2002; Dhabhar et al. 1996; Döcke 1994; Beuving et al. 1989; Gross und Siegel 1983; Davison und Flack 1981). Während beim Huhn eine H:L-Ratio von 0,2-0,3 nach Gross (1989) einen außergewöhnlich niedrigen Stresspegel charakterisiert, stehen Werte von über 0,6 für eine erhöhte Negativbelastung des jeweiligen Individuums. Einen optimalen Stresspegel kennzeichnet dagegen ein Wert von 0,5, während nach Gross und Siegel (1983) Werte über 1,3 eine bestehende Erkrankung vermuten lassen. Die Verschiebung im Heterophilen- bzw. Neutrophilen-/Lymphozytenverhältnis wurde bereits bei vielzähligen wilden und vor allem auch domestizierten Wirbeltieren genutzt, um Stressoren oder bestimmte Stresssituationen zu bewerten und dadurch unter anderem Verbesserungen für Zucht oder Haltung (Carbillet et al. 2019; Pavlova et al. 2018; Türkyilmaz 2008; Al-Murrani et al. 2002; Morrow-Tesch et al. 1994) zu ermöglichen. Gross und Siegel

(1983) sowie Maxwell (1993) sehen in ihr zudem aufgrund der länger bestehen bleibenden Veränderung im Vergleich zum Corticosteronwert einen sicheren Anzeiger für niedrigen bis milden Stress. Allerdings gibt Maxwell (1993) auch zu bedenken, dass sich in extremen Stresssituationen, wie z.B. bei Lebensgefahr, eine Heteropenie und Basophilie entwickelt, was eine Verwendung der H:L-Ratio zur Bewertung solcher Fälle untauglich macht. Prinzing et al. (2012), Cunnick et al. (1994), Maxwell (1993) und Dein (1986) beschreiben eine Verschiebung der H:L-Ratio ab einer Zeit von 30 Minuten bis 20h nach einer Stresssituation und somit deutlich zur Antwort der Glucocorticoide verzögert. Bei länger bestehenbleibenden Stresssituationen fanden sie zudem eine nachhaltige Verschiebung dieser beiden Zelltypen.

2.6.2 Hämatokrit

Als Hämatokrit bezeichnet man den Anteil der Blutzellen am Gesamtblut. In den Einheiten % oder l/l angegeben, wird der Hämatokrit in erster Linie durch die Erythrozyten als zahlenmäßig größte Zellfraktion bestimmt. Durch mannigfaltige Faktoren beeinflusst, findet sich nicht nur zwischen den physiologischen Hämatokritwerten unterschiedlicher Vogelarten eine große Spannweite, sondern oftmals auch schon innerhalb einer einzigen Spezies. Betrachtet man hierfür z.B. das in dieser Studie verwendete Haushuhn, so reichen die von unterschiedlichen Autoren als physiologisch angesehen Werte von 21 bis 55 % (Salomon 1993; Siegmann 1992; Gylstorff und Grimm 1987; Mehner und Hertfiel 1983; Loliger et al. 1980), wobei Newell und Schaffner (1950) für adulte Hennen Hämatokrit-Mittelwerte von 27 – 34 % und für adulte Hähne 40 – 52 % benennen.

Zusätzlich zu diesem geschlechtsbedingten Unterschied finden sich weitere, vielfältige Faktoren, die Einfluss auf den Hämatokritwert haben können. So belegen zahlreiche, nicht nur an Haushühnern, sondern auch an anderen Vogelspezies durchgeführte Studien, dass Veränderungen des Hämatokrits auch durch Faktoren wie Alter, Legestatus, Parasiten, Jahreszeit, geografische Höhenlage, Vergiftungen, Genetik, Wasserhaushalt oder Ernährung (Markowski et al. 2020; Minias 2020; Nowaczewski und Kontecka 2012; Fair et al. 2007; Shlosberg et al. 1998; Gylstorff und Grimm 1987; Mehner und Hertfiel 1983; Freeman 1971b; Newell und Schaffner 1950) hervorgerufen werden.

Weiterhin kann sich auch erheblicher Stress auf die Höhe des Hämatokrits auswirken. Hierbei gibt es zwischen den Autoren allerdings unterschiedliche Ansichten bezüglich der Art und Weise der Beeinflussung. Grund hierfür ist die vielseitige Wirkung der eine Stresssituation mediiierenden Glucocorticoide. Während Döcke (1994) den Glucocorticoiden eine den Hämatokritwert erhöhende Wirkung zuschreibt und dies mit einem durch sie verzögerten Erythrozytenabbau begründet, verweist Aurich (2002) auf die - zusätzlich zur glucocorticoiden

- auch bestehende mineralocorticoide Wirkung dieser Hormone. Letztere bewirkt durch Förderung der Natriumretention in den Nieren eine Erhöhung der Natriumkonzentration im Blut, die wiederum eine Steigerung des Plasmavolumens und somit eine Erniedrigung des Hämatokritwertes zur Folge hat.

2.7 Stress und Kotabsatz

In Situationen der Sympathikus-vermittelten „Alarmbereitschaft“ werden in einem Organismus zunächst alle nicht überlebensnotwendigen Körperfunktionen heruntergefahren, was zunächst auch ein Sistieren der Darmmotilität zur Folge hat. Im Verlauf einer durch den Organismus nicht mehr kompensierbaren Stresssituation kommt es dann allerdings oftmals durch die damit einhergehende Freisetzung des CRH aus der Hypophyse zu einer Degranulation der im Darm ansässigen Mastzellen und hierdurch zu einer meist mit Durchfall einhergehenden, viszeralen Hypersensitivität (Moeser et al. 2007). Bei Mastzellen handelt es sich um einen speziellen Typus weißer Blutzellen, die sich in größeren Mengen nahe von Blutgefäßen und Nerven im interstitiellen Bindegewebe der Submukosa von Verdauungstrakt, Atemwegen oder Lederhaut befinden. Mastzellen enthalten viele unterschiedliche Botenstoffe - allen voran Histamin - und haben besondere Bedeutung bei IgE-vermittelten, allergischen Sofortreaktionen (Typ 1-Allergie) aber auch bei der Abwehr unterschiedlicher Pathogene und Toxine (Galli et al. 2011; Sun et al. 2008; Metz et al. 2006; Tschaikowski und Jorde 1989). Neben der für die Typ-I-Allergie typischen, immunologischen Mastzelldegranulation durch die von Plasmazellen gebildeten IgE, kann auch das im Rahmen nicht kompensierbarer Stressreaktionen freigesetzte CRH eine ähnliche Wirkung erzielen. Diese endokrine Stimulation findet ihre Grundlage im sogenannten enterischen Nervensystem (ENS). Das ENS ist neben dem Sympathikus und dem Parasympathikus der dritte Bestandteil des autonomen Nervensystems. Dieses auch als „kleine[s] enterische[s] Hirn“ (Wood et al. 1999) bezeichnete Nervensystem verfügt über ähnlich viele Nervenzellen wie das zentrale Nervensystem und steuert vielzählige Abläufe im Magendarmtrakt, wie z.B. den Blutfluss, die Peristaltik oder auch die Absorption und Sekretion durch die Darmwand (Gershon 2001). Dass auch Stress Einfluss auf dieses System nehmen kann, liegt in der Tatsache begründet, dass sich auch im Verdauungstrakt Rezeptoren für CRH befinden (Uranga et al. 2020; Wallon et al. 2008). Gelangt nun also aus der Hypophyse freigesetztes CRH durch den Blutstrom in die Gefäße des Magendarmtraktes, so werden die dort befindlichen und den Gefäßen anliegenden Mastzellen stimuliert. Infolgedessen geben diese durch Degranulation eine Vielzahl unterschiedlich wirkender parakriner Substanzen ab. Diese stimulieren die angrenzenden Nerven des ENS und bewirken so u.a. eine Steigerung der Darmmotilität sowie eine vermehrte Sekretion von Elektrolyten und Wasser in das Darmlumen (Teitelbaum et al. 2008). Durch den hierdurch forcierten Auswurf des Darminhaltes sollen in dieser Stresssituation potentiell

gefährliche Pathogene beschleunigt entfernt und so die Unversehrtheit des Darmes gewahrt werden. Diese häufig auch als *Brain-Gut-Axis* (Filaretova und Bagaeva 2016) bezeichnete Verknüpfung zwischen einer stressigen Situation und vermehrtem Kotabsatz, den Pees und Pees (2008) für Vögel gar als perakuten Durchfall beschreiben, kann daher als gutes Beurteilungskriterium für das jeweilige Stressempfinden eines Tieres herangezogen werden. Nichtsdestotrotz sollte dennoch die Tatsache berücksichtigt bleiben, dass Stressreaktionen bei sozial lebenden Tieren stark vom Sozialstatus (Haemish 1990) und generell von vielfältigen Faktoren, wie Alter, Krankheiten oder früheren Erfahrungen mitbeeinflusst werden (Moberg und Mench 2000).

2.8 Stress und Verhalten

2.8.1 Open field Test / New Area Test

Um Stress-, Angst- oder auch Wohlbefinden von Tieren zu beurteilen, können verschiedene Verhaltenstests eingesetzt werden. Bei dem vom amerikanischen Psychologen Calvin Springer Hall entwickelten Open Field Test handelt es sich um einen Verhaltenstest, der ursprünglich zur Beurteilung des Verhaltens von Labornagetieren entwickelt wurde und der bis heute aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit noch immer häufig Verwendung findet (Stanford 2007; Hall 1934). Bei diesem Test wird das zu untersuchende Tier – ursprünglich meist eine Ratte oder eine Maus - in einen freien, ihm unbekanntem Raum (= ein offenes Feld) gesetzt und sein Umgang mit dieser Situation über einen gewissen Zeitraum begutachtet. Nagetiere meiden, ähnlich den Hühnervögeln, als Beutetiere mit natürlicherweise hohem Prädationsdruck, offene Flächen und bevorzugen daher Aufenthaltsorte mit stetiger Möglichkeit zur Deckung (Barnett 2007; Zeltner und Hirt 2003). Nimmt man ihm diese Möglichkeit, so reduziert das jeweilig untersuchte Tier infolge der hierdurch ausgelösten Angstzustände seine Fortbewegung und zeigt in Folge ein als Freezing bezeichnetes Verharren (Lages et al. 2021; Campbell et al. 2019a; Smith 1978). Individuen, die z.B. aufgrund einer vorausgegangenen medikamentösen Behandlung in ihrem Angstepfinden gedämpft sind, nutzen im Gegensatz dazu größere Bereiche des Open Fields und legen im Verhältnis zu unbehandelten, instinktiv agierenden Tieren größere Strecken zurück (Tanaka et al. 2012; Choleris et al. 2001). Während Mäuse und Ratten in entsprechenden Studien meist als Modelle für allgemeine Fragestellungen dienen (Soledad Fernández et al. 2021; Ortolani et al. 2011), finden sich beim Huhn neben solchen Studien (Johnsson et al. 2016) auch jene, die sich vor allem mit Verbesserungen in Haltung und Zucht, insbesondere wirtschaftlich genutzter Hühnerrassen auseinandersetzen (Mohamed et al. 2020; Webster und Hurnik 1990).

Anders als der Name vermuten lässt, muss ein Open Field Test nicht zwangsläufig im Freien stattfinden. Je nach Tiergröße oder vorhandenen örtlichen Gegebenheiten können auch

einfache Boxen oder freie Räume (= New Area Test) genutzt werden, in denen - je nach Fragestellung – z.B. die vom Tier zurückgelegten Entfernungen erfasst werden können (Stanford 2007). Trotz der im Grunde einfachen Durchführbarkeit mahnt Stanford (2007) allerdings auch die nur mäßige Standardisierung des Open Field Testes und die sehr variablen Versuchsprotokolle an. In diesem Zusammenhang verweist er auf die Arbeit Walsh und Cummins (1976), die zu bedenken geben, bei der Auswertung der erfassten Ergebnisse möglichst nicht nur einzelne Parameter isoliert zu betrachten, sondern diese stets im Zusammenhang mit anderen, veränderlichen Faktoren zu sehen, um so die Gefahr einer zu umfangreichen Verallgemeinerung zu vermeiden.

2.8.2 New Object Test / Novel Object Test / Novel Object Recognition Test

Beim New Object Test werden die jeweiligen Versuchstiere mit einem neuartigen, ihnen bislang unbekanntem Objekt konfrontiert und anschließend das Verhalten der Tiere beurteilt (Dalmau et al. 2009). Unter anderem kann hierbei die Zeit für die Erkundung bzw. bis zur Akzeptanz des neuen Objekts gemessen werden. Einen sehr einfachen Versuchsaufbau beschreiben Bassler et al. (2013) mit dem Verweis auf die Arbeit von Forkman et al. (2009). Hierbei wurde ein neues, den Tieren unbekanntes Objekt in die Einstreu des Stalles gelegt (Röhre, 50 × 2,5 cm, bedeckt mit 3,3-cm-Ringen in Grün, Weiß, Rot, Schwarz und Blau) und Vögel, die sich innerhalb einer Vogellänge am Objekt befanden, wurden in Intervallen von 30 Sekunden über einen Zeitraum von 2 Minuten erfasst. Es wurden daraufhin zwei weitere Durchläufe pro Herde durchgeführt und anschließend der Mittelwert aus der Anzahl der jeweilig gezählten Hennen ermittelt (Forkman et al. 2009, zitiert nach Bassler et al. 2013).

Häufig wird der New Object Test mit dem Open Field Test oder anderen Tests kombiniert, um aus der Summe der gesammelten Beobachtungen Aussagen zu Stress- bzw. Wohlbefinden der jeweilig untersuchten Tiere treffen zu können (Van der Eijk et al. 2020; Bassler et al. 2013; Campler et al. 2009).

Meuser et al. (2021) fanden in ihrer Arbeit, die den New Object Test mit dem Avoidance Distance Test (= ADT) kombiniert, dass sich unterschiedliche Hühnerrassen im Hinblick auf Angst- und Erkundungsverhalten in Bezug auf neue Objekte (New Object Test) oder Menschen (ADT) unterscheiden können und sehen hierin großes Potential für die Verbesserung des Tierschutzes in zukünftigen Haltungssystemen.

2.8.3 Ethogramm

Für die Auswertung der verschiedenen Verhaltenstests werden alle für die jeweilige Fragestellung relevanten Verhaltensweisen definiert und in einem sogenannten Ethogramm

klar und objektiv erfasst (Dossey 2009). Jedes Ethogramm kann hierbei beliebige Komponenten haben und so an unterschiedliche Spezies und Situationen angepasst werden. Im Bereich der Verhaltensbeobachtung beim Huhn finden sich selten Studien zu Einzeltieren, sondern eher Beobachtungen kleinerer Gruppen oder ganzer Herden, insbesondere landwirtschaftlich genutzter Tiere. So verglich zum Beispiel Wilutzky (2015) das Verhalten von unter konventionellen Bedingungen gehaltenen Masthähnchen mit dem von Tieren aus einer alternativen Haltungsform und stellte fest, dass letztere, die mit einem größeren Angebot an Platz und Beschäftigungsmöglichkeiten einherging, die Tiere zu mehr Aktivität veranlasste und – kombiniert mit langsamer wachsenden Zuchtlinien – die Tiergesundheit förderte. Weiterhin finden sich Studien, die zum Beispiel den Einfluss eines expliziten Stressors bzw. einer potentiellen Stressreduktions-Maßnahme durch Erstellung von Ethogrammen bewerten. Als Beispiel hierfür zeigten Mohammed et al. (2018) und auch Wang et al. (2018), dass die Supplementierung von pro- oder symbiotischen Nahrungsergänzungsmitteln hitzebedingtes Stressverhalten in der Broilermast abmildern kann. Als Beispiel für eine Studie mit White Leghorn Hennen, zeigen u.a. Mack et al. (2013) ebenfalls mit Hilfe von Ethogrammen die Bedeutung der genetischen Selektion zur Verbesserung der Hitzestresstoleranz und damit des Tierwohlbefindens in kommerziellen Legehennenhaltungen. Auch mit Ethogrammen von White Leghorn Hennen arbeiteten schon Webster und Hurnik (1990), die u.a. feststellten, dass die Aktivität von in Käfighaltung untergebrachten Legehennen mit der Zeit abnimmt. Dies begründeten die Autoren zum einen mit dem zunehmenden Alter der Tiere während des Studienverlaufs, unter Umständen aber auch mit einer Verhaltensanpassung an die Käfigumgebung.

Einen Großteil des Verhaltens beim Huhn macht sowohl das Futtersuch- und Aufnahmeverhalten, als auch das Komfortverhalten aus (Wilutzky 2015; Bessei 2014; Duncan et al. 1998). Als typische Verhaltensweisen, die im Rahmen der Futteraufnahme zu beobachten sind, findet sich zum einen das Scharren im Bodensubstrat sowie das Bepicken von Gegenständen oder potentieller Nahrung (Wilutzky 2015). Hierbei sollte allerdings bedacht werden, dass sich diese Verhaltensweisen unter bestimmten Umständen auch im Rahmen von Stereotypen, Verhaltensstörungen oder als Übersprungsbewegungen in Konfliktsituationen zeigen können (Bessei 2014; Tinbergen 1940). Im Rahmen des Komfortverhaltens sind die üblicherweise zu beobachtenden Verhaltensweisen das Kratzen mit den Krallen, die Gefiederpflege mit dem Schnabel oder auch das Ausstrecken von Füßen oder Flügeln. Bietet sich den Tieren die Möglichkeit, so wird dieses Komfortverhalten ergänzt durch ein Bad in trockenem Staub (Wilutzky 2015; Duncan et al. 1998) mit anschließendem, kräftigem Schütteln zur Befreiung von Staub und möglichen Parasiten sowie zur Auflockerung des Gefieders. Dieses Verhalten des Putzens und Schüttelns kann auch nach erfolglosen

Angriffen durch Beutegreifer, nach einem Kampf oder - bei Hennen - nach der Paarung mit einem Hahn (Fölsch und Vestergaard 1981) beobachtet werden. Im Kontext von Stall und Auslauf finden sich zudem typische Verhaltensweisen, wie das Nestbau- oder Eiablageverhalten sowie die Nutzung von Sitzstangen und bestimmter Stallbereiche (Buijs et al. 2010; Levan et al. 2000). Beobachtet man Tiere in der Gruppe, so bietet sich ein guter Einblick in Parameter des Rangordnungs-, Dominanz-, Aggressions- oder Sozialverhaltens (Buchholtz 2005; Riedstra und Groothuis 2002; Fölsch und Vestergaard 1981; Hughes und Duncan 1972; Siegel und Hurst 1962; Guhl 1953). Werden gemischtgeschlechtliche Gruppen beobachtet, kann zudem das Werbe- und Paarungsverhalten (Wood-Gush 1954) beurteilt werden.

Mit diesem Wissen um das Verhaltensrepertoire des Huhnes bieten sich gute Möglichkeiten für die Anwendung von Ethogrammen zur Überprüfung potentiell positiver Effekte eines kognitiven Enrichments auf das Wohlbefinden der Tiere. So fanden u.a. Dossey (2009) und Baxter et al. (2019) Anzeichen dafür, dass sich eine komplexere Gestaltung der Stallumwelt in einem geringen Angstverhalten von Legehennen und Broilern widerspiegelt.

3. Material und Methoden

3.1 Tiere

Bei den in dieser Studie genutzten Tieren handelte es sich um Legehennen der Hybrid-Linie „Lohmann Selected Leghorn“. Die Tiere stammten aus einer konventionellen Junghennenaufzucht und wurden in einem Alter von 18-19 Wochen in die Versuchstierhaltung eingestellt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere unter gleichen Bedingungen aufgezogen, gefüttert und nach dem gleichen Impfschema grundimmunisiert. Es wurden drei Versuchsdurchläufe durchgeführt (1. 30.04.-13.06.19, 2. 25.06.-08.08.2019, 3. 27.08.-10.10.2019). Vor dem Einstellen in die Versuchshaltung wurde jedes Tier allgemein untersucht, gewogen und mittels Farbring individuell markiert. Nach dem Einstellen folgte zunächst eine 14-tägige Adaptionsphase, in der die Tiere sich an die neue Umgebung, das Pflegepersonal und die täglichen Routineabläufe gewöhnen konnten.

3.2 Material

3.2.1 Tierunterbringung

Tabelle 1: Material zur Tierunterbringung

Stallinventar	Details und Hersteller
Legenest	Kunststoffnest, Breite: 33 cm, Höhe: 39 cm, Tiefe: 30 cm; MS Broedmachines, Ittervoort, Niederlande
Futtertrog	Junghennentrog, 100 cm lang, 20 cm breit; Stükerjürgen, Rietberg, Deutschland;
Wassertrog	OLBA Doppelmanteltränke für Geflügel - Geflügeltränke, Stülptränke, 6 l; OLBA, Coevorden, Niederlande
Futter	Tük-Tük Vollkorn Legepellet, 3,5 mm; Hobbersdorfer Mühle und Ströh Handelsgesellschaft mbH, Ratekau, Deutschland
Sitzstangen	Rundstab, Kiefer, Ø 35 mm; OBI-Baumarkt, Berlin, Deutschland
Einstreu	Hobelspäne; Peer-Span, Preetz, Deutschland

Gallilux-Meter	Hato Lighting Galli-Luxmeter, Hato Lighting, 6135 KK Sittard, Niederlande
Pickstein	Mineralstein, hart, 10 kg; Vilofoss, Haldensleben, Deutschland
Beschäftigungsmaterial	1. Mannapro Chicken Snackball, gelb; Mannapro, Chesterfield, USA 2. Poppy Pickspielzeug, Aufstellgröße 52 cm; Omlet Ltd, Vereinigtes Königreich 3. Futterrüben, an Seil/Kette frei hängend

3.2.2 Klicker-Training

Tabelle 2: Material für das Klicker-Training

Klicker-Untensilien	Details und Hersteller
Belohnungsfutter (Mischung 1:1)	1. Aggenstein Käse Emmentaler gerieben, 45% Fett; MEGGLE Cheese GmbH, Altusried, Deutschland 2. Versele-Laga Traditional - Zucht + Mauser Olympia Taubenfutter; Tiernahrung-Lindemeyer, Enger, Deutschland
Klicker	1. Kastenklickerl, 4 Pfotenland GmbH, Emmendingen, Deutschland 2. Esslöffel 3. leere Plastik-Schüssel, rund (z.B. vom Russich-Ei, Homann Feinkost GmbH, Dissen, Deutschland) 4. Duct Tape - Panzerband - Panzertape 4610, tesa SE, Norderstedt, Deutschland
Hocker	Polypropylen Tritthocker, 36.5 x 30 x 24 cm; ; keeper GmbH, Stemwede, Deutschland

3.2.3 Probenentnahme

Tabelle 3: Material zur Probenentnahme

Probenentnahme + Utensilien	Details und Hersteller
Blutprobe	
Wässriges Hautdesinfektionsmittel	octenisept, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Tupfer	Zelletten Tupfer 4x5 cm unsteril Rolle; Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Kanülen	Sterican Kanüle 0,70x30 mm, Gr. 12, 22 G x1¼; BRAUN, Melsungen, Deutschland
Blutröhrchen	Lithium-Heparin-Röhrchen, 4 ml; Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Speichelprobe	
Wattestäbchen	Kunststoff-Wattestäbchen, steril, zu 2 Stück verpackt; Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Deutschland
Probengefäß	1,5 ml; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
„Tupfer-Klemme“, selbstgebaut	1 ml-Pipettenspitze; Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Edelstahl-Laborschere	Spitz-stumpf, VWR, Darmstadt, Deutschland
Federprobe	
Probengefäß	50 ml-Röhrchen; Sarstaedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Edelstahl-Laborschere	Spitz-stumpf, VWR, Darmstadt, Deutschland

3.2.4 Probenaufbereitung

Tabelle 4: Material zur Probenaufbereitung

Probenaufbereitung + Utensilien	Details und Hersteller
Blutprobe - für Hämatokrit-Bestimmung	
Hämatokrit-Kapillaren	Na-Heparinisierte Hämatokrit-Kapillaren; SERVOPRAX, Wesel, Deutschland

Kit	Hämatokrit Wachsplatte; SERVOPRAX, Wesel, Deutschland
Zentrifuge	Haematokrit 20-Zentrifuge, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Blutprobe - für Differentialblutbild	
Pipettenspitzen	200 µl-Pipettenspitze; Sarstaedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipette	Research plus Einkanalpipette, 20-200 µl, für 200 µl-Pipettenspitzen; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Objektträger - Probenaufgabe	Microscope Slides, Cut Edges Frosted = 631-1551; VWR, Darmstadt, Deutschland
Objektträger - Probenausstrich	Microscope Slides, Cut Edges = 631-1550; VWR, Darmstadt, Deutschland
Fixierer	ROTISOLV, HPLC Gradient Grade Methanol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Färbelösung	Diff-Quick Färbe-Set, Medion Grifols Diagnostics AG, Düringen, Schweiz
Spülung	Deionisiertes Wasser (eigene Anlage)
Blutprobe - für Corticosteron-ELISA	
Zentrifuge	Megafuge 1.OR, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Probengefäß	1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	200 µl-Pipettenspitze; Sarstaedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipette	Research plus Einkanalpipette, 20-200 µl, für 200 µl-Pipettenspitzen; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Speichelprobe - für Corticosteron-ELISA	
Zentrifuge	Zentrifuge 5418; Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pinzette	Anatomisch; Hartmann; Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Federprobe - für Corticosteron-ELISA	
Mühle	Tissue Lyzer, Qiagen, Hilden, Deutschland
Mahlbecher	50 ml Edelstahl-Mahlbecher, 20 mm Edelstahlkugeln; Retsch, Haan, Deutschland
Waage	Feinwaage; Sartorius analytic, Göttingen, Deutschland
Probengefäß	10 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Alufolie	Labor-Aluminiumfolie; Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Deutschland
Pinsel	Pinsel Junior flach, goldfarbene Synthetikfaser Gr: 2; da vinci, Nürnberg, Deutschland

3.2.5 Corticosteron-Extraktion

Tabelle 5: Material zur Corticosteron-Extraktion

Probe + Extraktionsutensilien	Details und Hersteller
Plasma-Corticosteron	
Probengefäß	1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	200 µl-Pipettenspitze; Sarstaedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipette	Research plus Einkanalpipette, 20-200 µl, für 200 µl-Pipettenspitzen; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Diethylether	Diethylether ROTISOLV®, stabilisiert, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vortex-Gerät	Vortex-Genie K.550.GF; IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Verdampfer	Mitnutzung des selbstkonstruierten Stickstoffverdampfers im Institut für

	Pharmakologie und Toxikologie der Freien Universität Berlin, Koserstraße 20, 14195 Berlin
Puffer	1. Ethanol, absolute for analysis, EMSURE, ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland 2. verdünnter Extraktionspuffer, Teil des NEOGEN-ELISA-Kits; NEOGEN, Ayr, Schottland, Vereinigtes Königreich
Ständer	Reversible 96 well rack, R6151, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Speichel-Corticosteron (keine Extraktion sondern nur Verdünnung der Ausgangsprobe)	
Probengefäß	1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	200 µl-Pipettenspitze; Sarstaedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipette	Research plus Einkanalpipette, 20-200 µl, für 200 µl-Pipettenspitzen; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Puffer	EIA-Puffer, Teil des NEOGEN-ELISA-Kits; NEOGEN, Ayr, Schottland, Vereinigtes Königreich
Feder-Corticosteron	
Methanol	ROTISOLV, HPLC Gradient Grade Methanol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Probengefäße	2 ml, 10 ml und 50 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Probenständer	Ständer für Zentrifugenröhrchen 10 ml, 50 ml, neolab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ultraschallbad	Krankenhaus – Laborbedarf GmbH Victor Recker, Berlin, Deutschland
(Schüttel-/Schwenk-)wasserbad	Lauda-Gesellschaft für Laborgeräte (GFL), beheizbar; Burgwedel, Deutschland

Spritzen	3 ml und 10 ml Luer, Henry Schein, Berlin, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S 0,2 (Porengröße 0,2 µm), Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipette	Research plus Einkanalpipette, 20-200 µl und 100-1000 µl (für 200µl- bzw. 1000µl-Pipettenspitzen), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	200 µl- und 1000 µl-Pipettenspitze; Sarstaedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Vortex-Gerät	Vortex-Genie K.550.GF; IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Puffer	1. Ethanol, absolute for analysis, EMSURE, ACS, ISO, Reag. Ph Eur; Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland 2. verdünnter Extraktionspuffer, Teil des NEOGEN-ELISA-Kits; NEOGEN, Ayr, Schottland, Vereinigtes Königreich

3.2.6 Probenanalyse

Tabelle 6: Material zur Probenanalyse

Probenanalyse + Utensilien	Details und Hersteller
Blutprobe (Hämatokrit)	
Hämatokrit-Ableseschablone	Teil der Haematokrit 20-Zentrifuge, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Blutprobe (Differentialblutbild)	
Mikroskop	Type 020-518.500; DM/LS II/98, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland

Blut-, Speichel-, Federprobe (Corticosteron-ELISA)	
ELISA-Kit	402810 Corticosteron Kit, 96 well kit; Firma: NEOGEN, Ayr, Schottland, Vereinigtes Königreich
Pipetten	- Research plus Einkanalpipette, 20-200 µl und 100-1000 µl, für 200 µl- bzw. 1000 µl-Pipettenspitzen, Eppendorf, Hamburg, Deutschland - Multikanalpipette für 12 Spitzen, 100 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland - Multikanalpipette für 8 Spitzen, Transferpipette S 20-200 µl; VWR, Darmstadt, Deutschland - Pipetboy acu; IBS INTEGRA BIOSCIECES GmbH, Biebertal, Deutschland
Pipettenspitzen	- 200 µl- und 1000 µl-Pipettenspitzen, Eppendorf, Hamburg, Deutschland - 10 ml-Glaspipettenspitzen, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Salzsäure	CAS:7647-01-0; 1l, 1 N; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ELISA-Plattenreader und Auswertungssoftware	A) Microplate Absorbance Reader; SUNRISE, Art.Nr.:16039400, Including Software: Embedded Software V3.51; 37036 Microtitre plate reader, Crailsheim, Deutschland B) SW MAGELLAN V7.2 STD5PC XP VISTA WIN7/8; TECAN Austria GmbH, Grödig, Österreich

3.3 Methoden

3.3.1 Ethik-Statement

Der Versuchsaufbau wurde nach den Maßstäben des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von den örtlichen Behörden unter der Registriernummer G 0328/18 genehmigt.

3.3.2 Tierunterbringung

Nach dem Einstellen in die Versuchstierhaltung im Institut für Geflügelkrankheiten wurde den Tieren eine zweiwöchige Adaptationszeit gegeben. Die Tiere eines Versuchsdurchlaufes wurden jeweils zu siebend (7 Tiere je Trainingsgruppe und 7 Tiere je Kontrollgruppe) in Bodenhaltung gehalten. In ihren Stallabteilen mit einer Grundfläche von 4 m² und einer Höhe von drei Metern standen den Tieren Legenester, Beschäftigungsmaterial sowie Sitzstangen in zwei Ebenen zur Verfügung. Futter und Wasser wurde täglich kontrolliert bzw. gewechselt. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit einem standardisierten Legehennenfutter. Der Stall hatte Tageslicht und durch zusätzliche künstliche Lichtzufuhr wurde zudem die Photoperiode für alle drei Versuchsdurchgänge standardisiert und konstant gehalten. Mit Hilfe eines Gallilux-Meters wurde die Lichtintensität in der Hellphase auf 200 Gallilux eingestellt. Die Inaugenscheinnahme der Tiere wurde täglich durchgeführt. Auch die Kontrolle und Dokumentation der Stalltemperatur und der Luftfeuchtigkeit erfolgte täglich. Trainingsgruppe und Kontrollgruppe waren in benachbarten Stallbereichen untergebracht und hatten Sichtkontakt zueinander. An den Sitzstangen der Tiere wurden Milben-„Fallen“, bestehend aus 50 ml-Zentrifugenröhrchen, gefüllt mit gefaltetem Karton (= Rückzugsort für die Milben), zum frühzeitigen Erkennen des Vorhandenseins der roten Vogelmilbe angebracht. Für jede Gruppe erfolgte eine Kotuntersuchung hinsichtlich eines Befalls mit Darmparasiten.

3.3.3 Klicker-Training

3.3.3.1 Klicker-Belohnungs-Kombination

Der leere Plastik-Becher, der einen Durchmesser von 10 cm und eine Höhe von 4 cm aufwies, wurde mit Klebeband (Gaffa-Tape) auf der konvexen Seite der Laffe des Löffels befestigt. Am Löffelgriff wurde der Klicker ebenfalls mit Klebeband befestigt, wobei darauf geachtet wurde, das zur Betätigung des Klickers nötige „Klick-Blech“ freizulassen.

3.3.3.2 Gruppentraining

Die Trainingsperiode begann ab dem Tag 15 eines jeden Versuchsdurchlaufes, umfasste insgesamt 23 Tage (inkl. Wochenenden) und bestand aus einem die ersten 12 Trainingstage andauernden Gruppen- sowie einem sich ab Trainingstag 13 anschließenden Einzeltiertraining. Das Training der Einzeltiere wurde ausgesetzt, sobald diese Anzeichen fehlender Motivation zeigten. Oftmals genügte eine Unterbrechung von einer Stunde, um die Trainingsbereitschaft der Tiere wieder zu erhöhen bzw. wiederherzustellen.

Trainingstag 1 Die Volieren-Tür wurde geöffnet, die Voliere jedoch nicht betreten. Der Klicker wurde betätigt und zeitgleich Futter in die Voliere gestreut.

Trainingstag 2 Die Voliere wurde betreten, der Klicker betätigt und zeitgleich Futter in die Voliere gestreut.

Trainingstag 3 Die Voliere wurde betreten und zur weiteren Distanzreduzierung auf einem mitgeführten Hocker Platz genommen. Der Klicker wurde betätigt und zeitgleich Futter in die Voliere gestreut.

Trainingstag 4 Auf dem Hocker sitzend, wurde mit dem Ertönen des Klick-Geräusches das Futter nicht mehr verstreut, sondern den Tieren angereicht. Die Futter-Anreicherung erfolgte mit der zweiten Hand bzw. mit der Klicker-Belohnungs-Kombination.

Trainingstag 5 Das Training gestaltete sich zunächst wie an Tag 4 und sobald alle Tiere um den Trainer versammelt waren, wurden erste Berührungen forciert, in dem sich die leere Trainerhand so im Bereich der Hühner befand, dass jene sie regelmäßig beiläufig berührten. Diesen Tieren wurde dann mit dem „Click“-Geräusch Futter angereicht.

Trainingstag 6+7 Die Hühner wurden zunehmend aktiv berührt (Brust-, Flanken- und Rückenbereich).

Trainingstag 7+8 Ein zweiter Hocker wurden neben dem bereits vorhandenen Hocker platziert, sodass die Tiere auf diesen aufliegen konnten und somit die Distanz zwischen den Tieren und dem Trainer weiter reduziert wurde. Oftmals erfolgte von dort aus dann durch einige Tiere der Wechsel auf den Schoß des Trainers. Andere Tiere sprangen mit der Zeit direkt vom Boden auf den Trainer-Schoß. Jeder neue Schritt der Einzeltiere wurde belohnt.

Trainingstag 9-12 Ab der Tierzahl von 5, die auf den Trainer-Schoß sprangen, wurde ein rollbarer Behandlungstisch vor die Volieren-Tür geschoben, auf welchen sich der Trainer setzte. Die Tiere sprangen nun wieder auf dessen Schoß, überwandem hierfür nun jedoch eine größere Distanz. Sobald alle Tiere auf den Trainer-Schoß flogen, stellte sich dieser hinter den Tisch. Die Tiere flogen dem Trainer nun wieder entgegen und hierdurch automatisch direkt auf den Tisch. Am Ende der Trainingsphase flogen die Hühner auf den Tisch, egal wo im Raum er sich befand.

3.3.3.3 Einzeltiertraining

Trainingstag 13-16 Ein vertiefendes Training des Handlings sowie des Auf- und Absteigens der Tiere auf eine auf dem Tisch stehende Waage erfolgte daraufhin am Einzeltier. Zusätzlich erfolgte ein vertiefendes Training des gezielten Berührens, vor allem von Kopf und Kloakenbereich. Das Anheben der Tiere wurde durch Untergreifen der Brust und langsames Anheben trainiert.

Trainingstag 17-23 Die Hühner lernten, vom Tisch selbstständig auf die Hand des Trainers zu wechseln. Die Akzeptanz von durch den Trainer ausgeführten Drehbewegungen und der Proben-Entnahme (inklusive aller Einzelschritte, wie die Fixierung der Beine, seitliches Drehen der Tiere, Flügel-Positionierung, Flügel-Desinfektion, Heranführung der bunten Blutproben-Röhrchen, Berührung des Schnabels, Anwesenheit und Berührung durch zweite Person) durch die Tiere wurde dann bis zum Ende der Trainingsperiode trainiert und gefestigt.

3.4 Probenentnahme

3.4.1 Personenkonstellation während der jeweiligen Probenentnahme

Die Personenkonstellation für die jeweilige Probenentnahme wurde, soweit es möglich war, gleich gewählt und zeigt sich in Tabelle 7.

3.4.2 Probenart- und Entnahmezeitpunkt

3.4.2.1 Erste Probenentnahme

Insgesamt wurden jedem Tier drei Blutproben, drei Speichelproben und zweimal Federn entnommen.

Die erste Probenentnahme (Tabelle 7), bestehend aus einer Blut- und einer Speichelprobe erfolgte am Tag 14 des jeweiligen Versuchsdurchlaufes und somit nach der zweiwöchigen Eingewöhnungsphase und vor der am 15. Tag einsetzenden Trainingsperiode. Zudem wurden am Tag 14 neben der Blut- und Speichelprobe bei jedem Huhn im Interscapular-Bereich 7 Rückenfedern samt Kiel entfernt. An diesen Stellen sollten im Laufe der Trainingsphase neue Federn nachwachsen und das in dieser Zeit ausgeschüttete und im Kreislauf der Tiere zirkulierende Corticosteron einlagern. Im Rahmen dieser ersten Probenentnahme wurden alle Tiere der Trainings- und alle Tiere der Kontrollgruppe am gleichen Tag beprobt. Um die Zeit der Probenentnahme und eine damit möglicherweise einhergehende Aufregung in den benachbart eingestellten Gruppen möglichst kurz zu halten, wurde für diese Probenentnahme mit je einem Probenentnahme-Team pro Gruppe gearbeitet.

3.4.2.2 Zweite Probenentnahme

Die zweite Probenentnahme (Tabelle 7) erfolgte nach Abschluss der 23-tägigen Trainingsperiode und somit an dem Tag, an dem die Tiere der 10-minütigen Stresssituation einer Allgemeinuntersuchung ausgesetzt wurden. Dies geschah an sieben aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 38 bis 44 im Gesamt-Versuchszeitraum), jeweils um 14 Uhr, für je ein zufällig gewähltes Tier der Trainingsgruppe und sein Ringfarben-Pendant aus der Kontrollgruppe. Die zuvor trainierten Trainingsgruppentiere wurden gemäß des von ihnen erlernten Klicker-Programmes zur Probenentnahme geführt, während die Kontrolltiere aus

ihrem Stall herausgefangen werden mussten. Die zweite Probenentnahme bestand aus einer Blut- und einer Speichelprobe. An diese schloss sich das zehnminütige Handling einer Allgemeinuntersuchung auf dem Untersuchungstisch an.

3.4.2.3 Dritte Probenentnahme

Die dritte Probenentnahme (Tabelle 7) erfolgte am gleichen Tag wie die zweite, bestand ebenfalls aus einer Blut- und einer Speichelprobe und wurde den beiden jeweils an dem Tag beprobten Tieren direkt im Anschluss an das zehnminütige Handling entnommen.

3.4.2.4 Vierte Probenentnahme

Die vierte Probenentnahme (Tabelle 7) beinhaltete die nachgewachsenen Federn im Interscapular-Bereich, welche mit Hilfe einer Schere abgeschnitten wurden. Diese Gewinnung der Federproben geschah an Tag 50 und somit am letzten Tag des jeweiligen Versuchsdurchlaufes, nachdem mit dem zuvor durchgeführten zweiten New Area Test der letzte Verhaltenstest abgeschlossen war. Am darauffolgenden 51. Tag erfolgten die Ausstallung und die Abgabe der Tiere in private Haltungen.

Die vier Probenentnahmen und die Aufbereitung wurden in allen drei Versuchsdurchläufen nach dem gleichen Schema durchgeführt.

Tabelle 7: Probenentnahme-Übersicht

Probenentnahme	1		2		3		4	
Probenarten	Blut, Speichel, alte Interscapularfedern		Blut und Speichel		Blut und Speichel		nachgewachsene Interscapularfedern	
Entnahmezeitpunkt	Nach der 2-wöchigen Adaptionzeit		Nach 3-wöchigem Training der Trainingsgruppe; vor 10-minütigem Handling		Nach dem 10-minütigem Handling		Einen Tag vor der Ausstallung	
beprobte Tiere/Tag	Alle Tiere des Versuchsdurchganges		An 7 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils ein Tier der Trainingsgruppe und ein Tier der Kontrollgruppe				Alle Tiere des Versuchsdurchganges	
Tiergruppe	Trainingsgruppe	Kontrollgruppe	Trainingsgruppe	Kontrollgruppe	Trainingsgruppe	Kontrollgruppe	Trainingsgruppe	Kontrollgruppe

Proben- nehmer	Person A	Person B	Person B	Person B	Person B	Person B	Person C ¹	Person C ¹
Assistent	Person C ¹	Person D	Person C ¹	Person C ¹	Person C ¹	Person C ¹	-	-
Geplante Analyse	H:L-Ratio, Hämatokrit, Plasma- und Speichel- Corticosteron		Hämatokrit, Plasma- und Speichel- Corticosteron		H:L-Ratio, Hämatokrit, Plasma- und Speichel- Corticosteron		Feder- Corticosteron	

¹Person C war nach der ersten Probenentnahme die Person, die die Trainingsgruppentiere trainierte

3.4.3 Blutprobenentnahme

Die Entnahme der Blutprobe erfolgte nach Desinfektion der Einstichstelle über die V. ulnaris. Anschließend wurde das Probenröhrchen 10x invertiert und beschriftet. Zum Auffangen des Blutes und zur Gerinnungshemmung kamen 4 ml-Lithium-Heparin-Röhrchen zum Einsatz, die mit jeweils 3 ml Blut befüllt wurden.

3.4.4 Blutprobenaufbereitung

3.4.4.1 Aufbereitung für Hämatokrit-Bestimmung

Nach Entnahme der Blutprobe wurden zunächst pro Probe zwei Na-Heparinisierte Hämatokrit-Kapillaren mit Blut befüllt und diese anschließend zur Doppelbestimmung der Hämatokritwerte zentrifugiert. Vor Entnahme des Blutes aus dem Lithium-Heparin -Röhrchen wurde dieses 10x invertiert, um so eine gleichmäßige Verteilung aller Blutbestandteile sicherzustellen.

3.4.4.2 Aufbereitung für Differentialblutbild

Anschließend wurden aus jeder gewonnenen Blutprobe mit der *slide-to-slide*-Technik (Harrison und Lightfoot, 2006; Campbell und Ellis, 2007) zwei Blutaussstriche angefertigt. Hierzu wurde für jeden Ausstrich jeweils ein Blutropfen aus der zuvor erneut 10x invertierten Blutprobe entnommen und mittig auf einem der äußeren Drittel eines Objektträgers platziert. Daraufhin wurde ein zweiter Objektträger mit der kurzen Kante in einem spitzen Winkel (30-45°) auf dem ersten aufgesetzt und an den Blutropfen herangeführt. Infolgedessen wurde der Blutropfen an die Kante des Objektträgers herangezogen und verteilte sich daraufhin an dieser. Sofort im Anschluss wurde der zweite Objektträger bis zum Ende des ersten - also von einem äußeren Drittel zum anderen äußeren Drittel - geschoben und am Ende abgehoben. In der hierbei am Ende entstehenden „Bürste“ lagen die Blutzellen dann als Monolayer vor.

Erkennbar ist ein guter Monolayer bereits makroskopisch am getrockneten Ausstrich durch die im Gegenlicht erkennbaren Regenbogenfarben im Bereich der Bürste.

Nach dem Trocknen der Blutausstriche wurden diese mit Hilfe eines Diff-Quick-Färbesets in folgenden Schritten eingefärbt:

1. Eintauchen der Objektträger in Fixierlösung: 5 Sekunden
2. Eintauchen der Objektträger in Eosinlösung: 5 Sekunden
3. Eintauchen der Objektträger in Hämalaunlösung: 5 Sekunden
4. Abtropfen der Objektträger und anschließendes Spülen mit Aqua dest.
5. Lufttrocknung der gefärbten Blutausstriche

3.4.4.3 Aufbereitung für Corticosteron-ELISA

Der Rest der Blutprobe wurde anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 2000 g zentrifugiert und das dabei gewonnene Plasma zu je 150 µl in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Aliquots wurden anschließend bei -80°C eingefroren.

3.4.5 Speichelprobenentnahme und –aufbereitung

Die Speichelprobe wurde gewonnen, indem ein Wattestäbchen für eine Minute im Schnabel des jeweiligen Tieres, insbesondere im sublingualen Bereich und an den Wangeninnenseiten, entlang gerollt wurde. Anschließend wurde der Kopf des Wattestäbchens auf makroskopische Verunreinigungen überprüft, ggf. von diesen befreit und anschließend samt einer hierfür konstruierten Klemme (nach Nemeth et al. 2016) in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses Zentrifugenröhrchen mit dem in der Klemme fixierten und mit Speichel getränkten Tupferköpfen wurde im Anschluss an die Probennahme für 10 Minuten bei 11000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation fand sich am Boden des jeweiligen Röhrchens der herauszentrifugierte Speichel. Die Klemme konnte mit samt dem darin steckenden Tupfer-Kopf unter Zuhilfenahme einer Pinzette entfernt werden. Abschließend wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

3.4.6 Federprobenentnahme und –aufbereitung

Für die Federprobe wurden jedem Tier im Interscapular-Bereich die jeweils 7 nachgewachsenen Rückenfedern körpernah abgeschnitten. Anschließend wurden diese Federn auf grobe Verunreinigungen hin überprüft, nach dem durch Häffelin et al. (2020)

beschriebenem Muster gereinigt und entfettet und anschließend in einem beschrifteten 50 ml-Röhrchen bei -80°C eingefroren.

3.4.7 Probenanalyse

3.4.7.1 Hämatokrit

Die Bestimmung der Hämatokritwerte erfolgte mittels einer Ableseschablone nach der Zentrifugation der Hämatokrit-Röhrchen.

3.4.7.2 Gesamtleukozytenzahl, Differentialblutbilder und H:L-Ratio

Die Auszählung der Differentialblutbilder mit einhergehender Bestimmung der H:L-Ratio war nach der Bestimmung der Hämatokritwerte die zweite Datenerhebung aus den gesammelten Blutproben. Hierzu wurde jeder der angefertigten Blutausstriche zweimal ausgezählt, nachdem zuvor alle mit einem Blutausstrich versehenen Objektträger durch einen anderen Institutsmitarbeiter verblendet wurden. Im Anschluss an diese erste Doppelauszählung eines jeden Blutausstriches erfolgte eine erneute Verblendung und die zweimalige Auszählung der Blutausstriche wurde wiederholt. In Folge dieser Auszählung erhielt man so aus einer Blutprobe zwei Blutausstriche, von denen jeder viermal ausgezählt wurde. Somit erhielt man pro Blutprobe acht Werte zu Gesamtleukozytenzahl, prozentualer Zusammensetzung der einzelnen weißen Blutzell-Typen und somit auch zur H:L-Ratio. Zur Überprüfung der ermittelten H:L-Rations wurden in jedem Versuchsdurchlauf stichprobenartig 20 Ausstriche durch eine andere Person ausgezählt und die durch sie ermittelten Werte mit den zuvor erhobenen Werten abgeglichen.

Die Ermittlung der Gesamtleukozytenzahl erfolgte mikroskopisch unter Verwendung der 100er Ölimmersion und der Auszählmethode nach Campbell (1995). Hierzu wurden im Monolayerbereich des Blutausstriches in 20 Gesichtsfeldern alle Leukozyten gezählt und deren Gesamtwert mit dem Faktor 875 multipliziert. Anschließend wurde der hierbei erhaltene Wert mit folgender Formel weiter verrechnet, um schließlich die Gesamtleukozytenzahl/ μ l zu erhalten:

$$\text{Anzahl Zellen je } \mu\text{l} \times \frac{\text{aktueller Hämatokrit}}{45} = \text{korrigierte Gesamtleukozytenzahl}$$

Die Bestimmung der Anteile der einzelnen weißen Blutzelltypen an der Gesamtleukozytenzahl erfolgte ebenfalls unter dem Lichtmikroskop, bei 100er Ölimmersionsvergrößerung. Hierzu wurden 100 weiße Blutzellen ausgezählt und in folgende Typen differenziert: Heterophile, Eosinophile, und Basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Die Auszählung erfolgte ebenfalls im Monolayerbereich, mäanderförmig und je zur Hälfte in zwei unterschiedlichen Abschnitten des Ausstrichs.

Anschließend wurde mit folgender Formel die absolute Zellzahl $\times 10^9/l$ ermittelt:

$$\frac{\% \text{ Differentialblutbild} \times \text{Gesamtleukozytenzahl}}{100} = \text{absolute Zellzahl} \times 10^9/l$$

3.4.7.3 Corticosteron-ELISA

3.4.7.3.1 Spezifität bzw. Kreuzreaktivität des eingesetzten ELISA-Kits

Zur Ermittlung der Corticosteronwerte in den gesammelten Proben fand der Corticosteron-ELISA der Firma NEOGEN Verwendung.

Dieser zeigte nach Herstellerangaben folgende Spezifität bzw. Kreuzreaktivität:

Corticosteron: 100%, Deoxycorticosterone: 38%, 6-Hydroxycorticosterone: 19%, Progesteron: 5.1%, Tetrahydrocorticosteron: 2.7%, Prednisolon: 1.5%, Cortisol: 1.1%, Pregnenolon: 0.85%, 11-Epicorticosteron: 0.78%, Cortison: 0.27%, 21-Desoxycortisol: 0.27%, d-Aldosteron: 0.13%, Testosteron: 0.12%, 17 α -Hydroxyprogesteron: 0.12%, Prednison: 0.10%, Dexamethason: 0.03%, Cholesterol: < 0.01%, Östradiol: < 0.01% und Östriol: < 0.01%

3.4.7.3.2 Extraktion Plasmacorticosteron

Die Extraktion des Corticosterons aus dem Plasma erfolgte entsprechend den Herstellerangaben der Firma NEOGEN und wurde bei der Resuspension nach Freeman und Newman (2018) modifiziert.

So wurden zunächst 100 μ l Plasma in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 1 ml Diethylether versetzt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen 30 Sekunden lang gevortext und im Anschluss daran die Trennung der organischen und anorganischen Phase abgewartet. Die organische Phase wurde daraufhin in ein neues Zentrifugenröhrchen übertragen und der Diethylether unter einem N₂-Strom verdampft. Nach dem Verdampfen des Diethylethers wurde der verbliebene Rückstand in 100 μ l eines Gemisches aus 5% Ethanol und 95% verdünntem Extraktionspuffer resuspensiert. Der Extraktionspuffer ist Teil des ELISA-Kits der Firma NEOGEN und wird vor Gebrauch im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt.

3.4.7.3.3 Verdünnung Speichel-Probe

Das Corticosteron in den gewonnenen Speichelproben musste vor der Analyse mittels ELISA laut den Herstellerangaben NEOGENs nicht extrahiert werden. Da die Probenvolumina der einzelnen Speichelproben allerdings nicht für die vorgesehene Doppelbestimmung

ausreichen, wurde die sicher in jeder Probe vorhandene Menge von 25 µl entnommen und in einem neuen Zentrifugenröhrchen mittels Puffer auf ein Volumen von 125 µl aufgefüllt. Hierdurch konnte das notwendige Mindestvolumen von 100 µl (für 2x 50 µl im vorgesehenen Doppelansatz) erreicht und durch das Extravolumen von 25 µl ein problemloses Mischen und Aufziehen der Probe ohne Volumenverlust (z.B. durch rasche Blasenbildung des sehr viskösen Speichels) sichergestellt werden. Der dabei entstandene Verdünnungsgrad von 1:5 wurde in die spätere Konzentrationsbestimmung mit einbezogen.

3.4.7.3.4 Extraktion Federcorticosteron

Für die Extraktion des Corticosterons aus den Federproben wurde das Extraktionsverfahren von Bortolotti et. al. (2008) nach Angaben von Freeman und Newman (2018) und Häffelin et al. (2021) modifiziert.

Die Federn einer Probe wurden zunächst zu Federstaub zermahlen. Hierfür wurden diese zusammen mit einer Edelstahlkugel (Durchmesser 20 mm) in einen 50 ml Edelstahl-Mahlbecher gegeben, dieser mittels Kunststoff-Ringen (PTFE-Ringe) abgedichtet und anschließend der geschlossene Mahlbecher samt Kugel und Probe für 30 Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Anschluss an das Einfrieren wurden die Mahlbecher in einen Tissue Lyzer eingespannt und für zwei Minuten bei 25,0 Hz geschüttelt. Nach dem Mahlvorgang wurden die Mahlbecher unter warmem Wasser aufgetaut und der gewonnene Federstaub mit Kunststoffpinseln in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Zermahlen jeder Probe wurden die Mahlbecher, die Dichtungsringe und die Pinsel gründlich gereinigt. Vom erhaltenen Federstaub wurden 25 mg in ein neues 10 ml Zentrifugenröhrchen abgewogen, mit 5 ml HPLC Methanol versetzt und für 30 Minuten bei 24°C in einem Ultraschallbad inkubiert. Nach einer weiteren 12-stündigen Inkubation bei 50°C in einem Schüttelwasserbad wurde das Federstaub-Methanol-Gemisch mit Hilfe von 10 ml-Spritzen und Spritzenvorsatzfiltern gefiltert. Die Probengefäße, die das Federstaub-Methanol-Gemisch zuvor enthielten, wurden mit weiteren 2 ml HPLC Methanol gespült und dieser Spül-Rest daraufhin ebenfalls gefiltert und zu dem bereits gewonnenen Filtrat hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurde das Methanol mittels 7-8 stündiger Inkubation bei 50°C in einem Wasserbad verdampft. Der Verdunstungsrückstand wurde mit 1140 µl verdünntem Extraktionspuffer + 60 µl Ethanol resuspendiert und das erhaltene Gemisch für 4 Minuten gevortext. Daraufhin wurde die Probe noch einmal mit Hilfe eines neuen Spritzenvorsatzfilters gefiltert und das Filtrat mit darin enthaltenem Corticosteron in 2 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Anschließend folgte die Analyse mittels ELISA.

3.4.7.3.5 Durchführung Corticosteron-ELISA

Die Analyse aller Proben erfolgte im Doppelansatz und gemäß den Vorgaben des NEOGEN-Protokolls. Von jedem Tier wurden stets alle Plasma- bzw. alle Speichelproben sowie jeweils gleich viele (Plasma-/Speichel-/Feder-) Proben von Trainings- und Kontrollgruppentieren auf einer ELISA-Platte analysiert.

Teil eines jeden ELISA-Kits war die mitgelieferte Stammlösung mit einer Corticosteron-Konzentration von 1 µg / ml. Ausgehend von dieser als Standard A bezeichneten Lösung wurden unter Verwendung des EIA-Puffers (Teil des Kits) drei weitere Standards (B-D) mit Konzentrationen von 20 ng/ml, 2 ng/ml und 0,2 ng/ml hergestellt.

Anschließend wurde die Standardvorbereitung (S0 - S7) gemäß Tabelle 8 fortgesetzt:

Tabelle 8: Vorbereitung der Standardreihe nach der Vorgabe NEOGENS

Standard S	Coricosteron-Konzentration in ng / ml	EIA-Puffer in µl	Standard B in µl	Standard C in µl	Standard D in µl
S0	0	unverdünnt	-	-	-
S1	0.05	750	-	-	250
S2	0.1	500	-	-	500
S3	0.2	-	-	-	unverdünnt
S4	0.5	750	-	250	-
S5	1	500	-	500	-
S6	2	-	-	unverdünnt	-
S7	5	750	250	-	-

Im nächsten Schritt erfolgte die Verdünnung des mitgelieferten Corticosteron-Enzym-Konjugates. Hierzu wurde 1 µl Enzymkonjugat in 50 µl Gesamtvolumen des mitgelieferten EIA-Puffers für jedes Well hinzugefügt. Für die gesamte Platte bedeutete dies, 110 µl des Enzymkonjugats in ein Gesamtvolumen von 5,5 ml EIA-Puffer zu geben. Anschließend wurde diese Verdünnung gründlich gemischt.

Daraufhin wurden dann in jeweils zwei benachbarte Vertiefungen der ELISA-Platte je 50 µl des vorbereiteten Standards (Tabelle 8) und 50 µl des verdünnten Enzymkonjugates nach dem in Tabelle 9 dargestellten Schema hineingegeben.

Tabelle 9: Pipettierschema

(S0 bis S7 = Standardreihe; P1 bis P40= Proben, jeweils im Doppelansatz)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S0	S0	P1	P5	P9	P13	P17	P21	P25	P29	P33	P37
B	S1	S1	P1	P5	P9	P13	P17	P21	P25	P29	P33	P37

C	S2	S2	P2	P6	P10	P14	P18	P22	P26	P30	P34	P38
D	S3	S3	P2	P6	P10	P14	P18	P22	P26	P30	P34	P38
E	S4	S4	P3	P7	P11	P15	P19	P23	P27	P31	P35	P39
F	S5	S5	P3	P7	P11	P15	P19	P23	P27	P31	P35	P39
G	S6	S6	P4	P8	P12	P16	P20	P24	P28	P32	P36	P40
H	S7	S7	P4	P8	P12	P16	P20	P24	P28	P32	P36	P40

Nachdem die Standardreihe vorbereitet sowie in die vorgesehenen Wells pipettiert war, wurden anschließend auch die Proben im Doppelansatz von je 50 µl Probe + 50 µl verdünntem Enzymkonjugat in die jeweils dafür vorgesehenen Wells hineinpipettiert. Nachdem die Platte vollständig mit Standardreihe und Proben befüllt war, wurden die jeweils in einer Vertiefung zusammengebrachten Reagenzien durch leichtes Schütteln der Platte gemischt. Anschließend wurde die Platte mit einer Plattenabdeckung abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem leicht wippenden Plattenständer inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 20 ml des mitgelieferten, konzentrierten Waschpuffers mit 180 ml entionisiertem Wasser verdünnt und diese Verdünnung gründlich gemischt. Nach der Inkubation wurde der Inhalt der Platte gründlich entfernt und anschließend jede Vertiefung dreimal mit je 300 µl des verdünnten Waschpuffers gewaschen. Im Anschluss an den letzten Waschvorgang wurden in jede Vertiefung 150 µl Substrat gegeben und zur optimalen Verteilung des Substrates die Platte erneut gründlich aber vorsichtig geschüttelt. Nach Hinzugabe des Substrates wurden die Proben abermals für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Enzymreaktion gestoppt, indem in jede Vertiefung 75 µl einer 1 N HCL hinzugegeben wurden. Die Platte wurde erneut leicht geschüttelt und dann im Mikroplatten-Reader bei einer Messwellenlänge von 450 nm sowie einer Referenzwellenlänge von 620 nm im exakten Messmodus abgelesen. Laut der TECAN-Gebrauchsanweisung für den SUNRISE Absorbance Reader, wird bei diesem sehr genauen Messmodus der Plattenträger sehr langsam unter den Messdioden bewegt und die optische Dichte an drei Punkten jeder Vertiefung jeweils in 55-facher Wiederholung gemessen. Der automatisch aus allen Messungen je Vertiefung ermittelte durchschnittliche optische Dichtewert stellt dann die optische Dichte der jeweiligen Vertiefung dar.

3.4.7.3.6 Verifizierung des Corticosteron-ELISAs

3.4.7.3.6.1 Verifizierung

Bevor die Corticosteron-Konzentrationen in den eigentlichen Proben bestimmt wurden, erfolgte eine Verifizierung des NEOGEN-ELISAs anhand zufällig gewählter Plasma- und Federproben mittels Bestimmung der INTRA- und INTER-Assay-Präzision. Es wurden drei

Plasmaproben und vier Federproben analysiert. Eine Verifizierung hinsichtlich der Speichelproben wurde auf Grund der zu geringen Probenmengen nicht durchgeführt.

3.4.7.3.6.2 INTRA-Assay-Präzision

Für den INTRA-Assay erfolgte die Analyse der Proben im jeweils dreifach angelegten Doppelansatz. Aus den Corticosteron-Konzentrationen, die in den jeweiligen zwei Teilen eines jeden Doppelansatzes ermittelt wurden, wurde durch die Auswertungssoftware das arithmetische Mittel gebildet, was somit drei Werte zu jeder der Plasma- bzw. Federproben ergab.

3.4.7.3.6.3 INTER-Assay-Präzision

Es wurden zwei INTER-Assays im Verlauf eines Versuchstages (vormittags und nachmittags) durchgeführt. Für jeden der beiden INTER-Assays wurde jede der drei Plasma- bzw. vier Federproben in einem Doppelansatz pro Assay analysiert. Aus den ermittelten Corticosteron-Konzentrationen der jeweiligen zwei Teile eines Doppelansatzes wurde auch hier durch die Auswertungssoftware das arithmetische Mittel gebildet. Den so für jede Probe erhaltenen Wert zum INTER-Assay 1 und den zum INTER-Assay 2 ergänzte dann – als „INTER-Assay 3“ – zusätzlich noch der mittlere der drei Werte aus dem INTRA-Assay.

3.4.7.3.7 Vorversuch zur Messung des Feder-Corticosterons

In Vorbereitung der Analyse der eigentlich zu untersuchenden Federproben dieser Studie wurde zur Testung des ELISAs ein Vorversuch mit gemauserten Interscapular-Federn von Vorwerkhühnern aus einer Auslaufhaltung (12 Hennen, Haltung in Stall mit angrenzendem Auslauf) durchgeführt. Hierfür wurden die Federn aus dem Stall der Tiere gesammelt und für Extraktion sowie die anschließende Analyse in 5 Pools, bestehend aus jeweils 7 Federn aufgeteilt. Jeder Pool wurde im Doppelansatz getestet.

3.5 Verhaltenstests

3.5.1 New Area Test 1

Zur Beurteilung der Adaptionfähigkeit der trainierten und untrainierten Tiere an eine neue Situation bzw. zur Einschätzung ihrer Resilienz-Fähigkeit wurden alle Tiere nach ihrer jeweiligen dritten Blut- und Speichelprobenentnahme (für je ein Tier aus Trainings- bzw. Kontrollgruppe an den Tagen Tag 38 bis 44) für einen Zeitraum von 5 Minuten auf den Flur vor den Stallraum gesetzt und gefilmt. Später wurden diese Videosequenzen codiert und von zwei Institutsmitarbeiterinnen randomisiert ausgewertet. Die Auswertung erfolgte im Hinblick auf die im Beobachtungszeitraum zurückgelegte Wegstrecke in Tierlängen, dem gezeigten Pick-Verhalten sowie dem axialen Körperschütteln als ein „Verhalten der Neuordnung“ (Tabelle 10).

Aus den Beobachtungen der beiden Institutsmitarbeiterinnen zu jedem Parameter wurde im Anschluss der Mittelwert gebildet.

Tabelle 10: Definitionen des beobachteten Verhaltens im New Area Test 1+2

Gezeigtes Verhalten	Ein Verhalten ist gleich:
Fortbewegung	→ die Fortbewegung des Huhnes um eine Körperlänge
Picken	→ eine „Pick-Aktion“
„Verhalten der Neuordnung“ = axiales Schütteln	→ eine axiale Schüttel-Bewegung raus und wieder zurück in die Ausgangsposition („hin und her“)

3.5.2 New Area Test 2

Im zweiten New Area Test wurden die gleichen Parameter wie im New Area Test 1 beurteilt, nur mit dem Unterschied, dass die Tiere nicht aus einer stressigen Situation heraus, sondern aus der Ruhe heraus in einen für sie unbekanntem Raum gesetzt wurden. Bei diesem Raum handelte es sich diesmal nicht um den Flur vor dem Stallraum, sondern um einen anderen Stallraum auf der anderen Seite des Flures. Der New Area Test 2 fand für alle Tiere eines Versuchsdurchlaufes am 50. Tag und somit am letzten Tag vor der Ausstellung statt.

3.5.3 Kotbeurteilung

Zusätzlich zu den Verhaltensparametern, wurden auch die von den Tieren in beiden New Area Tests abgesetzten Kothaufen nach Anzahl und Konsistenz beurteilt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Kotparameter und die Art ihrer Bewertung

Kotparameter	Art der Bewertung
Anzahl der Kothaufen	Ordinal: 0-3
Kotkonsistenz	Nominal: 1= gut geformt, mit klar voneinander getrenntem Harnsäure- und Kotteil; 2= leicht breiig, d.h. keine klare Trennung der Komponenten; 3= breiig, deutlich erhöhter bis separater Flüssigkeitsanteil, übelriechend)

3.5.4 New Object Test

Beim New Object Test wurde jeder Trainings- und jeder Kontrollgruppe am vorletzten Versuchstag (Tag 49) eine rote Blechdose mittig in den Futtertrog gestellt. Zusammen mit diesem - für die Tiere neuartigen - Objekt wurde zeitgleich das sowohl den Trainingsgruppentieren, als auch den Kontrollgruppentieren bekannte Belohnungsfutter aus dem Klicker-Training mit in den Trog gegeben. Im Anschluss daran wurde im Abstand von 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Sekunden erfasst, wie viele Tiere der jeweiligen Gruppe sich am Trog aufhielten und welche Entfernung vom neuen Objekt die am Trog befindlichen Tiere als Fressplatz bevorzugten. Hilfreich war hierbei, dass der Futtertrog über ein übergestülptes Futtergitter verfügte, welches diesen in 14 gleichgroße Kompartimente unterteilte. Hierdurch wurde eine Positionserfassung eines jeden Tieres zu jedem der einzelnen Beobachtungsmomente ermöglicht. Die New Object Tests eines jeden Versuchsdurchlaufes wurden gefilmt und die Videos anschließend von zwei unabhängigen Personen begutachtet. Gab es zu einzelnen Zeitpunkten in der späteren Auswertung unterschiedliche Beobachtungen hinsichtlich der Tierpositionen, so wurde die entsprechende Videosequenz von beiden Personen zusammen erneut betrachtet und gemeinsam die zu diesem Zeitpunkt aktuelle Position eines jeden Tieres erfasst. Damit auch die Kontrollgruppentiere die gleiche Motivation hatten, sich nach Positionierung des neuen Objektes an den Trog zu begeben, wurde ihnen während des ganzen Versuchszeitraumes auch immer ein wenig des begehrten Belohnungsfutters in den Trog getreut. So wussten die Tiere der Kontrollgruppe - gleich denen der Trainingsgruppe – ebenfalls vom guten Geschmack des Belohnungsfutters.

3.6 Statistische Auswertung

Die weitere Auswertung der erhaltenen Ergebnisse aus den in dieser Studie durchgeführten Tierversuchen erfolgte mit Hilfe von SPSS 25, dem Statistik-Programm von IBM Statistics. Zunächst erfolgte eine Testung auf Normalverteilung, indem diese sowohl analytisch mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests, als auch graphisch anhand der Q-Q-Plots überprüft wurde. Konnte bei bestimmten Datenreihen keine Normalverteilung festgestellt werden, so wurden deren Werte für die Analyse logarithmiert und erneut auf Normalverteilung getestet. Dies ist für Corticosteron bereits etabliert (Kobayashi und Miyazaki 2015) und wurde daher für alle in dieser Studie ermittelten Corticosteron-Werte und ferner auch für die Werte der H:L-Ratio angewandt. Konnte für die Daten eines Parameters die Normalverteilung bestätigt werden, so erfolgte die weitere Analyse mittels unabhängigem t-Test. Zeigten die Werte auch nach einer Logarithmierung keine Normalverteilung, so wurde zu deren weiterer Analyse der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Sowohl für den unabhängigen T-Test als auch für den Mann-Whitney-U-Test wurde als Signifikanz-Niveau $p < 0,05$ festgelegt.

Die Erstellung von Abbildungen sowie die Ermittlung der Variationskoeffizienten aus den Ergebnissen der Verifizierung erfolgte mit Microsoft Excel.

3.7 Erfassung der Ei-Gewichte

Als zusätzlicher Parameter wurde aus den Gewichten der jeweils 50 letzten je Gruppe und Versuchsdurchgang gelegten Eier das durchschnittliche Ei-Gewicht für die Gesamtheit aller Trainings- bzw. Kontrollgruppentiere ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Klicker-Training

4.1.1 Gruppentraining

Im ersten Abschnitt des Klicker-Trainings sorgte ein Zusammenspiel unterschiedlicher Aspekte, wie z.B. Unterschiede in der individuellen Lern-Geschwindigkeit, der einzelnen Tiercharaktere oder die jeweilige Hierarchie-Stufe des Einzeltieres dafür, dass die Tiere in ihrem Trainingsfortschritt variierten. In diesen Momenten wurde es nötig, z.B. ranghohe, schnell lernende Tiere auf die Stallgasse (= Bereich vor den Volieren) hinauszulassen. Waren diese dort durch bereitgestelltes Futter beschäftigt, konnten die verbliebenen Tiere ihren Trainingsrückstand wieder aufholen.

In anderen Momenten, wie z.B. dem Auffliegen auf den zweiten Hocker, den Trainer-Schoß oder den Behandlungstisch, war es hingegen hilfreich, einzelne Tiere mit hoher Trainingsbereitschaft als „Vorbild“ in der Gruppe zu belassen und durch ihre Trainingserfolge die anderen Tiere der Gruppe zum Nachahmen zu motivieren.

Zögerten dennoch hin und wieder einzelne Tiere, bestimmte Trainingsschritte zu absolvieren, so konnte das Trainingsziel durch Eingliederung von Zwischenschritten erreicht werden. So zeigten z.B. manche Tiere größere Scheu davor, die lange Distanz vom Stallboden auf den Behandlungstisch durch Herauffliegen zu überwinden. Diesen Tieren konnte daraufhin das Auffliegen auf den Behandlungstisch durch einen bereitgestellten Hocker als Zwischenstufe erleichtert werden.

4.1.2 Einzeltiertraining

Beim individuellen Training der Einzelschritte, die für das Handling während der Probenentnahme wichtig waren, zeigten sich besonders Parameter, wie die Körperspannung des jeweiligen Einzeltieres oder auch das Fehlen von „Rettungsversuchen“, welche sich z.B. durch Umgreifen der Trainerhand / des Trainerarmes mit den Krallen oder dem Herunterfliegen vom Behandlungstisch zeigen konnten, als wichtige Kriterien, um einen aktuell trainierten Einzelschritt als erfolgreich absolviert anzuerkennen. Versuchte ein Tier zum Beispiel nicht mehr, die Trainerhand oder den das Belohnungsfutter beinhaltenden Becher zu umgreifen und ließ stattdessen, wie in Abbildung 1 erkennbar, seine Füße ohne jegliche Anspannung nach unten hängen, so galt der Trainingsschritt als erfolgreich abgeschlossen.



Abbildung 1: Einzeltraining auf der Hand; keine Anzeichen von Anspannung oder Abwehr

Auch in der in Abbildung 2 erkennbaren Situation, in der das Huhn in die für die Entnahme der Blutprobe notwendige seitliche Position gebracht wird, lässt sich gut erkennen, dass es dem Trainer problemlos möglich ist, den herunterhängenden Flügel ohne Gegenwehr des Tieres aufzufächern. Weiterhin zeigen die nicht weit auseinandergespreizten Zehen sowie der locker getragene Hals- und Kopfbereich des Tieres - mit dem dieses auch keinen Versuch unternimmt, den Unterarm des Trainers zu umgreifen und sich so zurück in die aufrechte Position zu bringen - dass die entsprechende Situation gut trainiert und vom Tier akzeptiert wurde.



Abbildung 2: Einzeltraining auf der Hand; Positionierung für Blutprobenentnahme

Im Rahmen des Einzeltiertrainings zum Handling in der Allgemeinuntersuchung zeigte sich ein erfolgreich trainiertes Tier als dem Trainer stets zugewandt und ohne Ambition, den Behandlungstisch durch davonfliegen/herunterspringen zu verlassen (Abbildung 3 und 4).



Abbildung 3: Huhn auf der Waage



Abbildung 4: Handling im Rahmen der Allgemeinuntersuchung

Da für die Gewinnung der Blut- und Speichelproben eine zweite Person unabdingbar war, stand diese an den letzten beiden Trainingstagen während des Trainings in unmittelbaren Nähe des Trainers, um so das Tier auch an diese Situation und letztendlich auch an Manipulationen durch diese Person, z.B. im Bereich der Flügelvene, zu gewöhnen. In Abbildung 5 zeigt sich der Moment der Blutprobenentnahme: Die Zehen des Tieres zeigen sich als nicht gespreizt und entspannt, der Flügel des Tieres lässt sich leicht und ohne ein Zurückziehen des Tieres fächern. Durch die Kanüle

fließt das Blut aus der V. ulnaris in das Probenröhrchen und zeitgleich frisst das Huhn vom angereicherten Belohnungsfutter.



Abbildung 5: Blutprobenentnahme

4.1.3 Tier-Charaktere

Neben der Gruppenhierarchie, die vor allem auch während der ersten Phase des Trainings eine Rolle spielen konnte (Abdrängen rangniedrigerer Tiere aus dem Trainingsumfeld durch ranghöhere Tiere), wurden vor allem im Einzeltiertraining die Unterschiede der jeweiligen Tier-Charaktere deutlich, auf Grund derer bisweilen eine Anpassung des Trainingsprogrammes notwendig wurde (Tabelle 12).

Tabelle 12: Tier-Charaktere und deren Einfluss auf das Klicker-Training

Tier-Charakter	Beschreibung + Auswirkung auf Klicker-Training	Häufigkeit
Typ 1 (mutig + aktiv)	Nach Gewöhnung an den Klicker und den Trainer kontinuierliches Training möglich. Schnelles Erlernen von Aktionen, wie z.B. „auf den Tisch fliegen“ oder „auf die Hand Steigen“. Hohes Maß an Eigeninitiative durch das Tier. Oftmals kurze Irritation des Tieres bei Berührung oder Manipulation durch den Trainer.	Häufig (9 von 21 Tieren)
Typ 2 (mutig + akzeptierend)	Nach Gewöhnung an den Klicker und den Trainer kontinuierliches Training möglich. Schnelle Lernerfolge im Hinblick auf die Akzeptanz von Berührung oder	Häufig

	Manipulation durch den Trainer. Weniger Eigeninitiative im Hinblick auf Aktionen, nach Motivation durch Trainer auch Wille zu Aktionen.	(8 von 21 Tieren)
Typ 3 (ängstlich + aktiv)	Training oftmals diskontinuierlich und geprägt von stetiger Ambition des Tieres, am Training teilzunehmen und häufigen, abrupten Trainings-Abbrüchen bzw. Rückschlägen nach Flucht des Tieres aus der Trainingssituation.	selten (3 von 21 Tieren)
Typ 4 (ängstlich)	Wenn überhaupt Training möglich, dann sehr diskontinuierlich und lückenhaft. Meist bereits während der ersten Trainingsschritte (z.B. Aufliegen auf Tisch) Flucht des Tieres aus der Situation. Generell großer Abstand zum Trainer.	sehr selten (1 von 21 Tieren)

4.2 Hämatokrit und H:L-Ratio

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse aus der H:L-Ratio-Ermittlung wurden die jeweils acht pro Tier und Probe bestimmten Werte zunächst logarithmiert und anschließend für jedes Tier und jede gewonnene Probe der Mittelwert gebildet. Im sich daraufhin anschließenden Shapiro-Wilk-Test war sowohl für die Werte der ersten Probenentnahme als auch für die der dritten Probenentnahme eine Normalverteilung feststellbar, was auch durch die Bewertung der Q-Q-Plots bestätigt wurde (Tabelle 13). Im sich daraufhin anschließenden t-Test für unabhängige Stichproben zeigte sich sowohl in Probe 1 als auch in Probe 3 ein signifikanter Gruppenunterschied (Tabelle 14). Da die Tiere beider Gruppen bis zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme allerdings noch identisch behandelt wurden, erfolgte die Gegenüberstellung beider Gruppen für diesen Parameter nicht anhand ihrer zum jeweiligen Messzeitpunkt bestehenden H:L-Ratios, sondern anhand der Differenzen zwischen der H:L-Ratio in Probe 1 und der H:L-Ratio in Probe 3, um so den bereits zum Anfang bestehenden Gruppenunterschied mit zu berücksichtigen. Hierzu wurde zunächst für jedes Tier der Trainings- bzw. Kontrollgruppe die Differenz zwischen Probe 1 und Probe 3 ermittelt und diese so ermittelten Werte anschließend durch Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests und der Q-Q-Plots als normalverteilt eingestuft (Tabelle 13). Auch die Werte des in allen drei gewonnenen Blutproben bestimmten Hämatokrits zeigten sich sowohl nach Beurteilung der Q-Q-Plots als auch im Hinblick auf die Signifikanz im Shapiro-Wilk-Test als normalverteilt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Test auf Normalverteilung für die hämatologischen Parameter

Parameter	Shapiro-Wilk-Test		Q-Q-Plots
	Normalverteilung	Signifikanz	Normalverteilung
H:L-Ratio			
Probe 1 ¹	ja	0,638	ja
Probe 3 ³	ja	0,697	ja
Differenz zwischen Probe 1 ¹ und Probe 3 ³	ja	0,483	ja
Hämatokrit			
Probe 1 ¹	ja	0,343	ja
Probe 2 ²	ja	0,430	ja
Probe 3 ³	ja	0,134	ja

¹Probe 1= Probe entnommen NACH der zweiwöchigen Eingewöhnungsphase und VOR Beginn des Klicker-Trainings (Baseline); ²Probe 2= Probe entnommen NACH der dreiwöchigen Trainingsphase und VOR dem zehnminütigen Handling; ³Probe 3= Probe entnommen NACH dem zehnminütigen Handling

In Auswertung des daraufhin durchgeführten t-Tests für unabhängige Stichproben, zeigten sich weder bei der H:L-Ratio-Differenz (Tabelle 14 und Abbildung 6), noch beim Hämatokrit (Tabelle 15 und Abbildung 7) im p-Wert signifikante Gruppenunterschiede.

Tabelle 14: Gruppenvergleich anhand der H:L-Ratio

H:L-Ratio								
	Individuenzahl N		Mittelwert (logarithmierte Werte)		Median		t-Test für unabhängige Stichproben	
	T ⁴	K ⁵	T ⁴	K ⁵	T ⁴	K ⁵	Signifikanz p	Cohen's d
Probe 1	21	21	-0,61	-0,49	0,25	0,32	0,032	-0,687
Probe 3	21	21	-0,41	-0,29	0,37	0,51	0,044	-0,643
Differenz Δ zwischen Probe 1 ¹ und Probe 3 ²	21	21	-0,20	-0,20	-0,11	-0,21	0,995	0,002

¹Probe 1= Probe entnommen NACH der zweiwöchigen Eingewöhnungsphase und VOR Beginn des Klicker-Trainings (Baseline); ²Probe 3= Probe entnommen NACH dem zehnminütigen Handling; ⁴T= Trainingsgruppe; ⁵K= Kontrollgruppe

Tabelle 15: Gruppenvergleich anhand des Hämatokrits

Hämatokrit in %								
Probe	Individuenzahl N		Mittelwerte		Median		t-Test für unabhängige Stichproben	
	T ⁴	K ⁵	T ⁴	K ⁵	T ⁴	K ⁵	Signifikanz p	Cohen's d
Probe 1 ¹	21	21	30,95	31,95	31	33	0,299	-0,324
Probe 2 ²	21	21	29,76	28,86	30	29	0,180	0,419
Probe 3 ³	21	21	28,71	28,19	29	28	0,293	0,326

¹Probe 1= Probe entnommen NACH der zweiwöchigen Eingewöhnungsphase und VOR Beginn des Klicker-Trainings (Baseline); ²Probe 2= Probe entnommen NACH der dreiwöchigen Trainingsphase und VOR dem zehnminütigen Handling; ³Probe 3= Probe entnommen NACH dem zehnminütigen Handling; ⁴T= Trainingsgruppe; ⁵K= Kontrollgruppe

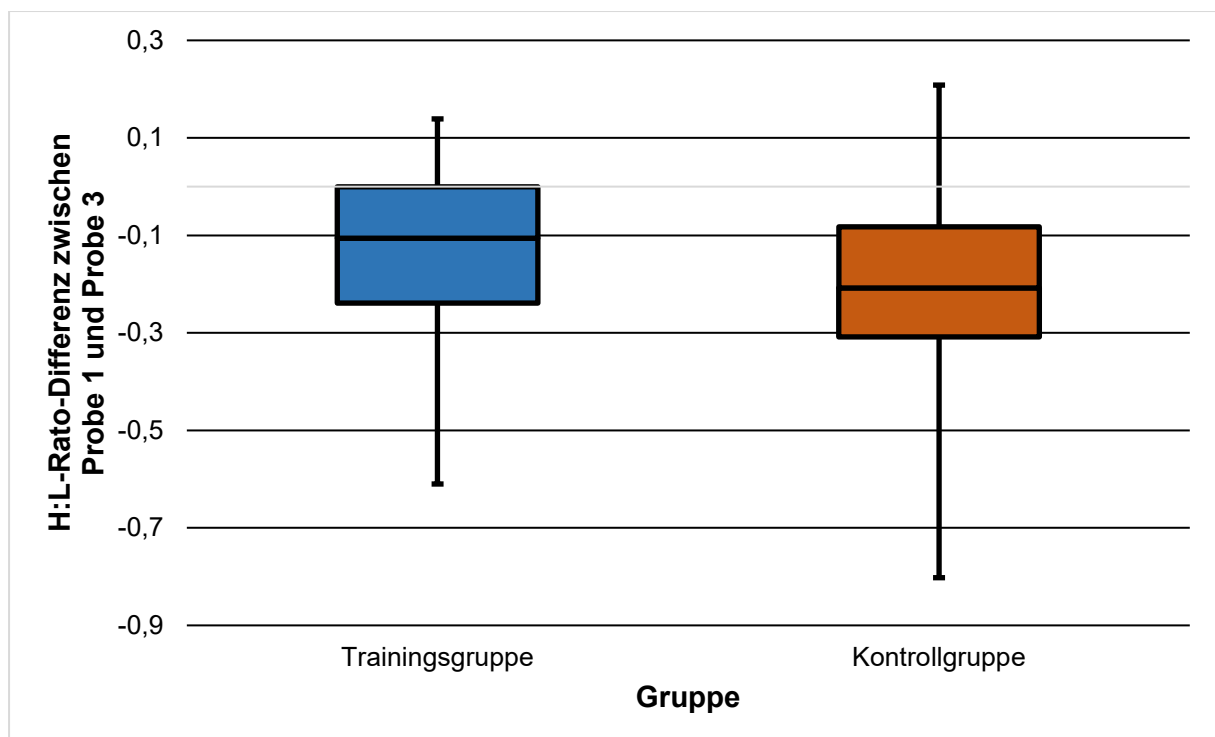


Abbildung 6: Gruppenvergleich anhand der H:L-Ratio-Differenz zwischen Probe 1 und 3

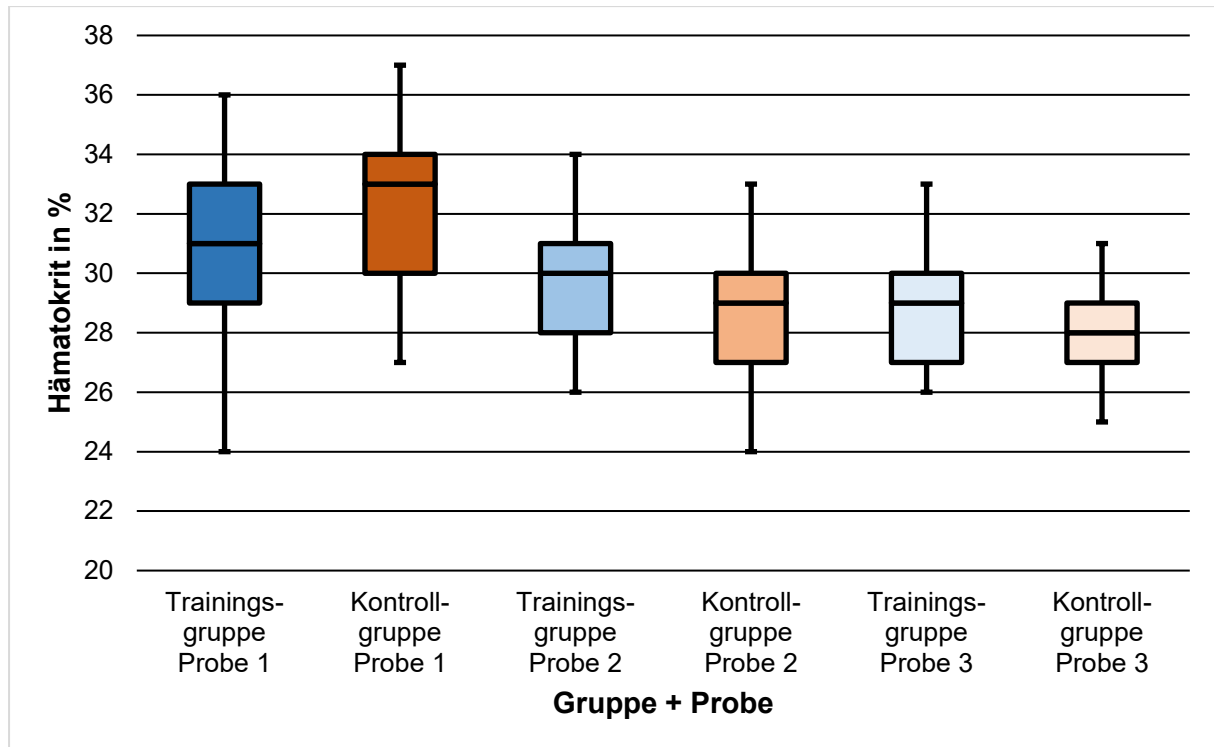


Abbildung 7: Gruppenvergleich anhand des Hämatokrits

4.3 Corticosteron-ELISA

4.3.1 Verifizierung Corticosteron-ELISA

Im Ergebnis des INTRA-Assays ergab sich ein Variationskoeffizient, der im geometrischen Mittel für die drei Plasma-Proben 15,3% und für die vier Federproben 12,9% betrug. Die Konzentrationen aller zu jeder Probe angefertigten Doppelansätze finden sich in Tabelle 16.

Tabelle 16: Verifizierung, INTRA-Assay, Corticosteron-Konzentration in ng/ml

Doppelansatz ¹	Plasma 1	Plasma 2	Plasma 3	Feder 1	Feder 2	Feder 3	Feder 4
1	1,895	0,827	0,378	0,163	0,346	0,257	0,303
2	2,249	0,636	0,391	0,231	0,233	0,262	0,277
3	1,972	0,585	0,261	0,181	0,232	0,289	0,336
Mittelwert²	2,039	0,683	0,343	0,192	0,270	0,269	0,305

¹Doppelansatz= drei Doppelansätze pro Probe; die abgebildeten Werte einer Probe sind jeweils der Mittelwert aus den zwei Teilen eines Doppelansatzes; ²Mittelwert= Mittelwert aus Doppelansatz 1-3

Der im INTER-Assay ermittelte Variationskoeffizient ergab im geometrischen Mittel für die Plasma-Proben 17,5%, für die Feder-Proben 29,7%. Die Konzentrationen aller zu jeder Probe angefertigten Doppelansätze finden sich in Tabelle 17.

Tabelle 17: Verifizierung, INTER-Assays, Corticosteron-Konzentration in ng/ml

Doppelansatz ¹	Plasma 1	Plasma 2	Plasma 3	Feder 1	Feder 2	Feder 3	Feder 4
INTER-Assay 1	1,91	0,69	0,383	0,299	0,318	0,46	0,402
INTER-Assay 2	1,41	0,522	0,284	0,203	0,174	0,174	0,249
Doppelansatz 2 aus INTRA- Assay	2,249	0,636	0,391	0,231	0,233	0,262	0,277
Mittelwert ²	2,039	0,683	0,343	0,192	0,270	0,269	0,305

¹Doppelansatz= ein Doppelansatz pro INTER-Assay; die abgebildeten Werte einer Probe sind jeweils der Mittelwert aus beiden Teilen eines Doppelansatzes; ²Mittelwert= Mittelwert aus Doppelansatz 1-3

4.3.2 Vorversuch: Feder-Corticosteron bei Hühnern aus Auslaufhaltung

Die im Vorversuch ermittelten Corticosteron-Konzentrationen in den Federn von in einer Auslaufhaltung untergebrachten Gruppe von 12 Vorwerkhühnern lagen in einem Bereich zwischen 44 und 81 pg/mg (Tabelle 18).

Tabelle 18: Feder-Corticosteronkonzentrationen aus Poolproben im Vorversuch

Corticosteron-Konzentration in Federproben von Hühnern aus Auslaufhaltung					
Pool	1	2	3	4	5
Konzentration je Poolprobe	44 pg/mg	67 pg/mg	90 pg/mg	57 pg/mg	81 pg/mg
Mittelwert aus Pool 1 bis 5	67,8 pg/mg				

4.3.3 Corticosteron-Konzentrationen in Plasma-, Feder- und Speichelproben

Die logarithmierten Werte zum Plasma- und zum Federcorticosteron zeigten sich in Auswertung des Shapiro-Wilk-Tests und der Q-Q-Plots als normalverteilt. Bei den logarithmierten Werten des Speichel-Corticosterons sprachen die Testungen hingegen nicht für eine Normalverteilung (Tabelle 19). Grund hierfür ist, dass in fünf der analysierten Proben die Corticosteron-Konzentration so gering war, dass diese entweder in einem (1x Probe 1 in Kontrollgruppe und 2x Probe 2 in Trainingsgruppe) oder gar in beiden Teilen (1x Probe 1 in Kontrollgruppe und 1x Probe 3 in Trainingsgruppe) des Doppelansatzes unter der Nachweisgrenze lag. In diesen Fällen wurde für die fehlenden Werte eine Minimalkonzentration von 0,001 ng/ml angenommen. Eine Messwiederholung dieser Proben war auf Grund der sehr geringen Probenmenge beim Speichel nicht durchführbar.

Tabelle 19: Test der Plasma-, Feder- und Speichel-Corticosteronwerte auf Normalverteilung

Parameter + Probe	Shapiro-Wilk-Test		Q-Q-Plots
	Normalverteilung	Signifikanz	Normalverteilung
Plasma-Corticosteron			
Probe 1 ¹	ja	0,447	ja
Probe 2 ²	ja	0,518	ja
Probe 3 ³	ja	0,435	ja
Feder-Corticosteron			
Probe 4 ⁴	ja	0,392	ja
Speichel-Corticosteron			
Probe 1 ¹	nein	<0,001	nein
Probe 2 ²	nein	0,019	nein
Probe 3 ³	nein	<0,001	nein

¹Probe 1= Probe entnommen NACH der zweiwöchigen Eingewöhnung und VOR Beginn des Klicker-Trainings (Baseline); ²Probe 2= Probe entnommen NACH dem dreiwöchigen Training und VOR dem zehnminütigen Handling; ³Probe 3= Probe entnommen NACH dem zehnminütigen Handling; ⁴Probe 4= Probe am Ende des Versuches entnommen; nachgewachsene Federn im Interscapular-Bereich

Vier weitere Speichelproben (1.: Probe 1 eines Kontrollgruppentieres; 2.-4.: Probe 1-3 eines Trainingsgruppentieres) wurden auf Grund eines technischen Fehlers während der Probenanalyse von der Auswertung ausgeschlossen.

Resultierend aus den Ergebnissen der Testung auf Normalverteilung, erfolgte die weitere Analyse der Werte zu Plasma- und Feder-Corticosteron mittels unabhängigem t-Test. Die weitere Auswertung der Daten zum Speichel-Corticosteron erfolgte hingegen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (Tabelle 20).

Die Werte zum Plasma-Corticosteron zeigten nur in der ersten Probe Unterschiede zwischen den Gruppen, die im p-Wert auch signifikant waren. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich hingegen in Probe 2 bzw. Probe 3 (Tabelle 20, Abbildung 8). Die Konzentrationen des Feder-Corticosterons in den nachgewachsenen Interscapular-Federn waren in beiden Gruppen im Mittelwert nahezu gleich (Tabelle 20, Abbildung 9). Im Vergleich der Gruppen anhand ihrer Speichelproben zeigte sich in Probe 2 ein im p-Wert signifikanter Unterschied (Tabelle 20, Abbildung 10).

Tabelle 20: Gruppenvergleich anhand der Corticosteron-Konzentration

Corticosteron-Konzentrationen								
Probe	Individuenzahl N		Mittelwert (logarithmierte Werte)		Median		t-Test für unabhängige Stichproben	
	T ⁵	K ⁶	T ⁵	K ⁶	T ⁵	K ⁶	Signifikanz p	Cohen's d
Plasma-Corticosteron ng/ml								
Probe 1 ¹	21	21	0,47	0,30	3,19	1,94	0,042	0,650
Probe 2 ²	21	21	0,18	0,26	1,66	1,82	0,297	-0,326
Probe 3 ³	21	21	0,39	0,41	2,45	2,38	0,748	-0,100
Feder-Corticosteron pg/mg								
Probe 4 ⁴	21	21	0,99	0,97	10,37	8,78	0,808	0,076
Speichel-Corticosteron ng/ml								
Probe	Individuen-zahl N		Mittelwert (logarithmierte Werte)		Median		Mann-Whitney-U-Test	
	T ⁵	K ⁶	T ⁵	K ⁶	T ⁵	K ⁶	Signifikanz p	Effekt- stärke r
Probe 1 ¹	20	20	-0,06	-0,30	1,22	0,71	0,379	0,139
Probe 2 ²	20	21	-0,21	0,09	0,83	1,32	0,023	0,354
Probe 3 ³	20	21	-0,20	0,01	0,92	1,04	0,285	0,167

¹Probe 1= Probe entnommen NACH der zweiwöchigen Eingewöhnungsphase und VOR Beginn des Klicker-Trainings (Baseline); ²Probe 2= Probe entnommen NACH der dreiwöchigen Trainingsphase und VOR dem zehnminütigen Handling; ³Probe 3= Probe entnommen NACH dem zehnminütigen Handling; ⁴Probe 4= Probe am Ende des Versuches entnommen; nachgewachsene Federn im Interscapular-Bereich; ⁵T= Trainingsgruppe; ⁶K= Kontrollgruppe

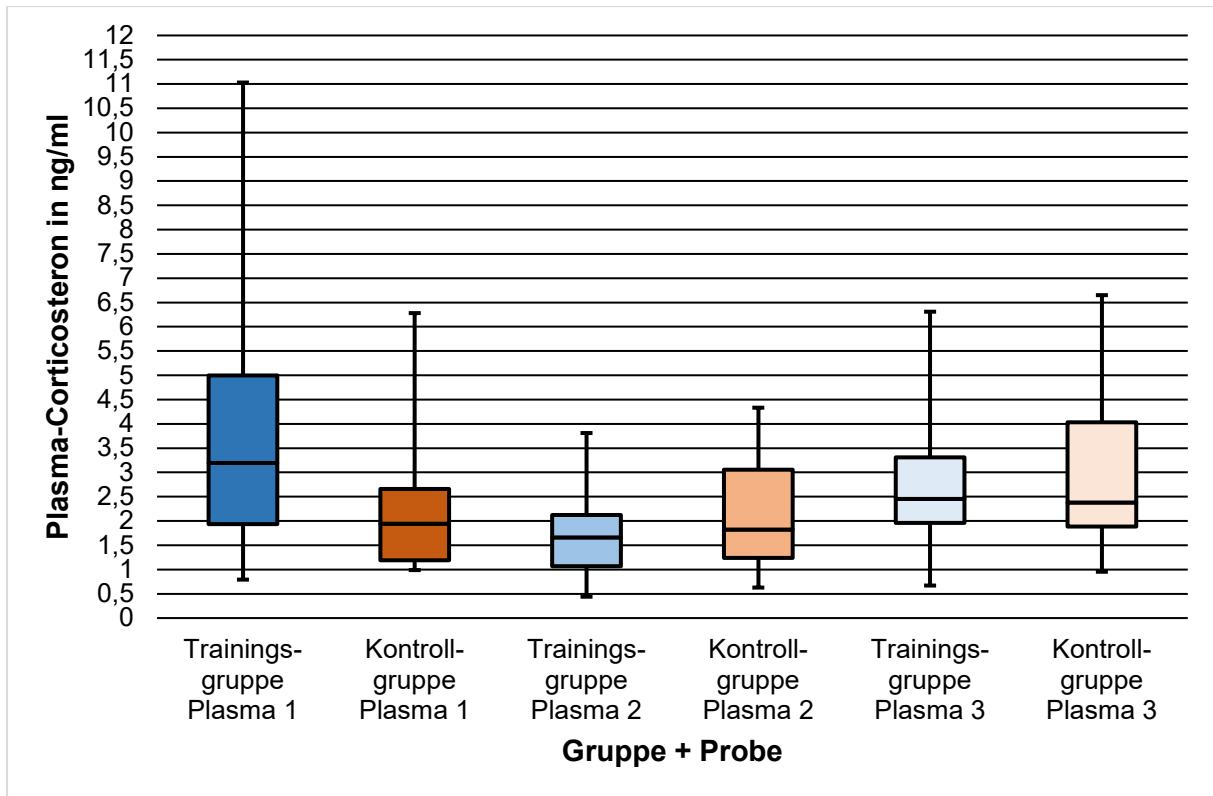


Abbildung 8: Gruppenvergleich anhand des Plasma-Corticosterons

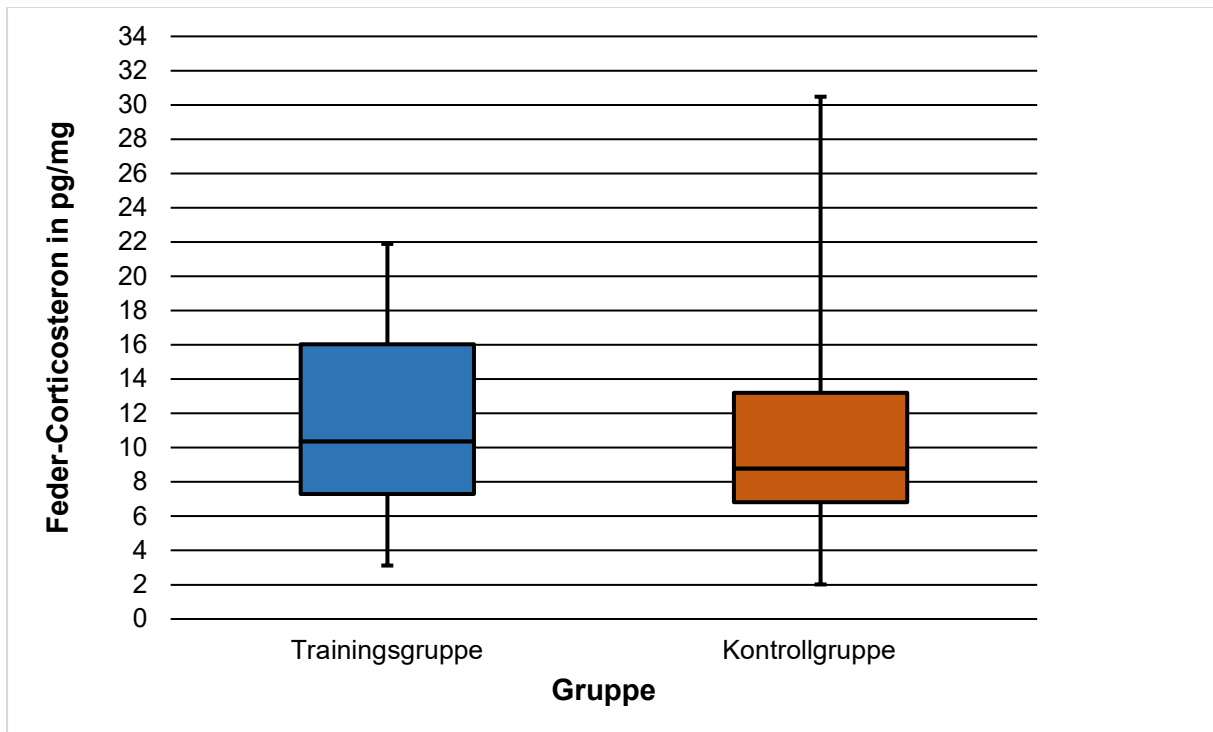


Abbildung 9: Gruppenvergleich anhand des Feder-Corticosterons

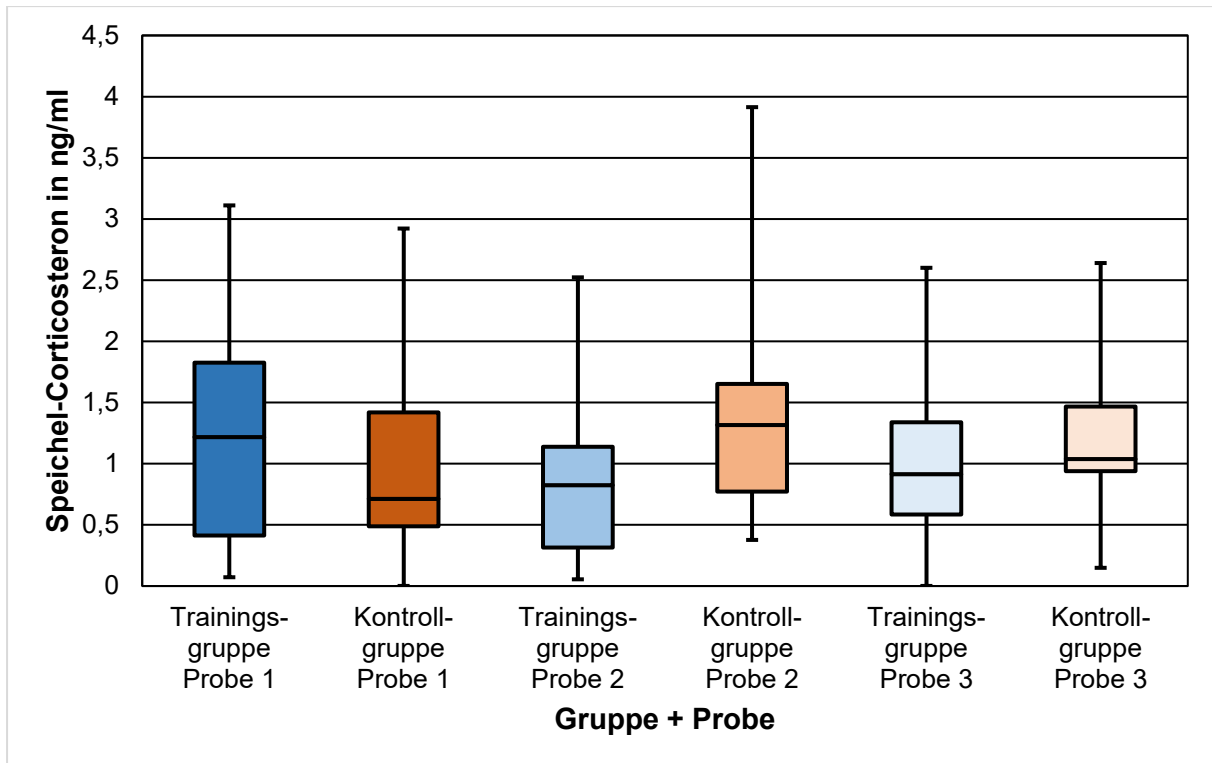


Abbildung 10: Gruppenvergleich anhand des Speichel-Corticosterons

4.4 New Area Test 1+2

In der Auswertung der beiden New Area Tests zeigten sich die Werte zur Fortbewegung um Tierlängen als normalverteilt. Die Werte zur Anzahl der Pick-Aktionen sowie die zum Schütteln wurden nach Auswertung der Q-Q-Plots und des Shapiro-Wilk-Tests als nicht normalverteilt eingestuft (Tabelle 23).

Die unterschiedlichen Individuenzahlen in den Gruppen sind auf folgende Ursachen zurückzuführen:

New Area Test 1, Trainingsgruppe:

- 2 Tiere: Störung durch krähenen Hahn im benachbarten SPF-Stall
- 2 Tiere: zeitweilig in nicht vermeidbarem toten Winkel der Kamera

New Area Test 1, Kontrollgruppe:

- 1 Tier: Störung durch krähenen Hahn im benachbarten SPF-Stall

New Area Test 2, Trainingsgruppe:

- 5 Tiere: Störung des Tests durch geräuschvolle Baumaßnahmen auf Fachbereichsgelände

New Area Test 2, Kontrollgruppe:

- 3 Tiere: Störung des Tests durch geräuschvolle Baumaßnahmen auf Fachbereichsgelände
- 2 Tiere: tot durch Kannibalismus

Tabelle 21: Test auf Normalverteilung des beobachteten Verhaltens in den New Area Tests

	Shapiro-Wilk-Test		Q-Q-Plots
	Normalverteilung	Signifikanz	Normalverteilung
Fortbewegung (eine Tierlänge = eine Einheit)			
New Area Test 1	ja	0,782	ja
New Area Test 2	ja	0,547	ja
(Futter-)Pickaktionen (eine Pick-Aktion = eine Einheit)			
New Area Test 1	nein	0,000	nein
New Area Test 2	nein	0,000	nein
Schütteln als Verhalten der Neuordnung (einmal „hin und her“ = eine Einheit)			
New Area Test 1	nein	0,030	nein
New Area Test 2	nein	0,000	nein

Als Resultat der Testungen auf Normalverteilung, wurden nur die Werte zur Fortbewegung mit dem t-Test für unabhängige Stichproben bewertet. Für die beiden anderen Parameter erfolgte die weitere Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test (Tabelle 22).

Tabelle 22: Gruppenvergleiche anhand des beobachteten Verhaltens in den New Area Tests

Fortbewegung (eine Tierlänge = eine Einheit)								
	Individuenzahl N		Mittelwerte		Median		T-Test für unabhängige Stichproben	
	T ¹	K ²	T ¹	K ²	T ¹	K ²	Signifikanz p	Cohen's d
New Area Test 1	17	20	18,18	20,05	20	18,75	0,345	-0,310
New Area Test 2	16	16	21,31	22,44	22	23,75	0,679	-0,148
(Futter-)Pickaktionen (eine Pick-Aktion = eine Einheit)								
	Individuenzahl N		Mittelwerte		Median		Mann-Whitney-U-Test	
	T ¹	K ²	T ¹	K ²	T ¹	K ²	Signifikanz p	Effektstärke r
New Area Test 1	17	20	2,5	9,32	2	8	0,015	0,400
New Area Test 2	16	16	8,69	9,59	6	8,75	0,597	0,090
Schütteln als „Verhalten der Neuordnung“ (einmal „hin und her“ = eine Einheit)								
	Individuenzahl N		Mittelwerte		Median		Mann-Whitney-U-Test	
	T ¹	K ²	T ¹	K ²	T ¹	K ²	Signifikanz p	Effektstärke r
New Area Test 1	17	20	1,47	2,65	1,5	2,5	0,016	0,400
New Area Test 2	16	16	1,78	3,13	1	1,5	0,250	0,200

¹T= Trainingsgruppe; ²K= Kontrollgruppe

Die Auswertung der beobachteten Verhaltensweisen erbrachte für die Fortbewegung in beiden New Area Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Ähnlich verhält es sich für das Pick-Verhalten und das Schütteln im New Area Test 2. Blickt man bei den letztgenannten beiden Parametern allerdings zum New Area Test 1, so finden sich hier für diese beiden letztgenannten Parameter im p-Wert signifikante Unterschiede zwischen der trainierten Versuchs- und der Kontrollgruppe (Tabelle 22, Abbildung 11-13).

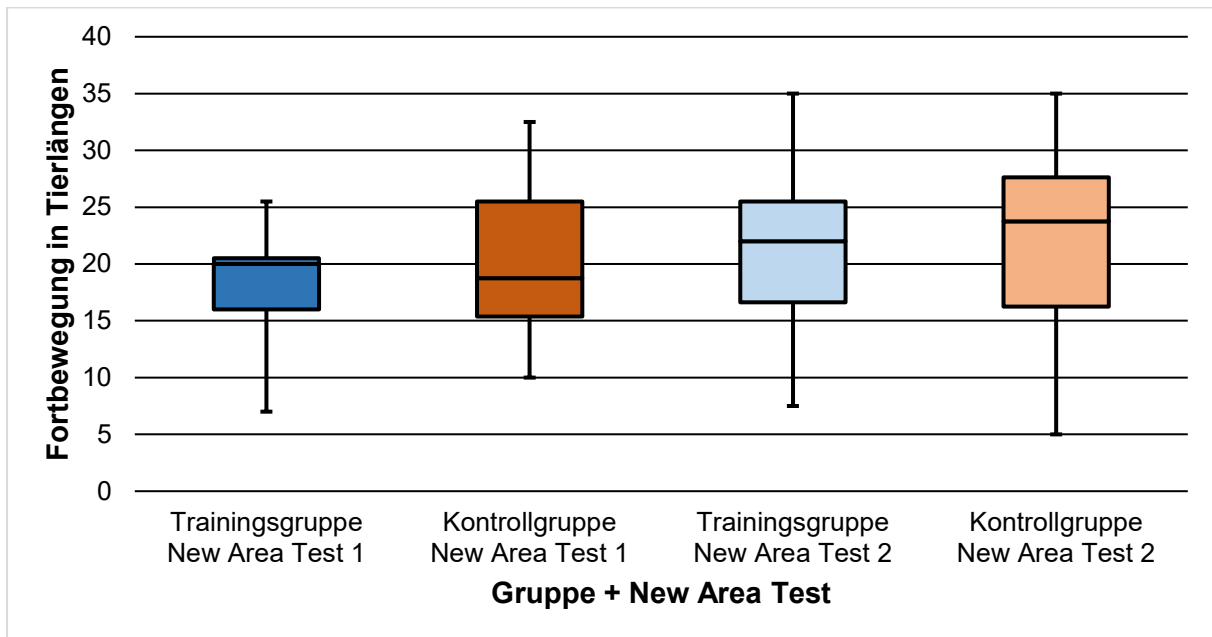


Abbildung 11: Gruppenvergleich anhand der Fortbewegung in Tierlängen

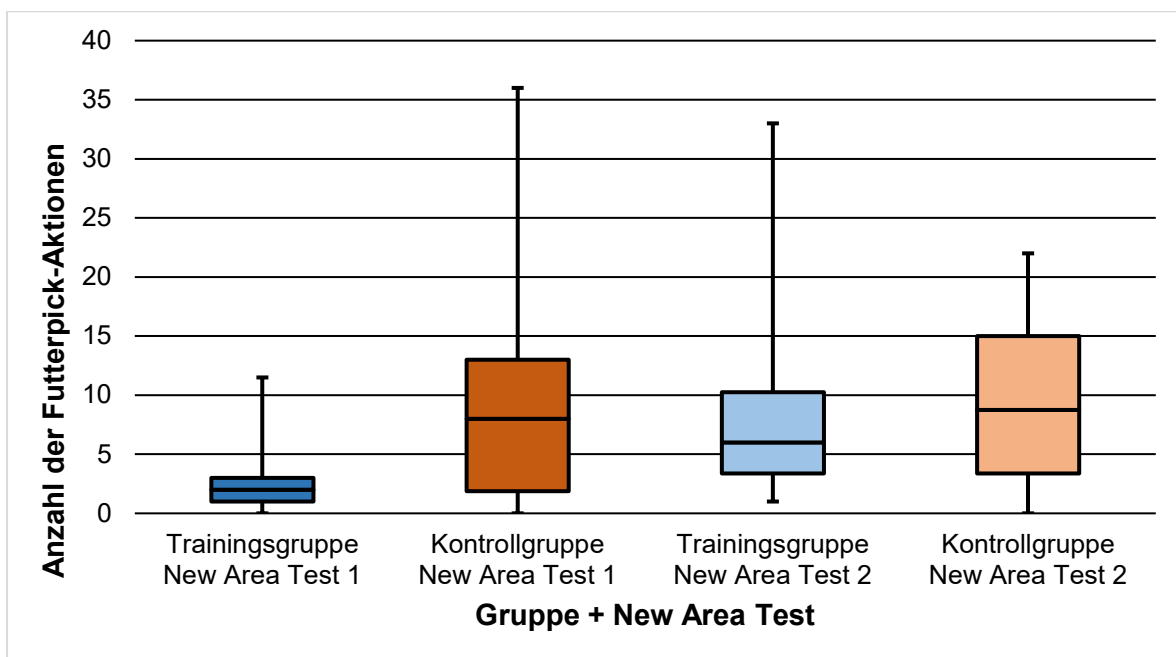


Abbildung 12: Gruppenvergleich anhand der Pick-Aktionen

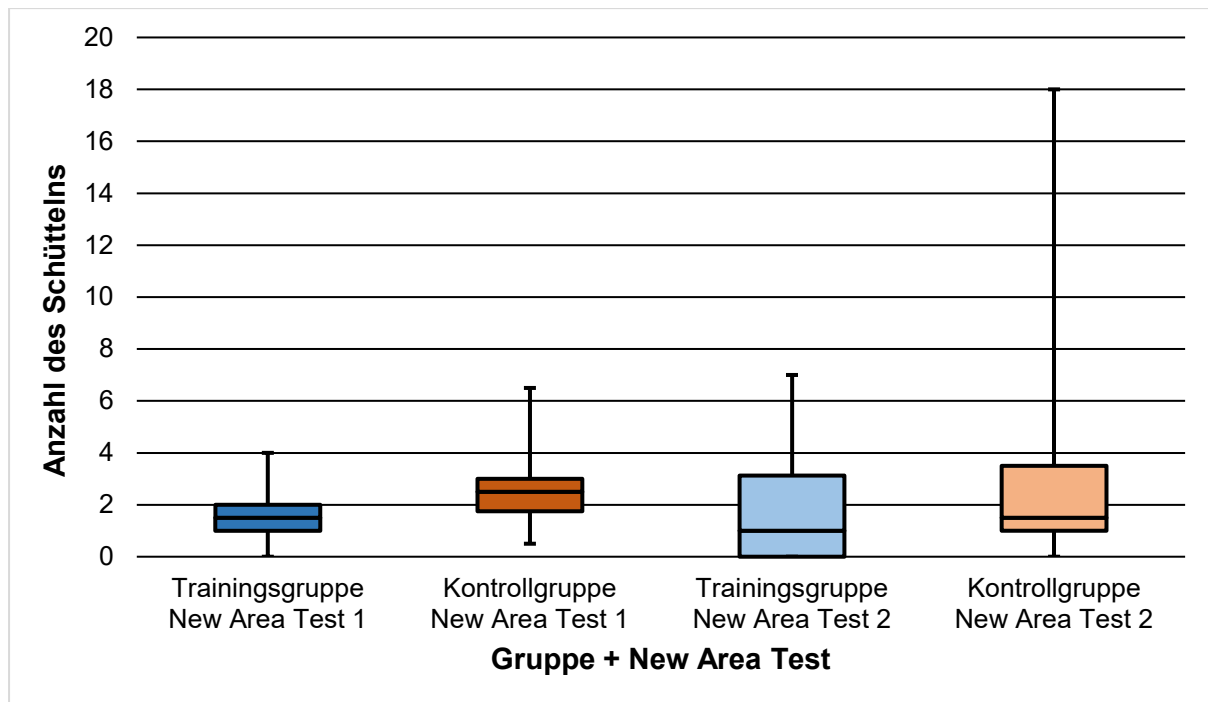


Abbildung 13: Gruppenvergleich anhand des axialen Körperschüttelns

4.5 Kotabsatz im New Area Test 1 und 2

Sowohl die Werte zur Anzahl der abgesetzten Kothaufen pro Huhn, als auch die zur Konsistenz dieser Kothaufen wurden anhand des Shapiro-Wilk-Tests und der Q-Q-Plots als nicht normalverteilt eingestuft (Tabelle 23). Dementsprechend folgte auch hier die weitere Analyse mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (Tabelle 24). In Auswertung dessen zeigte sich für beide New Area Tests kein im p-Wert signifikanter Gruppenunterschied hinsichtlich der abgesetzten Kothaufen, dafür allerdings sowohl in New Area Test 1, als auch in New Area Test 2 ein signifikanter Unterschied bezüglich der Konsistenz dieser Kothaufen (Abbildung 14+15).

Zwei Tiere setzten in jeweils einem New Area Test gar keinen Kot ab: ein Tier der Trainingsgruppe im New Area Test 1 und ein Tier der Kontrollgruppe im New Area Test 2. Sie blieben daher in der Auswertung zur Kotkonsistenz unberücksichtigt. Zusätzlich entfielen im New Area Test 2 des ersten Versuchsdurchganges zwei weitere Tiere der Kontrollgruppe, von denen jeweils ein Tier auf Grund von am Vortag des Tests eingesetztem Kannibalismus verstorben bzw. euthanasiert worden ist.

Tabelle 23: Test der Kot-Parameter auf Normalverteilung

	Shapiro-Wilk-Test		Q-Q-Plots
	Normalverteilung	Signifikanz	Normalverteilung
Anzahl der abgesetzten Kothaufen			
New Area Test 1	nein	0,000	nein
New Area Test 2	nein	0,002	nein
Konsistenz der abgesetzten Kothaufen			
New Area Test 1	nein	0,000	nein
New Area Test 2	nein	0,000	nein

Tabelle 24: Gruppenvergleich anhand der Kot-Parameter

Kotabsatz in den New Area Tests								
	Individuenzahl N		Mittelwerte		Median		Mann-Whitney-U-Test	
	T ¹	K ²	T ¹	K ²	T ¹	K ²	Signifikanz p	Effektstärke r
Anzahl der abgesetzten Kothaufen (Anzahl: 0-3)								
New Area Test 1	21	21	1,76	2,10	2	2	0,168	0,213
New Area Test 2	21	19	2,00	2,32	2	2	0,168	0,218
Konsistenz der abgesetzten Kothaufen (Scoring: 1-3)								
New Area Test 1	20	21	1,03	1,21	1	1,67	0,000	0,716
New Area Test 2	21	18	1,67	1,77	1	1,83	0,001	0,523

¹T= Trainingsgruppe; ²K= Kontrollgruppe

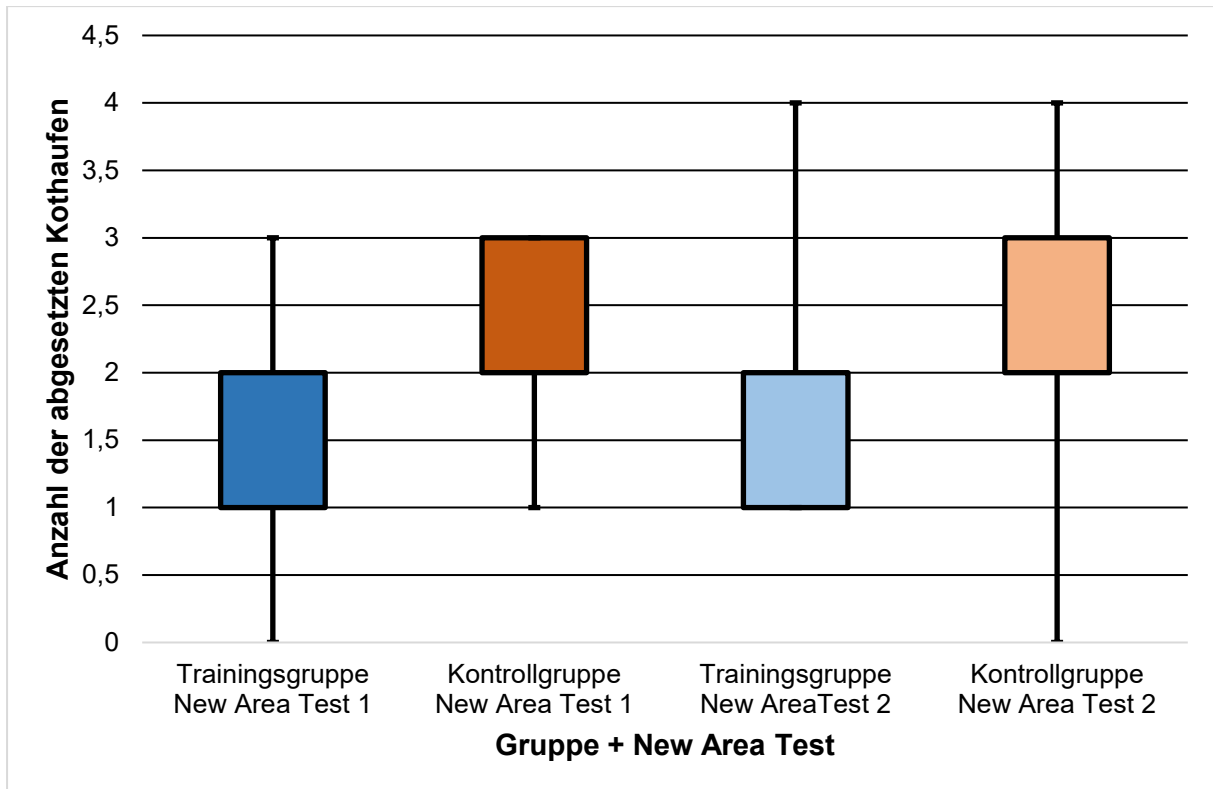


Abbildung 14: Gruppenvergleich anhand der Anzahl der abgesetzten Kothaufen

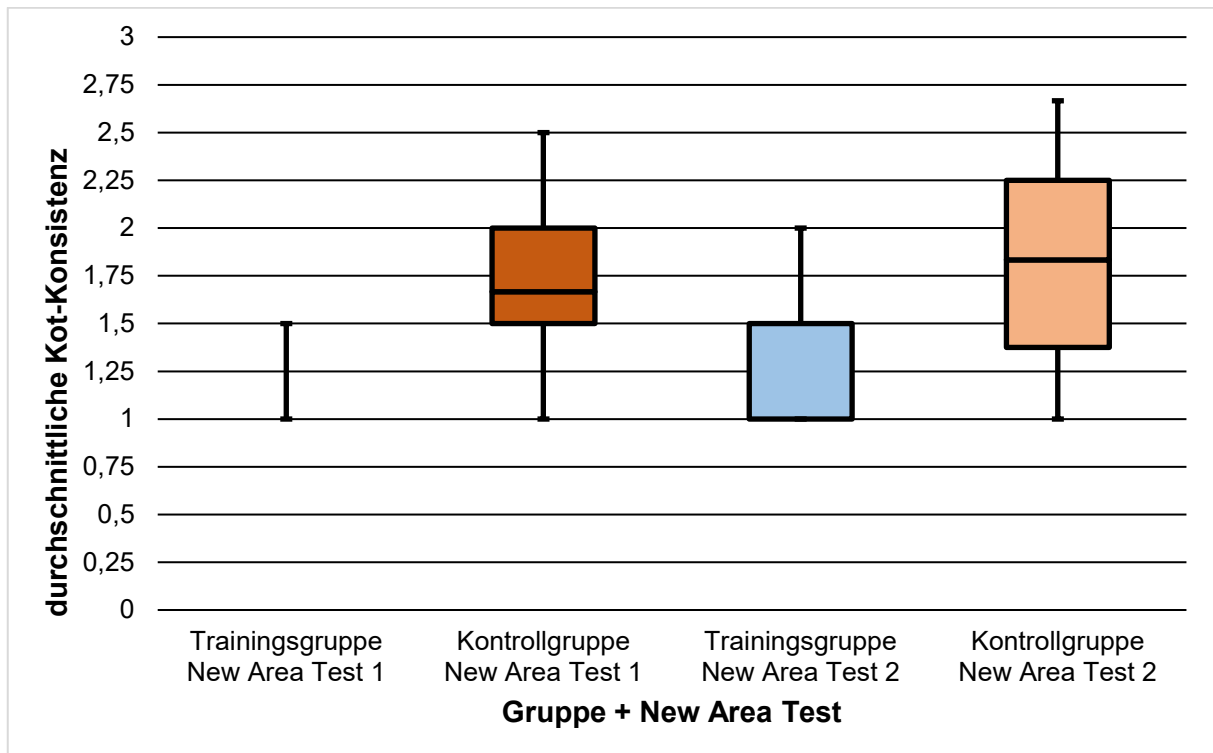


Abbildung 15: Gruppenvergleich anhand der Kot-Konsistenz

4.6 New Object Test

4.6.1 Anzahl der Tiere am Trog

In Auswertung der im Rahmen des New Object Tests erfassten *Anzahl der Tiere am Trog*, zeigten die Q-Q-Plots sowie die Signifikanz des Shapiro-Wilk-Tests von $<0,001$ zu jedem der acht Beobachtungszeitpunkte eine fehlende Normalverteilung an. Hieraus resultierend erfolgte die weitere Analyse dieses Parameters mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests in dessen Ergebnis die Unterschiede zu jedem der acht Beobachtungszeitpunkte als nicht signifikant (Tabelle 25) bewertet wurden. Zur bildlichen Veranschaulichung des durchgeführten Gruppenvergleiches zur Anzahl der Tiere am Trog findet sich die Abbildung 16.

Tabelle 25: Gruppenvergleich anhand der Anzahl der Tiere am Trog im New Object Test

Anzahl der Tiere am Trog								
Zeit nach Platzierung des New Objects	Individuenzahl N		Mittelwerte		Median		Mann-Whitney-U-Test	
	T ¹	K ²	T ¹	K ²	T ¹	K ²	Signifikanz p	Effektstärke r
10 Sekunden	21	20	0,57	0,65	1	1	0,611	0,079
20 Sekunden	21	20	0,71	0,7			0,921	0,015
30 Sekunden	21	20	0,62	0,55			0,658	0,069
60 Sekunden	21	20	0,67	0,7			0,821	0,035
90 Sekunden	21	20	0,52	0,65			0,418	0,126
120 Sekunden	21	20	0,76	0,6			0,271	0,172
150 Sekunden	21	20	0,52	0,55			0,868	0,025
180 Sekunden	21	20	0,52	0,65			0,418	0,126

¹T= Trainingsgruppe; ²K= Kontrollgruppe

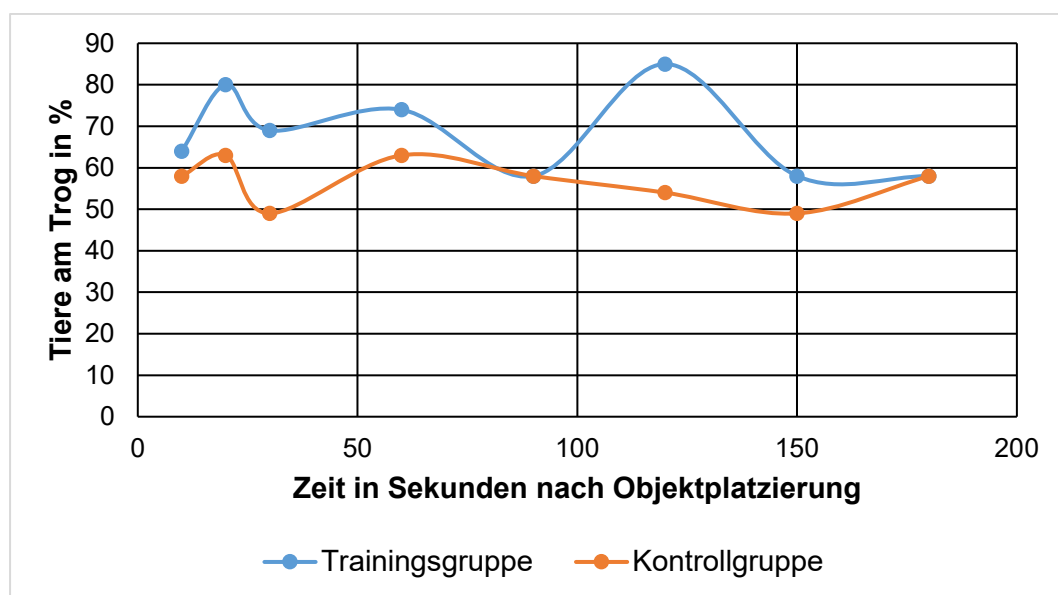


Abbildung 16: Gruppenvergleich anhand der geschätzten Randmittel zur Anzahl der Tiere am Trog im New Object Test

4.6.2 Entfernung der Tiere zum New Object

Bei den Werten zur *Entfernung der Tiere zum New Object*, ergab die Testung eine teilweise vorhandene und teilweise fehlende Normalverteilung (Tabelle 26).

Tabelle 26: Test auf Normalverteilung der Werte zur Entfernung vom neuen Objekt

Entfernung der am Trog befindlichen Tiere zum New Object			
Zeit nach Platzierung des New Objects	Shapiro-Wilk-Test		Q-Q-Plots
	Normalverteilung	Signifikanz	Normalverteilung
10 Sekunden	ja	0,105	ja
20 Sekunden	nein	0,045	ja
30 Sekunden	ja	0,100	ja
60 Sekunden	nein	0,004	nein
90 Sekunden	ja	0,447	ja
120 Sekunden	ja	0,112	ja
150 Sekunden	ja	0,056	ja
180 Sekunden	ja	0,190	ja

Da sich bei dem Parameter der „*Entfernung der am Trog befindlichen Tiere zum New Object*“ die durchgeführten Tests in den überwiegenden Fällen für eine Normalverteilung aussprachen und auch die zurückgelegte „Entfernung“ im New Area Test (*Fortbewegung um Tierlängen*) als normalverteilt charakterisiert wurde, wurde diese auch für diesen zweiten im New Object Test bewerteten Parameter angenommen.

Hieraus resultierend erfolgte die weitere Analyse dieses zweiten Parameters (Tabelle 27) unter Verwendung des t-Tests für unabhängige Stichproben. Zu jedem der acht Beobachtungszeitpunkte waren die Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der „*Entfernung der am Trog befindlichen Tiere zum New Object*“ nicht signifikant. Die im zweiten Teil des New Object Tests zu jedem Beobachtungszeitpunkt unterschiedliche Individuenzahl erklärt sich mit der Bezeichnung dieses zweiten Untersuchungsparameters.

Zur bildlichen Veranschaulichung des durchgeführten Gruppenvergleiches findet sich die Abbildung 17.

Tabelle 27: Gruppenvergleich anhand der Entfernung zum neuen Objekt im New Object Test

Entfernung der am Trog befindlichen Tiere zum New Object								
Zeit nach Platzierung des New Objects	Individuenzahl N		Mittelwerte		Median		T-Test für unabhängige Stichproben	
	T ¹	K ²	T ¹	K ²	T ¹	K ²	Signifikanz p	Cohen's d
10 Sekunden	12	12	2,92	3,33	3	3,5	0,520	-0,263
20 Sekunden	15	14	3,07	3,07	3	3	0,993	0,000
30 Sekunden	13	11	2,46	2,64	2	3	0,770	-0,125
60 Sekunden	14	14	3,14	3,36	3	2,5	0,751	-0,125
90 Sekunden	11	13	3,55	2,69	4	3	0,203	0,542
120 Sekunden	16	12	3,06	3,25	3	3,5	0,778	-0,110
150 Sekunden	11	11	3,55	3,64	3	4	0,904	-0,051
180 Sekunden	11	13	3,45	3,15	3	4	0,686	0,168

¹T= Trainingsgruppe; ²K= Kontrollgruppe

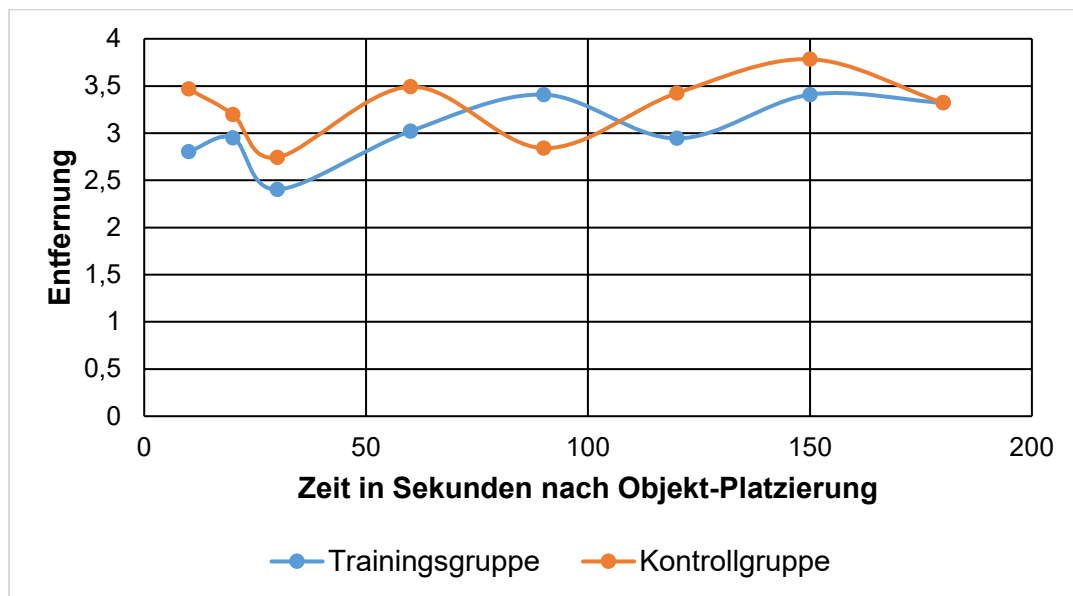


Abbildung 17: Gruppenvergleich anhand der geschätzten Randmittel zur Entfernung zum neuen Objekt im New Object Test

4.7 Ei-Gewichte

Das durchschnittliche Gewicht der je Versuchsdurchlauf 50 zuletzt gelegten Eier in der Gesamtheit aller drei Trainingsgruppen betrug 52,98 g, während das der Eier der Gesamtheit aller drei Kontrollgruppen 47,38 g betrug.

5. Diskussion

5.1 Gewählte Parameter zur Beurteilung der Wirkung eines Klicker-Trainings

Die für diese Studie verwendeten Labor-Parameter, anhand derer die Eignung des Klicker-Trainings als Refinement-Maßnahme zur Stressreduzierung bei zu Versuchszwecken genutzten Hühnern beurteilt werden soll, wurden so zusammengestellt, dass durch sie ein möglichst breit gefächertes Eindrücke zum Stressempfinden der Tiere gewährleistet wird. Die Werte des Plasma- und Speichel-Corticosterons ermöglichen hierbei eine Einschätzung des aktuellen Stressempfindens der einzelnen Tiere im Rahmen des Handlings und in Verbindung mit der Entnahme der entsprechenden Blut- und Speichelproben. Die Blutwerte – hierbei in erster Linie die Werte zur H:L-Ratio - sollen durch ihre verzögerte Reaktion einen Einblick in das mittel- bis längerfristige Stressempfinden liefern. Eine Aussage zum langfristigen Stressempfinden über den kompletten Verlauf eines jeweiligen Versuchsdurchganges soll die Menge des in die neu nachgewachsenen Interscapularfedern eingelagerten Feder-Corticosterons liefern. Durch diese Betrachtung des mittel- bis längerfristigen Stressempfindens soll der Einfluss eines täglichen Klicker-Trainings auf das Alltags-Stressempfinden der Tiere beurteilt werden. Die in Ergänzung zu diesen Parametern durchgeführten Verhaltenstests sollen offenlegen, ob das Klicker-Training und die damit einhergehenden häufigen neuen Eindrücke und positiven Erfahrungen, mit denen die Trainingsgruppentiere über den Trainingszeitraum hinweg konfrontiert wurden, diese Tiere dadurch allgemein offener gegenüber neuen Situationen, selbstbewusster und möglicherweise zudem resilienter hinsichtlich überstandener oder auch aktuell bestehender Stresssituationen werden lässt.

5.2 H:L-Ratio

Im Blut von Hühnern kommt es einige Zeit nach einer stressigen Situation zu Verschiebungen im Verhältnis zwischen den Heterophilen Granulozyten und den Lymphozyten. Die Umverteilung der Blutzellen tritt nach Ansicht unterschiedlicher Autoren 30 Minuten bis 20 Stunden nach einer Stresssituation auf und kann bei Fortbestand bzw. regelmäßiger Wiederkehr des Stressors eine längerfristige Verschiebung bewirken (Prinzinger et al. 2012; Cunnick et al. 1994; Maxwell 1993; Dein 1986). Bis zum letzten Trainingstag und auch am Tag der mit dem Handling verknüpften zweiten und dritten Probenentnahme wurden die Tiere der Trainingsgruppe mittels Klicker-Training trainiert. Und auch, wenn die meisten der gerade zu Beginn eines jeden Versuchsdurchlaufes durchweg hochgradig ängstlichen Tiere im Laufe der Trainingsphase eine gewisse Routine entwickelten, so wurden sie dennoch über diese Periode hinweg jeden Tag aufs Neue mit für sie im Grunde stressigen Erlebnissen, wie z.B. Manipulationen unterschiedlicher Art, konfrontiert. Neben den Tieren, die auf Grund ihrer

individuellen Natur ihre Ängstlichkeit bzw. Stressanfälligkeit nie wirklich ablegen konnten, mussten sich auch die „guten Lerner“ und damit die, die das Training und die Belohnungen generell eher mit positiven Erfahrungen in Verbindung brachten, so über mehrere Wochen und bei jedem neuen Trainingsschritt immer wieder auf Neue auch mit Situationen auseinandersetzen, die - wie das Handling oder gewisse Formen der Immobilisation (z.B. während der Probenentnahme) - eigentlich ihrer Grundnatur widersprechen und von denen bekannt ist, dass sie im Normalfall von Hühnern als stressig empfunden werden (Wein et al. 2017; Bortolotti et al. 2008; Mormède et al. 2007; Knowles und Broom 1993; Knowles und Broom 1990; Lagadic et al., 1990). Durch den Vergleich der H:L-Ratios der Trainingsgruppentiere mit denen der Kontrollgruppentiere, die - zumindest im Hinblick auf fehlendes, möglicherweise stressiges Klicker-Training - ungestört waren, wurde so ein Einblick in das Stressempfinden der erstgenannten Gruppe im Verlauf der dreiwöchigen Trainingsperiode ermöglicht.

Blickt man auf die Ergebnisse des Vergleichs beider Gruppen anhand dieses Parameters, so wird deutlich, dass sich die H:L-Ratio-Differenzen – gebildet aus den vor (Blutprobe 1) und nach (Blutprobe 3) der Trainingsperiode bestimmten H:L-Ratios - zwischen Trainings- und Kontrollgruppe im p-Wert nicht signifikant unterscheiden (Tabelle 14, Abbildung 6). Betrachtet man ergänzend hierzu noch den Wert der H:L-Ratio vom Ende des Trainings gesondert (Blutprobe 3, Tabelle 14), so wird zudem deutlich, dass dieser sowohl für die Tiere der Trainingsgruppe (Median: 0,368) als auch für die Kontrollgruppentiere (Median: 0,514) in Bereichen liegt, die laut Gross (1989) und Gross und Siegel (1983) sehr niedrige bis optimale Stresspegel beschreiben. Somit lassen sowohl die Differenzen als auch die gesonderte Betrachtung der H:L-Ratio in Blutprobe 3 die Schlussfolgerung zu, dass das in dieser Studie durchgeführte Training so gestaltet bzw. dessen Einzelschritte so gewählt waren, dass die Trainingsgruppentiere auch bei täglicher Konfrontation mit neuen und potentiell unangenehmen, weil ihrer Natur als Beutetier widersprechenden Situationen, durch diese nicht negativ beeinflusst wurden.

Dass die H:L-Ratio dennoch im Verlauf des Trainingszeitraumes von Probe 1 hin zu Probe 3 in jeder Gruppe leicht anstieg, kann mit dem Einsetzen der Legetätigkeit in diesem Zeitraum begründet werden. Hörak et al. (1998) beschreiben für Kohlmeisen-Weibchen einen Anstieg der H:L-Ratio in der reproduktiv aktiven Zeit. Diese auf die hohe Stoffwechselbelastung zurückzuführende Verschiebung der weißen Blutzellen kann in gleicher Weise auch für Legehennen in den ersten Wochen nach Legebeginn angenommen werden.

Die beiden Versuchsgruppen anhand ihrer Differenzen zwischen der H:L-Ratio in Probe 1 und der in Probe 3 und nicht in erster Linie anhand der Werte ihrer jeweiligen Einzelproben zu

vergleichen, war im Falle der hier vorgestellten Studie empfehlenswert, da es sich bei der H:L-Ratio um einen mittel- bis längerfristig reagierenden, dynamischen Stressparameter handelt und nur so der bereits in Probe 1 bestehende Gruppenunterschied und sein möglicher Einfluss bis hin in die Probe 3 mitberücksichtigt werden konnte. Im Vergleich hierzu konnte das innerhalb von wenigen Minuten in seiner Konzentration veränderliche Plasma- und Speichel-Corticosteron als schnell reagierender, dynamischer Parameter, trotz des signifikanten Gruppenunterschiedes in Probe 1, sowohl für Probe 2 als auch für Probe 3 und damit für jeden Messzeitpunkt gesondert zum direkten Gruppenvergleich herangezogen werden. Bei dem in die Federn als langfristiger, statischer Stressparameter eingelagerten Feder-Corticosteron, konnte durch das Entfernen der zu Versuchsbeginn vorhandenen alten Federn aus dem Interscapularbereich eine Art *Reset* erfolgen, nach welchem die Einlagerung des ab dann jeweils im Organismus zirkulierenden Corticosterons in die nun neu nachwachsenden Federn von vorne beginne konnte.

5.3 Hämatokrit

Im Hinblick auf stressbedingte Verschiebungen des Hämatokrits finden sich bereits zur Frage, ob ein Anstieg oder ein Abfall die Folge ist, unterschiedliche Meinungen (Aurich 2002; Döcke 1994). Daher wurde in allen drei der im Rahmen dieser Studie gezogenen Blutproben eine Hämatokrit-Bestimmung durchgeführt, um so die Aussagekraft dieses Parameters hinsichtlich einer potentiellen Beeinflussung durch lang- bzw. kurzfristiges Stressempfinden zu bewerten und mögliche, wie auch immer gerichtete Gruppenunterschiede aufzuzeigen. Zwischen Probe 1 und Probe 2 erstreckte sich hierbei der lange, mehrwöchige Trainingszeitraum, während zwischen Probe 2 und 3 nur die zehnmütige Allgemeinuntersuchung zwischengeschaltet war. Im Gruppenvergleich finden sich dann allerdings zu keinem der Probenentnahme-Zeitpunkte im p-Wert signifikante Gruppenunterschiede hinsichtlich der Höhe des jeweils festgestellten Hämatokrits (Tabelle 15). Dass allerdings zahlreiche Faktoren einen mehr oder weniger großen Einfluss auf den Hämatokritwert haben können, wird auch in der hier vorgestellten Studie deutlich. So zeigt sich z.B. in beiden Gruppen ein im Vergleich zu Probe 2 und 3 verhältnismäßig hoher Hämatokrit in Probe 1 (Abbildung 7). Dieser Unterschied kann darin begründet liegen, dass die Tiere zum Zeitpunkt der ersten Probennahme noch keine Eier legten und diesbezüglich bereits Hunsaker (1969) feststellte, dass legende Hennen niedrigere Werte des dem Hämatokrit nahezu identischen PCV (*packed cell volume*) zeigen, als nicht legende Hennen. Analytisch wird diese Mitbeeinflussung des Vogel-Hämatokrits durch eine Vielzahl innerer und äußerer Faktoren, wie Alter, Infektionen, Parasiten, Jahreszeit, geografischer Höhenlage, aktuellem Energieverbrauch, Toxine, Genetik oder Wasserhaushalt (Markowski et al. 2020; Minias 2020; Cornet et al. 2014; Nowaczewski und Kontecka 2012; Fair et al. 2007; Gylstorff und Grimm 1987; Mehner und Hertfiel 1983; Freeman 1971b; Newell

und Schaffner 1950), auch durch die relativ kleinen Werte des Cohen's d in den statistischen Untersuchungen dieser Arbeit bestätigt. Diese Tatsache, zusammen mit dem Resultat der Gruppenvergleiche, rechtfertigt die Aussage, den Hämatokritwert zur Beurteilung der Beeinflussung des Stressempfindens durch Klicker-Training beim Huhn als nicht geeignet zu bewerten.

5.4 Corticosteron-ELISA

5.4.1 Verifizierung

5.4.1.1 INTRA-Assay-Präzision

Im Ergebnis der Verifizierung des für diese Studie genutzten ELISAs ergab sich im INTRA-Assay ein Variationskoeffizient, der im geometrischen Mittel für die drei Plasma-Proben 15,3% und für die vier Federproben 12,9% betrug. Hiermit entsprach dieses Ergebnis annähernd dem Wert, den die spanischen Kollegen um Annaïs Carbajal uns in schriftlicher Kommunikation berichteten. Bei ihnen lag der Variationskoeffizient (= VC) bei 10% im Intra-Assay (Annaïs Carbajal, schriftliche Kommunikation vom 11.11.2020). Carbajal et al. (2014) nutzten in ihrer Arbeit zur Beurteilung von Tierwohl in der Broiler-Haltung für die hierzu durchgeführten Feder-Corticosteron-Messungen ebenfalls den Corticosteron-ELISA der Firma NEOGEN und berichteten uns persönlich von der Schwierigkeit, den VC beim Corticosteron – anders als beim Cortisol – in noch niedrigere Bereiche abzusenken.

5.4.1.2 INTER-Assay-Präzision

Im INTER-Assay lagen die Variationskoeffizienten für beide Probenarten im geometrischen Mittel für die Plasma-Proben bei 17,5%, für die Feder-Proben bei 29,7%. Die Kollegen um Carbajal berichteten hingegen von einem Variationskoeffizienten im Inter-Assay von 15% (Annaïs Carbajal, schriftliche Kommunikation vom 11.11.2020).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der hier durchgeführten Verifizierung, wurden bei der späteren Analyse der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Proben stets gleich viele Proben von Versuchs- und Kontrollgruppentieren auf derselben ELISA-Platte und im gleichen Messdurchlauf analysiert. Zudem wurden bei den Probenarten Plasma bzw. Speichel auch jeweils alle drei pro Tier gewonnenen Proben zusammen auf einer ELISA-Platte und im gleichen Messdurchlauf untersucht. Trotz dieses Vorgehens sollte eine Beurteilung des Stressempfindens der Tiere dieser Studie anhand des Parameters Corticosteron stets mit Bedacht und nur im Zusammenspiel mit anderen Parametern erfolgen.

5.4.2 Feder-Corticosteron

5.4.2.1 Feder-Corticosteron als Parameter zur Stressbeurteilung

Blickt man auf die Ergebnisse des Corticosteron-ELISAs, so unterstreichen auch die Werte des Federcorticosterons (Tabelle 20, Abbildung 9) das, was bereits im Hinblick auf die H:L-Ratio deutlich wurde. Denn wie diese, so zeugt auch das im Laufe ihrer Wachstumsphase in die Federn eines Huhnes eingelagerte Corticosteron von dessen Stressbelastung über einen gewissen zurückliegenden Zeitraum (Romero und Fairhurst 2016; Bortolotti et al. 2008). Und so zeigt, ähnlich wie die H:L-Ratio, auch das in die nachgewachsenen Interscapularfedern der Studientiere eingelagerte Corticosteron eine für Trainings- und Kontrollgruppe im Mittelwert nahezu gleiche Stressbelastung im Zeitraum des Versuchsdurchlaufes.

Was die Höhe der Feder-Corticosteronkonzentration und damit die Aussage zum Grad des potentiellen Stressempfindens der Tiere in diesem Zeitraum angeht, so fanden Häffelins et al. (2020) in den Interscapularfedern von Legehennen durchschnittliche Corticosteron-Konzentrationen von 80pg/mg (Median: 79,5 pg/mg; Range: 48,8 bis 92,2 pg/mg). Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass für jene Studie Federn von tot in kommerziellen Legehennenanlagen aufgefundenen braunen Legehennen (Lohmann Brown) genutzt wurden. Diese Tiere waren somit vor ihrem Tod mit großer Wahrscheinlichkeit durch Krankheit, niedrigere Hierarchie oder andere Parameter zusätzlich gestresst. In einer darauf aufbauenden Studie fanden Häffelins et al. (2021) in Federn geschlachteter junger Legehennen eine durchschnittliche Corticosteron-Konzentration von 61,3 pg/mg (Median: 61,2; Range: 38,0 bis 93,7 pg/mg). Eine zu den Ergebnissen dieser zweiten Arbeit ähnliche durchschnittliche Corticosteron-Konzentration von 67,8 pg/mg (Median: 67 pg/mg; Range: 44 bis 90 pg/mg) fand sich auch in den gemauserten und im Rahmen eines Vorversuches zu der hier vorliegenden Arbeit analysierten Interscapular-Federn von Hühnern einer Auslaufhaltung (Tabelle 18). Weder bei den gesund geschlachteten Junghennen in der Arbeit Häffelins et al. (2021), noch bei den Tieren aus der Auslaufhaltung kann ein solches Maß an Stress erwartet werden, wie es für die tot aufgefundenen Tiere bei Häffelins et al. (2020) wahrscheinlich ist. Setzt man zu diesen Werten nun auch die weitaus niedrigeren Werte aus den Federn der Studientiere der hier vorliegenden Arbeit ins Verhältnis (Tabelle 20, Abbildung 9), so lässt sich das Stressempfinden sowohl der Trainings- als auch der Kontrollgruppentiere als gering interpretieren und spricht somit für gute Haltungs- und Trainingsbedingungen während der Untersuchungen.

Dieser Vergleich und die daraus resultierenden Schlüsse sollten allerdings nur als grobe Orientierung angesehen werden, da sowohl die hier vorliegende Arbeit (Tabelle 18, Abbildung 9) als auch die Arbeiten Häffelins et al. (2021 und 2020) zeigen, dass schon die Werte

innerhalb einer Tiergruppe einer weiten Spannbreite (=Range) unterliegen. Zusammen mit der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Verifizierung (Tabelle 17), die selbst noch innerhalb eines Tieres eine relativ breite Variation aufzeigt, unterstreicht dies auch die Ergebnisse Häffelins (2021). Diese sieht das Tierwohl betreffende Aussagen allein auf der Grundlage des Feder-Corticosterons zum aktuellen Zeitpunkt für nicht möglich. Gründe hierfür sieht Häffelin vor allem in der großen Anzahl von Einflussfaktoren, wie Pigmenteinlagerungen, tierindividuellen Coping-Strategien oder unterschiedlichen Extraktionswegen sowie im Fehlen von zu Alter, Genetik oder Blutwerten abgestimmten Referenzwerten (Häffelin 2021).

Die Bewertung der in dieser Arbeit ermittelten Feder-Corticosteronkonzentrationen unter Hinzuziehung derer aus dem Vorversuch und denen aus den Arbeiten Häffelins et al. (2021 und 2020) kann somit – auch wenn in allen Fällen nach dem gleichen Extraktionsweg verfahren wurde - nur unter Vorbehalt möglicherweise unberücksichtigt gebliebener Einflussfaktoren erfolgen. Hieraus resultierend sollte das Stressempfinden innerhalb einer Tiergruppe anhand des Feder-Corticosterons aktuell nur mit Bedacht und vornehmlich im Zusammenspiel mit anderen Bewertungskriterien beurteilt werden.

5.4.2.2 Feder-Corticosteron und H:L-Ratio als Parameter zur Praktikabilitäts-Beurteilung des Klicker-Trainings

Auch, wenn die Werte der Feder-Corticosteron-Messung – unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit durchgeführten Verifizierung – aktuell mit Bedacht und als lediglich richtungsweisend gewertet werden sollten, so beschreiben sie im Zusammenspiel mit der H:L-Ratio dennoch - neben guter Haltung - die guten Trainingsbedingungen während des Versuchszeitraumes. Die in dieser Arbeit für das Training zuständige Person verfügte vor Studienbeginn zwar über umfangreiche Sachkenntnis zum Handling und zum Verhalten des Huhnes, jedoch kaum über Erfahrungen hinsichtlich der praktischen Anwendung des Klicker-Trainings. Diese Person wurde daher im Vorfeld des Versuches durch eine Tiertrainerin geschult und konnte bereits auf Grundlage eines eintägigen Praxis-Kurses die hier vorgestellten Ergebnisse erzielen. Ist das Grundprinzip des Klicker-Trainings verstanden sowie das prinzipielle und von jedem Tierpfleger zu erwartende Wissen und Einfühlungsvermögen hinsichtlich der zu betreuenden Tiere vorhanden, so kann ein Klicker-Training leicht als angewandte Refinement-Maßnahme in bestehende Versuchstierhaltungen integriert werden.

5.4.3 Plasma- und Speichel-Corticosteron

5.4.3.1 Unterschied zum Feder-Corticosteron

Im Gegensatz zum statischen, längerfristig eingelagerten Feder-Corticosteron dienen die direkt aus den Nebennieren in die Blutbahn abgegebenen und anschließend durch den Körper zirkulierenden Corticosteroide als deutlich besser geeignet, eine akute Stresssituation und dessen Wahrnehmung durch ein bestimmtes Individuum einzuschätzen. Ähnlich dem Plasma-Corticosteron verhält es sich auch mit dem, das aus der Blutbahn in die Speicheldrüsen übergeht und so von dort aus zusammen mit dem Speichel abgegeben wird (Kirschbaum und Hellhammer 2000; Greenwood und Shutt 1992).

5.4.3.2 Speichelprobe 2+3

Betrachtet man die in den Speichelproben ermittelten Corticosteron-Konzentrationen (Tabelle 20, Abbildung 10), so zeigt sich in der nach der mehrwöchigen Trainingsphase, jedoch noch vor dem zehnmütigen Handling gezogenen Probe 2 ein signifikanter Gruppenunterschied zwischen den Trainings- und Kontrollgruppentieren. Zur Beurteilung dieses Gruppenunterschiedes diente, wie für alle in dieser Arbeit mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ausgewerteten Versuche, der Pearson Korrelationskoeffizient (Cohen 1988), der dem hier erkennbaren Effekt eine mittlere Stärke zuschreibt. Im Verlaufe des sich anschließenden Handlings, hin zur Probe 3, gleichen sich beide Gruppen zueinander an und der Gruppenunterschied verliert sich.

5.4.3.3 Plasmaprobe 2+3

Dieser – trotz des Angleichens beider Gruppen zueinander - in Speichelprobe 3 noch immer erkennbare Trend, der für die Kontrollgruppentiere leicht höhere Corticosteron-Werte aufzeigt als für die Tiere der Trainingsgruppe, spiegelt sich in ähnlicher Weise auch in der zweiten und dritten Plasmaprobe wider (Tabelle 20, Abbildung 8). Wenn auch nicht als im p-Wert signifikanter Gruppenunterschied, erkennt man auch hier in der Probe 2 tendenziell niedrigere Corticosteron-Werte der Trainingsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hin zur Probe 3 steigen die Werte beider Gruppen an und verlieren hierbei an Abstand zueinander.

Der erste Stress-Impuls, mit dem sich die Tiere dieser Studie am Tag der 2. und 3. Probenahme auseinandersetzen mussten, war der, dass sie aus ihrer jeweiligen Gruppe herausgelöst, in die entsprechenden Positionen für Plasma- und Speichelprobenentnahme (Probe 2) gebracht, im Flügel- (für die Blutprobe) bzw. Kopfbereich (für die Speichelprobe) fixiert und anschließend beprobt wurden. „Herausgelöst“ bedeutete hierbei für die Kontrollgruppentiere ein „Herausfangen“, für die Trainingsgruppentiere hingegen das selbstständige Verlassen ihrer Voliere und Aufliegen auf den Behandlungstisch. Das Fixieren

war bei den Kontrollgruppentieren mit mehr Gegenwehr verbunden, als bei den durch das Klicker-Training dahingehend konditionierten Tieren der Trainingsgruppe. Zwischen dem Öffnen der jeweiligen Volierentür und dem Abschluss der ersten Blut- und Speichelprobenentnahme lagen dann nicht mehr als 2 Minuten. Chloupek et al. (2011) sowie Dereli Fidan et al. (2018) empfehlen beim Huhn zwischen dem Einfangen des Tieres und der Blutprobenentnahme nicht mehr als 2 Minuten vergehen zu lassen, da es später bereits zu einem möglichen Anstieg der Corticosteron-Werte durch das im Einfang-Stress bedingte Anfluten des Hormons kommen kann.

Wie die signifikanten Unterschiede der 2. Speichelprobe belegen und der Trend in der 2. Plasmaprobe untermauert, kann ein dreiwöchiges Klicker-Training darauf hinwirken, die Auswirkungen dieses ersten Stress-Impulses abzumildern bzw. ein daraus resultierendes zügiges Anfluten von Corticosteron zu verringern. Im Hinblick auf die Werte der 3. Speichel- und 3. Plasmaprobe zeigt sich allerdings auch, dass dieses dreiwöchige Training nicht ausreicht, ein signifikant niedrigeres Stressempfinden im Verlauf einer länger andauernden Stresssituation (hier in Form des Handlings) aufrecht zu erhalten. Zwar bleibt der Trend einer im Mittel leicht niedrigeren Corticosteron-Konzentration unter den Tieren der Trainingsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auch in dritten Proben erhalten, doch sind diese lediglich tendenziell. Auch muss insgesamt bedacht werden, dass die in dieser Studie simulierte Situation von Probennahme und Handling anscheinend von allen Tieren als nicht so stressig empfunden wurde, wie oftmals allgemein angenommen. Verdeutlicht wird dies nicht nur durch den Abgleich mit anderen Arbeiten, in denen bereits die Basalwerte (Post et al. 2003; Zhang et al. 2009; Vosmerova et al. 2010; Mirfendereski und Jahanian 2015; Badmus et al. 2021) höher lagen, als die in dieser Arbeit ermittelten Werte nach Stressexposition, sondern auch bei Betrachtung der Plasmacorticosteron-Werte in Probe 1 der hier vorgestellten Studie.

5.4.3.4 Gruppenunterschiede in Probe 1

Betrachtet man die Werte der Plasmacorticosteron-Konzentration in Probe 1 (Tabelle 20, Abbildung 8), so sticht einem der bereits hier bestehende, im p-Wert signifikante Gruppenunterschied zwischen den Trainings- und Kontrollgruppentieren ins Auge. In dieser Probe hätten sich erwartungsgemäß noch keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigen dürfen, da diese entnommen wurde, noch bevor das Training der Trainingsgruppentiere begann. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden beide Gruppen im Rahmen der zweiwöchigen Eingewöhnungsphase unter genau gleichen Bedingungen gehalten.

Erklärbar wird dieser Unterschied durch die bekannterweise sehr schnelle Reaktion des Plasmacorticosteron-Spiegels des Huhnes auf Fang- und Immobilisationsstress (Korbel und Lierz 2014). Als Beutetier und mit dementsprechend stark ausgeprägtem Fluchreflex kann

bei dieser Spezies somit schon das vorherige Einfangen bzw. die Probennahme und die hiermit einhergehende Immobilisation eine schnelle, stressbedingte Erhöhung des Corticosteron-Spiegels bedingen (Wein et al. 2017, Korbel und Lierz 2014; Bortolotti et al. 2008; Mormède et al. 2007). Ist diese schnelle Reaktion des Huhnes auf einen solchen Stressor in manchen Studien u.a. im Rahmen von Immobilisationstests zur Erforschung der Stressantwort erwünscht (Yoshidome et al. 2021; Ericsson et al. 2014; Parshad 2014; Cockrem 2007b; Fraisse und Cockrem 2006; Jones 1987), so bestand in dem Fall der hier vorgestellten Arbeit die Gefahr, bereits durch das unumgängliche Handling im Zuge der Probenentnahme ein rasches Verschieben der Plasma-Corticosteronspiegel zu bewirken.

Für die erste Probenentnahme sollten jeweils alle 14 Tiere eines Versuchsdurchlaufes (drei Durchläufe mit jeweils 7x Trainings- und 7x Kontrollgruppentieren; eingestallt in zwei benachbarten Volieren), am gleichen Tag beprobt und hierfür nacheinander aus den Ställen gefangen werden. Hierbei galt es zu vermeiden, dass sich die Plasmacorticosteron-Werte von einem Huhn zum nächsten bereits dadurch zu sehr erhöhten, dass die an diesem Tag später gefangenen Tiere das Prozedere über längere Zeit beobachten und dadurch bei ihrer eigenen Beprobung gestresster sind als die Tiere, die gleich am Anfang die Probenentnahme durchliefen. Um diesem Effekt vorzubeugen, wurde nicht nur mit einem, sondern mit zwei „Probenentnahme-Teams“ gearbeitet (Tabelle 7), um so den Zeitraum der ersten Probenentnahme möglichst kurz zu gestalten. Jedes Team bestand hierbei aus einer Person, die die Tiere aus der Voliere fing, um sie anschließend für die Probenahme zu fixieren sowie einer zweiten Person, deren Aufgabe es war, die Blut- und Speichelprobe zu entnehmen und die Federn im Interscapularbereich herauszuziehen. Durch diese Aufteilung der Probenentnahme auf ein Team für die Trainings- und ein Team für die Kontrollgruppe konnte zwar die Zeit vom ersten bis zum letzten beprobten Tier um die Hälfte reduziert werden, allerdings kann hierdurch ein Team-bedingter signifikanter Unterschied hinsichtlich des Stressempfindens in den Tiergruppen und damit eine ungleiche Beeinflussung ihrer Plasmacorticosteron-Werte nicht ausgeschlossen werden. Wenn auch nicht im p-Wert signifikant, spiegelt sich dieser Unterschied auch in den Speichelcorticosteron-Werten der ersten Probenentnahme wider (Tabelle 20, Abbildung 10). Alternativ zu den zwei Probenentnahme-Teams hätte sich die eigentliche Probenentnahme-Zeit nur dadurch verkürzen lassen, indem man die Tiere vor der Beprobung alle in eine Kiste verbringt und aus dieser heraus in zügiger Abfolge beprobt. Diesbezüglich fanden allerdings Knowles und Broom (1993), dass die Corticosteron-Werte von Hühnern, die vor einer Blutprobenentnahme in Kisten gesperrt wurden, schon selbst hierdurch höher ausfielen, als die von Tieren, die direkt aus ihren Käfigen beprobt wurden.

Rückblickend zeigt sich, dass eine weniger routiniert durchgeführte Probenentnahme in der Trainingsgruppe – durch eventuell nervösere Probenentnehmer oder möglicherweise schlechteres Hand-in-Hand-Arbeiten beider Team-Partner – scheinbar mit daraus resultierender erhöhter Nervosität der beprobten Tiere einhergeht. Können diese menschlichen Parameter abgemildert und an Routine gewonnen werden, so scheinen sowohl die Entnahmen von Blut- und Speichelproben, als auch die damit und mit dem Handling in einer Allgemeinuntersuchung einhergehende Fixation / Immobilisation, selbst bei täglicher Wiederholung – so verdeutlichen es auch das Feder-Corticosteron und die H:L-Ratio - als nur geringe Belastung für die Hühner eingestuft werden.

5.4.4 Einflussfaktoren auf den Corticosteronspiegel und Maßnahmen zur Eindämmung im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit

5.4.4.1 Stallparameter und Corticosteron

Die Haltung der Hühner in allen drei Versuchsdurchläufen dieser Studie entsprach den Angaben des Anhang III der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere in der jeweils geltenden Fassung. Da von vielen Stallparametern eine Mitbeeinflussung des Corticosteron-Spiegels bekannt ist, wurden diese für alle drei durchgeführten Versuchsdurchläufe standardisiert. Hierdurch war es u.a. möglich, auch jahreszeitlich bedingte Schwankungen, z.B. in Temperatur und Helligkeit zwischen den Versuchsdurchläufen zu verhindern und so eine möglichst unverzerrte Beurteilung des Stressoren-Potentials von Probenentnahme und Handling bzw. der generellen Wirkung des Klicker-Trainings auf das Stressempfinden der Hühner zu gewährleisten. In Ergänzung zu den Angaben der Richtlinie 2010/63 EU wurden vor allem für die Parameter Licht, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Platzangebot die bestehenden Regelungen durch ergänzende Hinzuziehung der Leitlinie 2007/526/EG, der deutschen TierSchNutzV (BMJ), der Empfehlungen der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (=TVT) oder durch Werte aus der Literatur konkretisiert bzw. über die bestehenden Mindestvorgaben hinausgehende Maßstäbe angewandt.

Um einer vielfach beschriebenen Beeinflussung des Corticosteronspiegels durch zu niedrige (Qureshi et al. 2020; Qureshi et al. 2018; Scanes 2016) bzw. zu hohe (Hasan Siddiqui et al. 2020; Hartanto et al. 2019; Zaboli et al. 2019; Scanes 2016) Stalltemperaturen vorzubeugen, wurden im Rahmen der hier durchgeführten Studie alle Tiere in klimatisierten und bei 23°C konstant temperierten Stallräumen gehalten. Orientiert wurde sich hierfür an der Leitlinie 2007/526/EG der Europäischen Kommission, die für die Unterbringung von Hühnern in Versuchstierhaltungen ab einem Lebensalter von 35 Tagen eine Raumtemperatur von 15-25°C vorgibt sowie an Freeman (Freeman 1984, zitiert nach Neff 2000; Freeman 1966), der

für Legehennen einen Temperaturbereich bei 12°C bis 25,5°C und für Hennen zu Beginn ihrer Legetätigkeit 22°C bis 27°C als thermoneutrale Zone angibt. Da aber gerade im Falle zu hoher Temperaturen auch die natürlichen Temperaturregulationsmechanismen des Huhnes – allem voran das Hecheln und die passive Wasserdampfabgabe über die Haut (Nichelmann 1999) - im Blick behalten und deren möglichst effektive Funktionsfähigkeit gestützt werden sollten, wurde zudem darauf geachtet, die relative Luftfeuchtigkeit in einem Bereich von 65% zu halten, was sowohl von Möbius 2010 und Fölsch et al. 1989 als auch in der Leitlinie 2007/526/EG als geeignet angegeben wird.

Neben Temperatur und Luftfeuchtigkeit, haben auch Faktoren wie Beleuchtung, Besatzdichte oder Ammoniumkonzentration in Geflügelställen eine nicht zu unterschätzende Bedeutung als Stressoren (Li et al. 2019; Wang et al. 2019; Nissa et al. 2018; Park et al. 2018; Kang et al. 2016; Scanes 2016; Huth und Archer 2015). Im Falle unserer Studie war die Versuchstierhaltung automatisiert belüftet und durch Tageslicht sowie Tageslichtlampen gleichmäßig beleuchtet. Bei den Tageslichtlampen wurde den TVT-Empfehlungen gefolgt, indem darauf geachtet wurde, flimmerfreie Lampen zu verwenden, um so die Qualität des Lichts an das arteigene Sehempfinden der Hühner (Lisney et al. 2011) anzupassen. Für die Dauer und die Intensität der täglichen Beleuchtung wurde sich an den Empfehlungen der TVT sowie an der TierSchNutzTV orientiert, die als maximale Hellphase eine Zeit von 14 Stunden und für die Dunkelphase eine Mindestzeit von durchgängig 8 Stunden bei <0,5 Lux sowie zwei Dämmerungsphasen von jeweils 45 min vorgeben. Im Hinblick auf die Beleuchtungsintensität der Hellphase wurde ein Gallilux-Meter verwendet, um die Vorgabe der TierSchNutzTV von 150 – 225 Lux auf 200 Gallilux (empfohlen laut TVT) zu konkretisieren und damit der zum Menschen unterschiedlichen Helligkeitssensivität des Huhnes gerecht zu werden. Die Reinigung der Tierhaltung erfolgte täglich, wodurch auch zu hohe Ammoniakkonzentrationen kein Problem darstellten. Im Hinblick auf die Besatzdichte empfiehlt die TVT eine Maximalbesetzung von 15 Tieren auf 3m² nutzbarer Bodenfläche. Damit liegt sie noch über den Angaben der Tabelle 8.1. des Anhang III der RL 2010/63/EU, nach der bis zu 22 Hühner mit einem Körpergewicht von 1200 bis 1800 g (entspricht dem Gewicht der Lohman Selected Leghorn) auf einer Fläche von 2,5m² gehalten werden dürfen bzw. der dieser Regelung entsprechenden TierSchNutzTV mit 9 Legehennen pro Quadratmeter. In unserem Versuch stand jeder Gruppe mit einer Grundfläche von 4 m² deutlich mehr Platz zur Verfügung. Zudem lag auch die Höhe der jeweiligen Stallbereiche mit drei Metern ebenfalls über den Angaben der TVT (200 cm) bzw. deutlich über den Angaben der oben angeführten Richtlinie/Verordnung (75cm).

5.4.4.2 Fütterung und Corticosteron

Neben den Stall-gekoppelten Stressoren nennen Scanes (2016) sowie Najafi et al. (2016), Bowling et al. (2018) oder Yan et al. (2021) auch das Fütterungsregime als bedeutenden Einflussfaktor auf die Plasma-Corticosteronspiegel und damit auf das Stressempfinden von Hühnern. Gar eine morphologische Veränderung der Nebennieren sowie des Zellkerndurchmessers der corticalen und medullären Nebennierenzellen bei Nüchternstress fanden Quadir et al. (2017). Zwar wurden die meisten Untersuchungen, die den Einfluss des Fütterungsregimes auf das Stressempfinden von Hühnern beschreiben, an Mastlinien durchgeführt, doch können ähnliche Resultate auch für intensive Legerassen, wie die in dieser Studie verwendeten Lohmann Selected Leghorn vermutet werden. Da diese, wie auch die intensiven Mastlinien durch einen hohen Energiebedarf gekennzeichnet sind, stand den Tieren dieser Studie eine ad libitum Fütterung mit einem standardisierten Legehennenfutter zur Verfügung.

5.4.4.3 Legeperiode, Mauser, Pathogene und Corticosteron

Was die Legelinien von den Mastlinien unterscheidet, ist die Legeperiode als gewichtiger, den Organismus belastender Faktor. So fanden Bortolotti et al. (2008), dass die Corticosteron-Konzentration in natürlich gemauserten Flankenfedern weiblicher Vögel stark und positiv mit der Anzahl der in den letzten Monaten gelegten Eier korreliert. Die hohe Legeleistung von bis zu 327 Eiern innerhalb der ersten 72 Lebenswochen bei den in dieser Studie verwendeten Lohmann Selected Leghorn (Lohmann-Breeders; Onlinepräsenz) stellt daher sowohl per se bereits eine hohe Belastung für den Organismus dar, kann aber in Ergänzung dazu auch anderen Stressoren (z.B. der Interaktion mit Artgenossen am favorisierten Nistplatz) als Wegbereiter dienen. Ähnlich hierzu, birgt auch die (forcierte) Mauser bei Legehennen (Hu et al. 2019; Mert und Yildirim 2016) ein hohes Belastungspotential.

Als weiterer, potentieller Einflussfaktor auf die Höhe des Corticosteronspiegels im Hühnerblut gilt die Konfrontation des jeweiligen Organismus mit Pathogenen, wie Parasiten, Viren oder Toxinen (Davidson et al. 2020; Sokol et al. 2019; Antonissen et al. 2017; Scanes 2016; Kowalski et al. 2006). Auch ein Pathogen-Kontakt im Rahmen von Impfungen aktiviert nach Koolhaas et al. (1999) durch die hierdurch ausgelöste immunologische Belastung direkt oder indirekt die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Hierdurch erhöhte Werte von adrenocorticotropem Hormon und Corticosteron im Serum und zusätzlich Veränderungen in der H:L-Ratio fanden auch Li et al. (2020) sowie Kaab et al. (2018).

Alle Tiere der drei Versuchsdurchläufe dieser Studie befanden sich in der gleichen Altersklasse. Dies hatte zur Folge, dass bei allen Tieren die Legeperiode nahezu zeitgleich einsetzte und eine Mauser im Versuchszeitraum nicht stattfand. Um die Tiere vor schädlichen

Einflüssen durch Krankheitserreger zu schützen, durchliefen sie bereits in ihrem Herkunftsbetrieb ein umfangreiches Impfprogramm. Um nicht durch die Impfung an sich eine Verfälschung der Corticosteronwerte zu bewirken, lag zwischen der letzten Impfung und der ersten Probennahme stets ein Zeitraum von mehr als einem Monat. Einer möglichen negativen Beeinflussung der Studientiere durch Parasiten, wie z.B. der roten Vogelmilbe, wurde in allen Versuchsdurchläufen durch spezielle Milbenfallen in den Volieren begegnet. Durch diese hätte eine Milbenproblematik frühzeitig entdeckt und behoben werden können. Zudem fanden routinemäßige Kotuntersuchungen zum Zwecke eines Endoparasiten-Monitorings statt. Das den Tieren angebotene Futter und Wasser wurde täglich erneuert, um auch hier Erregern wie z.B. Schimmelpilzen kein Wachstumsmilieu zu bieten und so eine Anreicherung und Aufnahme von Toxinen zu vermeiden.

5.4.5 Eignung von Feder-, Speichel- und Plasma-Corticosteron zur Beurteilung von Stresssituationen

Zwar wurde in dieser Studie versucht, für die hier genutzten Tiere eine gute Haltung zu gewährleisten und so gerade für das „stress-sensible“ Corticosteron möglichst alle Störparameter zu standardisieren und abzumildern, doch sollte dennoch die alleinige Konzentration dieses Hormons nicht als ausschließliches Kriterium zur Beurteilung einer Stresssituation herangezogen werden. Vielmehr empfiehlt Scanes (2016) eine Mitberücksichtigung anderer Glucocorticoide und auch des CBP. Da weiterhin bezüglich der Extraktion von Corticosteron aus Blut und Federn kein einheitliches Verfahren etabliert ist und auch die verschiedenen Assays unterschiedlich arbeiten, sollten die gemessenen Corticosteron-Konzentrationen stets nur als relative Werte - z.B. im Vergleich zweier Gruppen - und nicht als absolute Werte verstanden werden (Rød et al. 2017). Auf Grund der Vielzahl der Parameter, die rasch erheblichen Einfluss auf die Corticosteron-Werte nehmen können, im Hinblick auf die Tatsache, dass in dieser Studie selbst innerhalb einer Gruppe zum Teil recht breite Spannbreiten der Konzentrationen feststellbar waren und auch unter Berücksichtigung der hier durchgeführten Verifizierung, die selbst innerhalb eines Tieres bisweilen weite Variationen aufzeigt, wurde für die hier vorliegende Arbeit einer weiteren Empfehlung Scanes (2016) gefolgt. Dieser sieht eine sinnvolle Ergänzung von Corticosteron-Messungen in Verhaltensstudien. Seiner Ansicht nach sind die hierbei zu beobachtenden Reaktionen gut quantifizierbar und zudem weitgehend mit vorgefassten Ansichten über das Wohlbefinden des Huhnes abgleichbar. Dies wiederum ermöglichte ferner, diese zu den ermittelten Corticosteron-Werten in Bezug zu setzen.

Zur Ermittlung der in ihnen enthaltenen Corticosteron-Konzentrationen, sollte zudem eine Kombination aus Probenarten angestrebt werden, die einerseits eine Aussage zum aktuellen Spiegel ermöglichen und andererseits aus solchen, die durch eine Einlagerung des

Corticosterons gekennzeichnet sind. Hierdurch ist eine Differenzierung zwischen kurzem und längerfristigem Stressempfinden möglich.

Im Hinblick auf die Entnahme der Speichelprobe sollte zudem bedacht werden, dass auf diese durch das in dieser Studie jeweilig beprobte Huhn, im Vergleich zur Blutprobenentnahme, mit deutlich stärkeren Abwehrbewegungen reagiert wurde. Der Grund hierfür könnte in der umfangreichen Fixierung von Schnabel und Kopf des jeweilig beprobten Huhnes zu finden sein, wodurch diese Art der Probenentnahme vom Tier als eine deutlich größere Belastung empfunden wird, als die ledigliche Punktion der Flügelvene zur Gewinnung einer Blutprobe. Wird bei größeren (Versuchs-) Tieren, wie z.B. Wiederkäuern oder Hunden die Gewinnung einer Speichelprobe auf Grund der Nicht-Invasivität meist als nicht bzw. wenig belastend eingestuft (Lensen et al. 2015; Hernandez et al. 2014; Chacón et al. 2004; Kobelt et al. 2003; Vincent und Mitchell 1992), so sollte sie beim Huhn oder auch bei anderen kleinen (Versuchs-)Tieren stets differenzierter betrachtet werden.

5.5 Verhaltenstests

5.5.1 Open Field Test / New Area Test 1 + 2

Entsprechend den Empfehlungen Scanes' (2016) sowie Gross und Siegels (1983) wurden auch in dieser Arbeit die labordiagnostischen Tests durch zwei New Area Tests und einen New Object Test ergänzt. Zusätzlich hierzu wurde der im Rahmen der New Area Tests abgesetzte Kot nach Anzahl und Konsistenz beurteilt, um auch hieraus Rückschlüsse auf die Brain-Gut-Axis (Filaretova und Bagaeva 2016) und damit auf das Stressempfinden der Tiere ziehen zu können.

Wie schon Walsh und Cummins (1976) berichten, sollte bei der Auswertung von Open Field Tests möglichst nicht nur ein einzelner Parameter isoliert betrachtet, sondern dieser stets im Zusammenhang mit anderen Faktoren beurteilt werden. Nur so kann die Gefahr einer zu umfangreichen Verallgemeinerung vermieden und eine richtige Interpretation gewährleistet werden. Und so wurden auch für diese Studie die bewerteten Verhaltensweisen so gewählt, dass sie einerseits den Einblick in das aktuelle Stressempfinden der Tiere, andererseits aber auch eine Interpretation ihrer Resilienz bezüglich der dem jeweiligen New Area Test vorausgegangenen (Stress-)Situationen ermöglichten. Ergänzend hierzu sollte die Frage geklärt werden, ob es durch das Klicker-Training der Trainingsgruppentiere und den damit einhergehenden täglichen neuen Eindrücken und Lernerfolgen eventuell möglich wurde, diesen Tieren ein größeres Selbstvertrauen, z.B. für den Fall einer sozialen Isolation anzutrainieren.

Eine Aussage hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung von Selbstbewusstsein und Resilienz der Trainingsgruppentiere und hiermit einhergehender größerer Unempfindlichkeit dieser Individuen gegenüber sozialer Isolation, sollte durch die Fortbewegungsrate der Tiere ermöglicht werden (Tabelle 22, Abbildung 11). Das aktuelle Stressempfinden sollte durch die Anzahl der vom jeweils beobachteten Tier getätigten (Futter-) Pickaktionen bewertet werden (Tabelle 22, Abbildung 12). Die Bewertung des zurückliegenden Stressempfindens, ausgelöst durch Einfangen, Handlings- und Probenentahmesituation (New Area Test 1) bzw. Einfangen und unmittelbares Verbringen in den neuen Raum (New Area Test 2), erfolgte Anhand des durch axiales Körperschütteln gekennzeichneten „Verhaltens der Neuordnung“ (Tabelle 22, Abbildung 13).

5.5.1.1 Fortbewegung

Ein Begriff, der im Rahmen von Open Field Tests und gerade im Zusammenhang mit Hühnern aber auch mit Ratten oder Mäusen häufig Erwähnung findet, ist der des sogenannten Freezings (Lages et al. 2021; Campbell et al. 2019a; Smith 1978). Das sich hinter diesem Begriff verbergende „Verharren“ oder „Erstarren“ gilt als typisches Verhalten von Flucht- oder Beutetieren, die sich plötzlich und ohne Schutz- oder Deckungsmöglichkeiten mit einer offenen, unbekanntem Fläche – einem Open Field - konfrontiert sehen.

Doch, da mit der Durchführung dieses Tests in der Regel auch eine Trennung des zu testenden Einzeltieres von seiner Gruppe einhergeht, kann neben diesem Verhalten, welches das Tier vor dem Angriff durch Prädatoren schützen soll, oftmals auch jenes Verhalten beobachtet werden, welches dem Tier die Wiedervereinigung mit seiner Gruppe ermöglichen soll (Jones et al. 1995; Suarez und Gallup 1985; Suarez und Gallup 1981). Zwar fanden Suarez und Gallup (1983), dass dieses Bestreben nach Wiedervereinigung bei Küken größer ist, als bei ausgewachsenen Tieren und dieses erst mit zunehmendem Alter zugunsten der Feindvermeidungstaktik (Freezing) abnimmt, doch wurde für unsere Versuche dennoch erwartet, ebenfalls tendenziell eher Wiedervereinigungsbestrebungen zu beobachten. Grund hierfür war zum einen, dass die Tiere nicht in einem wirklichen großräumigen Open Field mit dementsprechend großem „Gefahrenpotential“ getestet wurden, sondern lediglich in ihrem „Heimatstall“ benachbarten Stallräumen. Diese zur Verfügung stehenden Räume – hier als New Area bezeichnet - ähnelten in ihrer akustischen und räumlichen Gestaltung der des „Heimatstalles“ und auch Geräusche aus diesem, wie z.B. das Gackern der anderen Gruppenmitglieder, drang bisweilen in diese vor. Somit war zu erwarten, dass das Wissen um die Nähe der anderen Gruppenmitglieder, in dem jeweils isolierten Tier rasch das Bestreben erzeugen würde, einen Weg zu diesen zurückzufinden. Diesem Bestreben, für das Vallortigara et al. (1990) in sogenannten Runway-Tests gar eine größere Tendenz bei Hennen, als bei Hähnen beschreiben, sollte auch durch die Anwesenheit des die Tiere beobachtenden

Menschen in der New Area nicht abgemildert sein. Diesbezüglich geben zwar Gallup et al. (1990) sowie Gallup und Suarez (1980) zu bedenken, dass diese im Open field / in der New Area vom Huhn als potentieller Feind interpretiert und so Auslöser für vermehrtes Freezing sein können, doch wurde dieser Gefahr in unsere Studie dadurch vorgebeugt, dass die im Test befindliche Person den Tieren bereits aus der täglichen Trainings-, Fütterungs- und Stallroutine bekannt war.

Die Tiere der Trainingsgruppe wurden für das Klicker-Training täglich von ihren Gruppenmitgliedern getrennt. Zwar hatte hierbei jedes aktuell trainierte Tier stetigen Blickkontakt zu den anderen Gruppenmitgliedern, war aber dennoch in gewisser Weise von diesen isoliert. Dennoch reichte dieses Training nicht aus, das Selbstbewusstsein des sozial lebenden Tieres Huhn so weit zu stärken, als dass in diesem die Akzeptanz eines so starken Eingriffs, wie dem der räumlichen Abtrennung von der Gruppe, eingestellt werden konnte. Das durch die Fortbewegung um Tierlängen gekennzeichnete Bestreben der Tiere beider Gruppen zur Wiedervereinigung mit ihren Artgenossen unterscheidet sich nur marginal und beschreibt lediglich tendenziell einen für die Trainingsgruppentiere geringeren „Wiedervereinigungsdrang“ (Tabelle 22, Abbildung 11).

5.5.1.2 (Futter-) Picken

5.5.1.2.1 Ethologische Betrachtung

Die Konfrontation der Hühner mit den neuen Räumen der New Area Tests kann, auch wenn sich das Verhalten der Tiere eher durch den „Wiedervereinigungsdrang“ mit der Gruppe als durch Freezing auszeichnete, als potentiell stressig eingeschätzt werden. Die Tiere waren einem neuen Raum ausgesetzt, in dem sie - gemäß ihrer Beutetier-Natur - stets mit potentiellen Gefahren rechnen mussten. Dieser Gefahr durch möglichst wenig Eigenbewegung vorzubeugen, stand das Bestreben des jeweilig getesteten Einzeltieres gegenüber, einen Weg zu seiner Gruppe zurückzufinden. Ein daraufhin häufig in die Fortbewegung der Tiere zwischengeschaltetes Verhalten war das Picken nach vermeintlich vorliegendem Futter. Dieses Picken glich weniger dem einer kontinuierlichen Nahrungsaufnahme, sondern war vielmehr durch häufige Unterbrechungen und Rundumblicke gekennzeichnet. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass es sich hierbei um ein typisches Beispiel der bereits von Tinbergen (1940) beschriebenen Übersprungshandlung handelt. Bei dieser resultiert aus einer Konfliktsituation zwischen einem Verhalten A (hier Freezing) und einem Verhalten B (hier Bewegung zur Wiedervereinigung mit der Gruppe) ein Verhalten C, welches mitunter als für die Situation unangebracht erscheint. Da in den New Area Tests der Angriff durch einen Feind ausblieb, die Situation für das Tier dennoch ungewohnt und zeitgleich der Drang zur Wiedervereinigung mit der Gruppe

vorhanden war, kann die Motivation der getesteten Tiere bezüglich des Verharrens als auch hinsichtlich der Bewegung als ähnlich stark eingeschätzt werden. Dies hatte zur Folge, dass sich mit dem Picken nach vermeintlichem Futter und dem Bepicken von Wänden oder Boden somit das (Übersprungs-) Verhalten C einstellte.

Futterpickverhalten wurde von den Tieren der Trainingsgruppe im New Area Test 1 signifikant und im New Area Test 2 tendenziell weniger gezeigt (Tabelle 22, Abbildung 12) als von denen der Kontrollgruppe. Erstgenannte bewegten sich zwar im New Area Test 1 nicht signifikant weniger fort als die Kontrollgruppentiere, dennoch ist beim Vergleich der Boxplots ein tendenzieller Gruppenunterschied erkennbar. Wenn auch nur angedeutet, so weist dieser Unterschied den Trainingsgruppentieren einen scheinbar geringeren „Wiedervereinigungsdrang“ mit ihrer Gruppe zu als den Kontrollgruppentieren. Dies, zusammen mit ihrem durch das Klickern gestärkten Selbstbewusstsein, lässt sie neuen Situationen gegenüber offener erscheinen und somit auch im Rahmen des New Area Tests 1 entspannter bleiben. Hierdurch reduzierte sich in dieser Gruppe der Konflikt zwischen Freezing (Verhalten A) und der Bewegung zur Wiedervereinigung mit der Gruppe (Verhalten B) und somit die daraus resultierende Ausprägung des Verhaltens C.

Das dies für den New Area Test 2 nicht in gleicher Weise erkennbar wird, könnte darin begründet liegen, dass dieser auf Grund seiner Unvermitteltheit (Tiere direkt aus der Gruppe in den neuen Raum gesetzt) auch für die Trainingsgruppentiere noch immer mehr Aufregung bedeutete, als der New Area Test 1, auf den diese durch das Klickern während der 2.+3. Probenentnahme mental besser „vorbereitet“ waren.

5.5.1.2.2 Biochemisch-ethologische Betrachtung

In der Literatur findet sich für das Verhalten der Übersprungsbewegung auch Kritik. So fehlt nach Zippelius (1992) die Möglichkeit, tatsächlich feststellen zu können, ob in einer bestimmten Situation die Trigger für Verhalten A und Verhalten B tatsächlich gleich stark sind, was nur so ein Verhalten C bewirken würde. Will man sich daher von der ethologischen Idee der Übersprungsbewegung entfernen und alternativ dazu das gezeigte Pickverhalten doch als tatsächlichen Versuch der Futterraufnahme und aus biochemischer Perspektive bewerten, so empfiehlt sich hierfür ein Vergleich zwischen der Beobachtung im New Area Test 1 und den ermittelten Corticosteronwerten der 2.+3. Speichel- und Plasmaprobe. In diesem Vergleich können womöglich erste Anzeichen der allmählich aktivierten sogenannten Stress-Appetit-Achse erkannt werden. Denn, blickt man auf die ermittelten Corticosteronwerte, so waren diese - analog zum Futterpickverhalten im sich diesen Probenentnahmen anschließenden New Area Test 1 - bei den Trainingsgruppentieren signifikant bzw. tendenziell geringer, als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Da die für Säugetiere bekannte, den Appetit anregende

Wirkung von Glucocorticoiden auch für Corticosteron bekannt ist (Sominsky und Spencer 2014; Fries und Kirschbaum 2009; Bhatnagar et al. 2000), unterstreicht das geringere Futterpickverhalten der Trainingsgruppentiere somit die Aussage der gemessenen Speichel- und Plasmacorticosteron-Werte und schreibt dieser Gruppe im Resultat ein signifikant (New Area Test 1) bzw. tendenziell (New Area Test 2) geringeres Stressempfinden zu als den Tieren der Kontrollgruppe.

5.5.1.3 Schütteln als „Verhalten der Neuordnung“

Das „Schütteln“ der Hühner wurde im New Area Test nicht, wie meist in anderen Verhaltensstudien, ähnlich einem Putz- oder Kratzverhalten als Komfortverhalten interpretiert, sondern vielmehr als Reaktion der Tiere auf ein individuelles Störepfinden hinsichtlich ihrer inneren Integrität durch das vorausgegangene Fang-, Immobilisations- und Handlingsprozedere.

Diese Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der individuellen Körperintegrität wird durch Schmidt (2008) als aktiver Prozess beschrieben und findet auch bei Pastore et al. (2011) zur Beurteilung von Agility-Hunden nach stressintensiven Wettkämpfen Verwendung. Im Rahmen der hier durchgeführten New Area Tests wurde das Schütteln folglich als „Verhalten der Neuordnung“ bezeichnet. Beobachtet werden kann dieses Verhalten beim Huhn oftmals auch in natürlichen Situationen, wie z.B. nach dem Tretakt (Fölsch und Vestergaard 1981), nach Rangordnungskämpfen oder nach missglückten Prädationsversuchen durch Beutegreifer. Durch Miteinbeziehung dieses Parameters sollte im New Area Test 1 das vorausgegangene Fangen sowie die Immobilisation bei Probenentnahme und Handling im Hinblick auf deren störenden Einfluss auf die jeweiligen Hühner bzw. deren Wahrnehmung diesbezüglich beurteilt werden. Im New Area Test 2 wurde hingegen nur die zeitlich kürzere, dafür allerdings unvermittelte Störung des abrupten Herausnehmens / -fangens aus der Gruppe beurteilt.

Die Auswertung des New Area Tests 1 zeigte, dass sich die zuvor trainierten Tiere der Trainingsgruppe nach dem Handling sowie der 2. und 3. Probenentnahme im p-Wert signifikant und mit einer mittleren Effektstärke (Cohen 1988) von 0,4 weniger schüttelten, als die Tiere der Kontrollgruppe (Tabelle 22, Abbildung 13). Auch im zweiten New Area Test zeigt sich dies als Trend mit gleicher Tendenz. Somit belegt das Schütteln als „Verhalten der Neuordnung“ im New Area Test 1, dass das diesem Test vorausgegangene Handling sowie die Probenentnahme von den Tieren der Trainingsgruppe als weniger störend empfunden wurde, als von den Tieren der Kontrollgruppe. Für Letztgenannte bedeutet jegliche Interaktion mit dem Menschen auf Grund fehlender Routine nach wie vor höheres Störungspotential, als für die durch das mehrwöchige Klicker-Training daran gewöhnten Tiere der Trainingsgruppe. Erfolgt allerdings, wie für den New Area Test 2, eine eher unvermittelte Herausnahme der Tiere aus

der Gruppe ohne ein vorausgehendes Klicker-Prozedere, so scheint dies auch durch die Tiere der Trainingsgruppe – wenn auch tendenziell geringer als durch die der Kontrollgruppe – als größerer Störimpuls empfunden zu werden.

5.5.1.4 Kotabsatz

Der bereits im Literaturteil erläuterte Zusammenhang zwischen Stress und Kotabsatz zeigt sich auch bei Beurteilung der im Rahmen der New Area Tests abgesetzten Kotballen. Die Gruppenunterschiede im Hinblick auf die Anzahl der abgesetzten Kotballen (Tabelle 24, Abbildung 14) zeigen sich zwischen den Gruppen zwar lediglich tendenziell, doch sprechen dafür deren Konsistenzen (Tabelle 24, Abbildung 15) den Trainingsgruppentieren ein signifikant niedrigeres Stressempfinden zu, als den Tieren der Kontrollgruppe. Damit entsprechen die Ergebnisse dieser Parameter denen des Verhaltens und schreiben den geklickerten Tieren ein geringeres Stressempfinden zu, als den Tieren der Kontrollgruppe. Der signifikante Gruppenunterschied im Hinblick auf die Kotkonsistenz bleibt zwar auch im zweiten New Area Test bestehen, zeigt allerdings auch hier - ähnlich der Verhaltensparameter und der Anzahl der Kothaufen – für beide Gruppen sowohl die Annäherung zueinander als auch die als Maß für höheres Stressempfinden zu interpretierende stärkere Abnahme der Kotkonsistenz. Zwar bleibt eine Abnahme der Konsistenz und eine Zunahme der Kotabsatzfrequenz bis hin zu dem von Pees und Pees (2008) beschriebenen perakuten Durchfall aus, doch lässt sich dennoch eine Auswirkung von Handling-/Probenentnahmestress und situationsbedingtem Stress des jeweiligen New Area Tests auf die *Brain-Gut-Axis* der Studientiere belegen. Erkennbar in beiden Gruppen beim Vergleich von New Area Test 1 mit New Area Test 2, scheint die Auswirkung auf bzw. die Wahrnehmung durch die Tiere der Trainingsgruppe hierbei allerdings geringer zu sein als bei den Tieren der Kontrollgruppe.

5.5.1.5 Zusammenfassung New Area Test

Auffallend für die Verhaltensparameter ist, dass sich die im New Area Test 1 noch vorhandenen signifikanten Gruppenunterschiede bei Futterpicken und Schütteln hin zum New Area Test 2 verlieren. Zwar bleiben sie als Trends, wie auch die Tendenzen bei Fortbewegung und Anzahl der abgesetzten Kothaufen erkennbar, doch kann für beide Gruppen sowohl ein Ansteigen als auch ein Angleichen der Parameter erkannt werden. Der signifikante Gruppenunterschied im Hinblick auf die Kot-Konsistenz bleibt zwar für beide New Area Tests bestehen, zeigt allerdings im New Area Test 2 ebenfalls eine tendenzielle Annäherung beider Gruppen.

5.5.2 New Object Test

Von sogenanntem „*Enviromental Enrichment*“ - also der Anreicherung des Stalls mit unterschiedlichen Beschäftigungsmaterialien - ist bekannt, dass hierdurch die Empfindlichkeit

von Hühnern in angst- oder stressauslösenden Situationen verringert werden kann, die Tiere besser in der Lage sind, sich im Nachhinein von diesen Situationen zu erholen und es ihnen zudem auch leichter fällt, sich insgesamt besser an Neuartiges anzupassen (Ross et al. 2020; Campbell et al. 2019b; Reed et al. 1993; Jones 1982). Durch die Bereitstellung vielfältiger auf sie einwirkender Reize können sich die Hühner so eine größere Widerstandsfähigkeit bezüglich neuer Situationen aneignen, als dies für reizärmer gehaltene Hühner der Fall ist. Dass ein so geschaffenes „*Enrichment*“ auch durch spezielle Trainingsmethoden, wie das Klicker-Training möglich ist und hierdurch gar noch mehr - als „*kognitives Enrichment*“ - der Stärkung des Selbstbewusstseins und der Offenheit der Tiere und so der Verbesserung des Tierwohls dienlich sein kann, zeigen sowohl bereits Arbeiten mit anderen Tierspezies (Thomsen und Kousholt 2021; Kogan et al. 2017; Leidinger et al. 2017) als auch die in dieser Studie durchgeführten New Area Tests.

Mit dem New Object Test wurde ein die New Area Tests ergänzender Test durchgeführt, bei dem der Faktor der sozialen Isolation ausgeschlossen und die Tiere in ihrer gewohnten Gruppe sowie in vertrauter Umgebung mit einem neuartigen Objekt im Futtertrog konfrontiert wurden. Es zeigt sich, wenn auch wieder nur tendenziell, eine geringere Skepsis bzw. Furcht der zuvor stärker kognitiv geforderten Trainingsgruppentiere im Vergleich zu den Kontrollgruppentieren. Gut veranschaulicht durch den Vergleich der geschätzten Randmittel zeigt sich so, dass die trainierten Tiere dem neuen Objekt in ihrem Futtertrog weniger Skepsis entgegenbringen und tendenziell eher am Trog fressen (Tabelle 25, Abbildung 16), als die Tiere der Kontrollgruppe. Zudem scheuten die geklickerten Tiere auch geringere Abstände zum New Object nicht (Tabelle 27, Abbildung 17), was ebenfalls als Zeichen geringerer Furcht interpretiert werden kann.

5.6 Zusammenfassende Betrachtung der Untersuchungsergebnisse

Zusammenfassend zeigen die Resultate aller in dieser Arbeit durchgeführten Tests, dass eine positive Beeinflussung des Stressempfindens bei zu Versuchszwecken gehaltenen Hühnern durch Klicker-Training möglich ist. Auch eine Stärkung der Offenheit der Tiere bezüglich neuer Situationen ist nach dem dreiwöchigen Trainingsabschnitt tendenziell erkennbar. Festzustellen bleibt allerdings auch, dass ein dreiwöchiges Klicker-Training nicht ausreicht, um Stressresistenz und Resilienz der Tiere so nachhaltig zu stärken, dass dieser Effekt auch bei länger anhaltenden bzw. hinsichtlich neuer und unvermittelt eintretender Stresssituationen bestehen bleibt. So kann z.B. ein Anfluten des Corticosterons bei den geklickerten Tieren zwar im Speichel signifikant und im Plasma tendenziell verzögert werden, jedoch verliert sich dieser Effekt im Laufe eines 10-minütigen Handlings. Auch Stress durch unvermittelt eintretende neue Situationen, wie im New Area Test 2, die also nicht im Rahmen oder direkt im Anschluss

an die gewohnte Klicker-Routine stattfinden, kann durch die Hühner schlechter kompensiert werden.

Und so kann ein dreiwöchiges Klicker-Training durch die dennoch und unstrittig erkennbare positive Verhaltensbeeinflussung zwar als geeignete Maßnahme des *kognitiven Enrichments* angesehen werden, weiterführende Studien sollten aber dennoch die Frage klären, ob die oftmals nur tendenziell erkennbaren Gruppenunterschiede durch längere Trainingsperioden an Signifikanz gewinnen können. Hierbei sollte dann allerdings auch das grundsätzliche Stressor-Potential der Blutprobenentnahme sowie das eines Handlings im Rahmen einer Allgemeinuntersuchung überdacht werden. Denn wie z.B. aus H:L-Ratio oder Feder-Corticosteron ersichtlich wird, scheint auch eine mehrwöchige Konfrontation der Versuchstiere mit diesen Situationen im Rahmen des Trainings in diesen keine höheren Stresspegel bewirkt zu haben, als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Auch beim Vergleich der in dieser Studie ermittelten Plasmacorticosteron-Werte mit denen anderer Arbeiten, finden sich diese im unteren Bereich. Der üblicherweise kurze Moment einer Blutprobenentnahme scheint somit auch für das Huhn nur eine geringe Belastung darzustellen. Und auch das Stressor-Potential einer routiniert durchgeführten Allgemeinuntersuchung kann allem Anschein nach nicht mit wirklicher Immobilisation, wie sie z.B. durch Flügelkreuzen erreicht werden kann, gleichgesetzt werden.

Soll über die Notwendigkeit eines vorgeschalteten Klicker-Trainings zur Stressminderung beim Huhn in Tierversuchen entschieden werden, so ist in jedem Fall der Belastungsgrad und der Umfang des geplanten Versuches zu berücksichtigen. Ist z.B. lediglich die als gering belastend einzustufende Gewinnung einzelner Blutproben vorgesehen, sollte zuvor frei nach dem Grundsatz der Verhältnismäßigkeit eine Abwägung erfolgen, ob eine Verlängerung des Versuchszeitraumes um drei bzw. vier, fünf, sechs oder mehr Wochen für ein die Probenentnahme vorbereitendes Klicker-Training als gerechtfertigt und verhältnismäßig anzusehen ist. Übersteigt der Versuchsumfang allerdings z.B. das Maß einzelner Blutproben, schließt umfangreichere und längerfristige Fixation mit ein als im Rahmen einer Allgemeinuntersuchung üblich oder kann der Versuch einem insgesamt höheren Belastungsgrad zugeschrieben werden, sollte eine dahingehend ausgerichtete, vorausgehende sowie den Versuch begleitende Klicker-Konditionierung erwogen werden.

5.7 Beleuchtung anderer Parameter zur Beurteilung des Klicker-Trainings

Für eine gute und aussagekräftige Einschätzung zu Wirkung und Erfolg des Klicker-Trainings auf das Stress- und Angstverhalten beim Huhn ist es wichtig, die richtigen Parameter zur Beurteilung heranzuziehen. So ergäben sich neben den hier gewählten Probenarten Plasma, Speichel und Feder theoretisch auch andere Ausgangsmaterialien, wie Kot, Eier,

Tränenflüssigkeit oder Gewebe, um die darin enthaltenen Corticosteron-Konzentrationen zu bestimmen. Zusätzlich hierzu ließe sich auch mit Hilfe metabolischer oder klinischer Untersuchungen das aktuelle Stressempfinden bzw. dessen Beeinflussung durch ein durchgeführtes Klicker-Training erfassen. Hierbei sollte jedoch stets bedacht werden, dass das Klicker-Training an sich und auch andere im Rahmen des Versuchs auftretende Begleitumstände nicht jeden Parameter als zur Beantwortung der in dieser Studie beleuchteten Fragestellung geeignet erscheinen lassen.

5.7.1 Corticosteron im Kot

Kot, als nicht-invasiv gewonnenes Probenmaterial, ist besonders im Bereich der Stressforschung beim Tier gut geeignet. Allerdings geben Möstl et al. (2005), Palme et al. (2005) sowie Palme (2005) zu bedenken, dass es sich hierbei auch um ein weitaus komplexeres Ausgangsmaterial handelt, als es z.B. bei Plasmaproben der Fall ist. Dies kann eine in der Probenmatrix begründete Beeinflussung der Testergebnisse sowie eine zeit- und kostenaufwendige Probenaufbereitung zur Folge haben. Zusätzlich verlangt die beim Vogel notwendige Trennung von Kot- und Harnteil (Hirschenhauser et al. 2012; Möstl et al. 2005), die von Zäkal- und Rektumkot (Klasing 2005) sowie die Kenntnis zu molekularen und chemischen Eigenschaften der Hormon-Metaboliten ein weitaus größeres Fachwissen des Untersuchenden. Beachtet werden sollte zudem, dass neben den in dieser Arbeit umfangreich beschriebenen Einflussgrößen, auch weitere Faktoren - wie z.B. Durchfall und damit einhergehende geringere bakterielle Metabolisierung oder ferner mögliche Kreuzreaktionen im Assay - Einfluss auf die Messergebnisse haben können (Möstl et al. 2005). Auch eine individuelle Zuordnung von Kotproben kann sich bei in Gruppen gehaltenen Tieren als schwierig erweisen sowie vorhandene Einstreu – grundsätzlich gut für das Tierwohl - zusätzliche Probenkontamination bewirken. Da sich zudem auch Metabolismus und Ausscheidung von Steroiden nicht nur zwischen einzelnen Arten oder Geschlechtern, sondern auch zwischen Individuen unterscheiden können (Goymann 2005; Palme 2005; Palme et al. 2005), muss diese nicht-invasive Methode vor der Anwendung für jede neue Art streng validiert werden (Palme 2005; Palme et al. 2005). Zusätzlich sollte auch der Einfluss von Parametern wie Futtertyp und Fütterungsrate bedacht werden (Goymann et al. 2002), da sich die Diäten von Trainings- und Kontrollgruppe dieser Studie auf Grund des während des Trainings der Trainingsgruppe eingesetzten Belohnungsfutters unterscheiden. Aus diesen genannten Gründen wurde die Corticosteronbestimmung im Kot für diese Studie nicht in Betracht gezogen.

5.7.2 Corticosteron im Ei

Ein weiteres nicht-invasiv gewonnenes Probenmaterial zur Bestimmung der darin enthaltenen Corticosteronkonzentration sind die von den Hühnern gelegten Eier. Während Schwabl (1995) diesbezüglich noch zu bedenken gab, die Messung von Steroiden im Eigelb könne aufgrund des darin enthaltenen hohen Lipidgehaltes erschwert werden, finden sich dennoch einige Studien, die sowohl das Eiweiß als auch das Eigelb zur Analyse heranziehen. So fanden z.B. Singh et al. (2009), dass sich die Corticosteronkonzentration im Eidotter bei längerfristigen Stresssituationen analog zur H:L-Ratio entwickelt. Infolgedessen sehen die Autoren hier die Möglichkeit Stressempfindungen aus längerfristig bestehenden Situationen zu beurteilen. Singh et al. (2009) konnten gleichen Zusammenhang nicht für das - im Vergleich zu Dotter kurzfristiger gebildete - Eiweiß belegen, doch fanden diesen Downing und Bryden (2008) beim Vergleich mit der Corticosteronkonzentration im Blutplasma. Einen Zusammenhang zwischen der Corticosteronkonzentration von Ei und Blut fanden auch Cook et al. (2009), die eine positive Korrelation der sowohl im Eiweiß als auch im Eigelb gemessenen Corticosteronwerte mit denen aus 1-2 Tage zuvor gewonnenen Serumproben aufzeigen. Die Nutzung von Eiern als nicht-invasiv gewonnenes Probenmaterial ist eine gute Alternative, doch muss – soll nicht die Situation einer Gruppe beurteilt werden – die individuelle Zuordnung der Eier gewährleistet werden. Zudem sollten die gewonnenen Ergebnisse nicht als alleiniges Kriterium genutzt, sondern z.B. zu den Plasma-Corticosteronwerten oder der H:L-Ratio ins Verhältnis gesetzt werden. Zusätzlich finden sich gerade in jüngerer Zeit Stimmen, die den im Rahmen von Immuno-Assays oftmals auftretenden Kreuzreaktionen immer größere Bedeutung zumessen. So verwenden Caulfield und Padula (2020) bei der Analyse von Eiweiß die HPLC, kombiniert mit einer Massenspektrometrie. Im Ergebnis dieser Analysemethode stellten sie eine mittlere Corticosteronkonzentration von 50pg/g im Eiweiß fest und verweisen - vergleichend dazu - auf Ergebnisse anderer, auf Basis von Immuno-Assays erarbeiteten Studien, welche Werte von 0.5 bis 20 ng/g und damit deutlich höhere Corticosteronkonzentrationen im Eiweiß angeben. Die Autoren sehen in der Verwendung der HPLC die Analysemethode der Zukunft und zudem – als Resultat ihrer Studie - Eiweiß als nur begrenzt aussagefähig im Hinblick auf die Bewertung des Tierwohls bei Hühnern an.

Schaut man noch einmal zurück auf die Situation der Tiere in dieser Studie, so muss zusätzlich auch der Fakt Beachtung finden, dass sich das durchschnittliche Gewicht der in den Trainingsgruppen gelegten Eier auf Grund des fett- und eiweißreichen Käse-Bestandteils im Belohnungsfutter über die Wochen im Vergleich zu dem Gewicht der Eier in den Kontrollgruppen erhöhte. Dieser Größenunterschied der Eier und der damit einhergehende mögliche Unterschied ihres Corticosteron-Gehaltes macht diese für einen Vergleich der Gruppen anhand des in ihnen enthaltenen Hormons für diese Arbeit nicht praktikabel.

5.7.3 Corticosteron in Tränenflüssigkeit

Die von Caulfield und Padula (2020) verwendete HPLC in Kombination mit der Massenspektrometrie nutzen auch Pieragostino et al. (2017) zur Messung von Corticosteron und anderer Steroide in mittels Schirmertest 1 gewonnener Tränenflüssigkeit. Hierbei wird ein Teststreifen aus Lackmuspapier in den Bindehautsack des unbetäubten Auges eingehängt und die sezernierte Tränenflüssigkeit aufgefangen.

Die Studie von Pieragostino et al. (2017) wurde an Menschen durchgeführt. Zu einer Corticosteronmessung in Tränenflüssigkeit von Hühnern gibt es bisher noch keine veröffentlichten Studien. Als Alternative hierzu findet sich im veterinärmedizinischen Bereich die Messung von IgA (German et al. 1998; Florence et al. 1995; Sullivan und Allansmith 1984). Florence et al. (1995) fanden, dass die IgA-Spiegel in mittels Immunelektrophorese untersuchter Tränenflüssigkeit von Legehennen scheinbar durch hohe Plasmacorticosteronspiegel beeinflussbar sind und somit zur Beurteilung von Stresssituationen herangezogen werden könnten. Allerdings zeigt das Fehlen aktuellerer Studien, dass sich die Messung von Stresshormonen als die geeignetere Methode etabliert hat. Ungeachtet der jeweiligen Fragestellung sollte bedacht werden, dass die Fixation eines Huhnes zur Gewinnung von Tränenflüssigkeit - wenn auch von Florence et al. (1995) als nicht-invasiv beschrieben - auf Grund einer der Speichelprobenentnahme ähnlichen und verhältnismäßig starken Fixation, höheres Stresspotential für das jeweilige Tier bietet, als die Verwendung anderer Ausgangsmaterialien und somit selbst eine Belastung darstellt.

5.7.4 Corticosteron im Gewebe

Auch in anderen Geweben des Vogelkörpers, wie z.B. in Muskulatur, Leber, oder Gehirn lässt sich Corticosteron nachweisen (Newman et al. 2008; Dupont et al. 1999). Da diese Analysen bzw. die vorherige Probenahme allerdings mit der Tötung des Tieres verbunden wären, soll die Nutzung dieses Probenmaterials hier nicht weiter erläutert werden, da es für diese Studie unverhältnismäßig gewesen wäre, die Tiere für diesen Zweck zu töten.

5.7.5 Metabolische Stressparameter

Bisweilen finden sich Arbeiten, die zur Untersuchung einer stressbedingt erhöhten Corticosteron-Ausschüttung auch die Folgen der katabolen Wirkung dieses Glucocorticoids heranziehen. So fanden z.B. Jiang et al. (2008) bei Broilern erhöhte Plasmakonzentrationen von Glucose, Harnsäure, Triglyceriden, freien Fettsäuren, Low density-Lipoproteinen oder Insulin nach Corticosterongabe. Und auch für die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin konnten u.a. Neubert und Guertler (1996) bei Legehennen einen den Blutzuckerspiegel steigernden Effekt nachweisen. Einen im Zusammenhang mit höheren Corticosteronwerten

stehenden Abbau von Körperprotein fanden auch Nagra und Meyer (1963) sowie Siegel und Van Kampen (1984) nach längerfristiger Verabreichung von Corticosteron bei Mastgeflügel. Zusätzlich hierzu fördern Glucocorticoide auch die lipolytische Wirkung von Adrenalin, ACTH und Glucagon (Wellhöner 1975).

5.7.5.1 Glucose

Saleh und Jaksch (1977) fanden im Blut von Hühnern, die sie vor der Probenentnahme durch Umhertreiben beunruhigten, neben erhöhten Plasma-Corticosteronwerten auch für bis zu zwei Stunden erhöhte Glucose-Werte. Gleiches fanden auch Shini et al. (2009) nach Supplementierung von Corticosteron über das Trinkwasser. Würde somit eine Beurteilung des Stressempfindens bei den Tieren dieser Studie durch diesen Parameter im ersten Moment als geeignet scheinen, so sollte neben der zeitlichen Abfolge von Stresssituation und Probenentnahme auch die Abfolge von Futteraufnahme und Probenentnahme nicht unberücksichtigt bleiben. Denn, auch wenn u.a. Emmanuel et al. (1982) beschreiben, dass Hühner bei längeren Hungerperioden insbesondere durch massive Steigerung der Oxidation von β -Hydroxy-Butyrat ihre Glucose-Reserven schonen und dadurch erst spät Verschiebungen im Blutzuckerspiegel deutlich werden, so kann im Gegensatz dazu bei der (vermehrten) Aufnahme kohlenhydratreichen Futters die gleiche Physiologie erwartet werden, wie sie auch für andere Tiere beschrieben ist: Das den Klicker-Hühnern dargereichte Belohnungsfutter bestand aus einer Mischung verschiedener Getreide-, Mais- und Hirsesamen sowie geriebenem Emmentaler. Nimmt ein Organismus vermehrt Kohlenhydrate, wie z.B. Getreide auf, so wird die darin enthaltene Stärke im Dünndarm zum Monosaccharid Glucose gespalten und von den Mucosazellen der Darmwand resorbiert. Im weiteren Verlauf dieser gerade beim Huhn sehr effektiven (von Engelhardt und Breves 2010) Stärkeverdauung, wird die Glucose daraufhin ins Blut abgegeben, um anschließend zu den jeweiligen Zielorganen transportiert zu werden. Der Blutzuckerspiegel steigt. In Folge darauf reagiert die Bauchspeicheldrüse mit der Freisetzung von Insulin, welches die Aufnahme von Glucose aus dem Blut in die Speicherorgane und damit die Wiederherstellung des normalen Blutzuckerspiegels bewirkt. Bis zum Wirken der vollständigen Kaskade bleiben die Blutzuckerwerte allerdings zunächst erhöht. Zum einen wurden alle Tiere in dieser Studie ad libitum gefüttert, was schon allein zu einer breiten Varianz der Blutzuckerwerte führen kann, zum anderen nahmen die Tiere der Trainingsgruppe beim Training und selbst im Moment der Probenentnahme auf Grund der Schmackhaftigkeit stets größere Mengen Belohnungsfutter in verhältnismäßig kurzer Zeit auf. Diese Tatsache würde ein Urteil darüber erschweren, ob erhöhte Blutzuckerwerte auf Stress oder auf eine vermehrte Futteraufnahme zurückzuführen sind, weshalb eine Bewertung des Klicker-Trainings anhand dieses Parameters für Studien mit Belohnungsfutter als ungeeignet anzusehen ist.

5.7.5.2 Harnsäure und Gesamtprotein

Kommt es in einer Stresssituation zu einem durch Corticosteron getriggerten vermehrten Abbau von Körperprotein, so können die Konzentrationen von Plasmaprotein (Ehinger und Gschwindt 1981) sowie auch die der frei gewordenen Stickstoffverbindungen – in Form von Harnsäure – im Blut zunehmen. Ein Fakt, der aber gerade für die Harnsäure nicht außer Acht gelassen werden darf, ist der, dass ihre Konzentrationen auch sehr stark durch die Aufnahme proteinhaltiger Nahrung beeinflusst wird (Swennen et al. 2005). Vergleicht man nun die Proteingehalte des in dieser Studie verwendeten Legehennenfutters der Marke TÜK-TÜK, mit dem Proteingehalt des geriebenen Emmentalers, den die Trainingsgruppentiere als Belohnungsfutter und somit täglich in höherer Menge erhielten, als die Kontrolltiere (letztere bekamen ihn nur zur Vorbereitung des New Object Tests), so findet sich hier ein Unterschied von 17% im Futter zu 28% im Käse. Zusätzlich zum Unterschied der Menge, muss auch die Art des Käse-Proteins beachtet werden. Zu diesem – dem Casein – schreiben Okumura und Tasaki (1969), dass es den Harnsäurespiegel im Blut von White Leghorn Hähnen nach der Fütterung zwei Stunden lang ansteigen ließ. Harnsäurespiegel und Gesamtprotein waren daher für diese Studie keine geeigneten Parameter.

5.7.5.3 Freie Fettsäuren, andere Blutfette

Neben der lipolytischen Wirkung der Glucocorticoide, muss hinzufügend erwähnt werden, dass sich diese in erster Linie nur auf das Fett peripherer Gewebe bezieht. Aufgrund unterschiedlicher Rezeptorenausstattung sorgen Glucocorticoide in Stamm-nahen Fettgeweben und auch in der Leber dagegen für einen Fettabbau (Zaytsoff et al. 2019; Jiang et al. 2008; Siegel und Van Kampen 1984). Durch diese Mobilisation und Umverteilung der Körperfette finden sich in Folge erhöhter Blutglucocorticoidspiegel auch vermehrt freie Fettsäuren, Glycerin und andere Fettmetaboliten im Blut. Ramage-Healey und Romero (2001) berichten in diesem Zusammenhang von einer Erhöhung der Konzentrationen freier Fettsäuren im Blut nach ACTH-Supplimentierung und damit einhergehender gesteigerter Corticosteronkonzentration. Shini et al. (2009) fanden nach direkter Gabe von Corticosteron erhöhte Triglycerid- und Cholesterol-Werte im Blut. Und auch wenn Autoren, wie Jiang et al. (2008) oder Nagra und Meyer (1963) ähnliches erkannten bzw. diese Beobachtung auch auf Low density-Lipoproteine erweitern konnten, so dürfen doch auch Erkenntnisse, wie z.B. von Liu et al. (2012) nicht unberücksichtigt bleiben. Letztere fanden nach einer längeren Corticosterongabe – in diesem Fall 7 Tage – einen Abfall der Konzentration freier Fettsäuren im Blut. Ebenfalls ein Absinken der freien Fettsäuren beschreiben Buyse et al. (2002). Allerdings nicht im Zusammenhang mit länger andauernder Corticosteron- oder Stressexposition, sondern gut 20 Minuten nach Futteraufnahme. Dies, sowie ein erneutes Ansteigen nach gut 50 Minuten, begründen die Autoren damit, dass nach der Futteraufnahme

zunächst die Glucose als Hauptenergieträger verstoffwechselt wird und freie Fettsäuren diesbezüglich erst später wieder an Bedeutung gelangen. Zusätzlich hierzu sollte auch - gerade im Hinblick auf die Triglyzeride oder die Lipoproteine - die andere Gewichtung von vergleichsweise sehr fettigem Futter, wie z.B. Emmentaler-Käse bedacht werden, der in der hier vorliegenden Studie Bestandteil des Belohnungsfutters war. Ein erhöhter Fettanteil im Futter kann zu alimentären Hyperlipämien führen (Westerlund 1942) und in Folge für eine bestimmte Zeit Aussagen zu glucocorticoidalen Einflüssen auf die Blutfettwerte erschweren.

5.7.6 Katecholamine und klinische Stressparameter

Aufgrund der nur sehr geringen Plasma-Halbwertszeit empfehlen Autoren, wie Baum und Grunberg (1997), Freeman (1985) und Wittmann (1994), statt einer direkten Messung der Katecholamine, auf die Beurteilung klinischer Parameter zurückzugreifen, die durch einen Anstieg dieser Hormone beeinflusst werden können. Hierfür empfehlen sie die Messung u.a. des Blutdrucks oder der Herzfrequenz und auch die Temperatur unterschiedlicher Körperbereiche kann nach Aussagen von Ross et al. (2020) und Edgar et al. (2013) eine gute Einschätzung des Stressempfindens liefern. Da im Rahmen von Stresssituationen die Kern-Körpertemperatur eines Individuums ansteigt, könnte das Huhn dieser sogenannten stressbedingten Hyperthermie (Edgar et al. 2013) aufgrund fehlender Schweißdrüsen (Egbunike 1979) auch mit einer Erhöhung der Atemfrequenz begegnen, die mit dem für die Thermoregulation dieser Tiere unabdingbaren Hecheln einhergehen würde. Zeitgleich hierzu würde durch eine stressbedingte Abkühlung der Körperperipherie u.a. auch durch die Temperaturmessung an Kamm (Ross et al. 2020) oder Kehllappen eine Beurteilung des Stressempfindens eines Huhnes möglich.

Auch wenn diese klinischen Parameter als grundsätzlich geeignet einzustufen sind, um das Stressempfinden eines Huhnes zu beurteilen, so erscheinen sie dennoch für die hier durchgeführte Studie als eher ungeeignet. Dies kann damit begründet werden, dass z.B. das Anbringen geeigneter Messinstrumente einen zusätzlichen Stress-Impuls für die Hühner darstellen kann. Dem könnte zwar durch eine Integration der jeweiligen Mess-Prozedur in ein dahingehend modifiziertes Klicker-Training entgegnet werden, doch wäre hierfür mit großer Wahrscheinlichkeit eine zusätzliche Person (als „dritte Hand“) zum Anlegen der Geräte nötig, was wiederum neue praktische Hürden bringen würde. Was Parameter wie Atem- oder Herzschlagfrequenz betrifft, so könnten diese zwar auch gut durch die das Tier handelnde Person (Trainer) manuell erfasst werden, doch könnte dies dann dahingehend Konfliktpotential bieten, als dass so deren Aufmerksamkeit nicht mehr ungeteilt auf dem Handling und dem Klickern des jeweiligen Tieres liegen würde.

5.8 Kannibalismus und die Rolle des „aktiven kognitiven Enrichments“

In den Kontrollgruppen 1 und 3 zeigte sich im jeweils letzten Drittel des entsprechenden Versuchsdurchganges bei drei bzw. zwei Hennen die aus vielen Hühnerhaltungen bekannte und oftmals mit Stress assoziierte (Szczepanek 2016; Martin 2005; Zeltner und Hirt 2004; Zeltner und Hirt 2003) Verhaltensstörung des Kannibalismus. Die das Stressempfinden im Versuchszeitraum beschreibenden Parameter H:L-Ratio und Feder-Corticosteron unterscheiden sich hierbei allerdings kaum bzw. gar nicht zwischen Kontroll- und Trainingsgruppe und belegen somit auch für die Tiere der erstgenannten Gruppe ein insgesamt eher geringes generelles Stressempfinden.

Zwar gelang es in dieser Arbeit, die in Hühnerhaltungen häufig relevanten Stressoren zu standardisieren, doch zeigt die Kannibalismus-Problematik, dass es nicht nur Probleme im Gesundheitsstatus oder in der Unterbringung der Tiere sind, die das Wohlergehen der Tiere negativ beeinflussen können. Vielmehr zeigt sich hier, wie wichtig es ist, den Tieren auch die Ausübung ihrer arteigenen und natürlichen Verhaltens- und Aktivitätsmuster zu ermöglichen. Führt man sich hierzu den Alltag eines Huhnes in seiner natürlichen Umgebung vor Augen, so ist dieser vor allem durch eine stetige Auseinandersetzung mit einer belebten und bewegten Umwelt gekennzeichnet.

Den Tieren der Kontrollgruppen stand mit Pick-Spielzeug, Pick-Steinen und aufgehängten Futterrüben das gleiche „*enviromental Enrichment*“ zur Verfügung wie den Tieren der jeweiligen Trainingsgruppen. Hierzu beschreiben Gvaryahu et al. (1994), dass eine solche Anreicherung der Stallumgebung mit Beschäftigungsobjekten aggressives Verhalten und Todesfälle bei weißen Legehennen reduzieren kann. Bei der Wahl des Beschäftigungsmaterials wurden für die hier durchgeführte Studie solche Objekte gewählt, die vor allem an das arteigene Nahrungserwerbsverhalten des Huhnes angepasst waren. Hierbei wurde sich neben eigenen Erfahrungen auch an der Arbeit Martins (2005) orientiert, der darauf verweist, dem Huhn gemäß seiner Natur eine Vielzahl unterschiedlicher Pick-Objekte zur Verfügung zu stellen, um eben dieses Nahrungserwerbsverhalten des Huhnes nicht in Verhaltensstörungen wie Federpicken oder Kannibalismus abgleiten zu lassen. Denn – und so stellte auch Martin (2005) fest - besteht die Umwelt des wild lebenden Huhnes aus einer großen Vielfalt an Reizen. Sich mit dieser Vielfalt vor allem im Rahmen der Nahrungssuche auseinanderzusetzen, verlangt dem Huhn jeden Tag erneut ein breites Verhaltens-Repertoire und eine Vielzahl von Bewegungsabläufen ab.

Für die Trainingsgruppentiere wurde dieses Abverlagern in der hier vorgestellten Studie durch das Klicker-Training als *kognitives Enrichment* simuliert, während die Tiere der

Kontrollgruppen nur in Eigeninitiative ihre *Enrichment*-Objekte aufsuchten und sich mit diesen beschäftigten.

Hierauf aufbauend und in Ergänzung zu Maßnahmen, die – so wie ein Klicker-Training - direkte negative versuchsbedingte Einflüsse auf Hühner abmildern sollen, sollten in zukünftigen Studien auch solche Maßnahmen erprobt werden, die den Tieren in ihren Unterbringungen nicht nur *passiv* die Möglichkeit einer Beschäftigung bieten, sondern eben auch solche, die die jeweiligen Individuen auch durch immer neue Impulse *aktiv* fordern.

Möglicherweise auch in Verbindung mit künstlicher Intelligenz, könnte durch diese Art des „*aktiven kognitiven Enrichments*“ eine in Summe intensivere Inanspruchnahme angebotener Enrichment-Maßnahmen bewirkt, Verhaltensstörungen vorgebeugt und somit noch ganzheitlicher positive Effekte auf das Wohlbefinden der Tiere erzielt werden.

5.9 Einfluss verschiedener Tiercharaktere auf das Klicker-Training und Steigerung des Lernerfolges durch Beobachtungslernen

5.9.1 Tiercharaktere

Kogan et al. (2017) erkannten, dass sich bei mit Hilfe eines Klicker-Trainings konditionierten Tierheimkatzen unterschiedliche Lernerfolge zwischen schüchternen und mutigeren Tieren zeigen. Dass auch beim Vogel die individuelle Persönlichkeit des Tieres Einfluss auf dessen Stressreaktion haben kann, fand auch Cockrem (2007a). Beschreibt er mit prokativ und reaktiv zwei unterschiedliche Typen der Vogel-Persönlichkeiten, die sich u.a. in der Art des Verhaltens oder in Unterschieden im Corticosteron-Spiegel als Reaktion auf einen Stressor unterscheiden, so konnten für die Tiere in der hier präsentierten Arbeit und im Kontext zum Klicker-Training gleich vier unterschiedliche Charakter-Typen festgestellt werden (Tabelle 11).

Konnte man bei den mutigen und den ängstlichen Tieren in vielen Fällen einen Zusammenhang mit dem sozialen Rang des jeweiligen Einzeltieres in der Gruppe erkennen, traf dies im Hinblick auf die zweite Charaktereigenschaft der Typen 1-3 – insbesondere im Einzeltraining - nur eingeschränkt zu. In dieser Phase des Trainings fanden sich sowohl *aktive* Tiere hohen als auch niedrigen Ranges, was in gleicher Weise auch für die *akzeptierenden* Tiere zutraf.

Im Verlauf der vollständigen, 23-tägigen Trainingsphase zeigte sich, dass vor allem die Tiere der Charaktertypen 1 und 2 (Tabelle 11) mit angepassten bzw. flexiblen Trainingsplänen ähnlich schnell trainiert werden können. Hierbei sollte der verfolgte Trainingsplan den Tieren – wie in der hier vorliegenden Studie – allerdings ein annähernd gleiches Pensum an Aktion und Akzeptanz abfordern. In diesem Fall gleichen sich die Stärken und Schwächen der Einzeltiere über den Trainingszeitraum hinweg aus und beide Charaktertypen können in

gleicher Zeit das Trainingsziel erreichen. Bezüglich der Tiere des Typ 2 sollte die Möglichkeit diskutiert werden, diese u.a. für den Einsatz in der Lehre vorzuziehen. Auch könnte durch die hier aufgezeigte Einteilung der Tiere in unterschiedliche Charaktertypen die Wahl geeigneter Elterntiere für die Zucht einer weniger ängstlichen und gut handelbaren Hühnerlinie erwogen werden. Diese wäre durch ihre geringere Stressanfälligkeit für generelle Versuchs- bzw. insbesondere Lehrzwecke geeigneter und könnte auch in der konventionellen landwirtschaftlichen Haltung mit mehr Wohlbefinden der dann weniger stresssensiblen Tiere einhergehen.

Bei den Tieren, die zwar prinzipiell Interesse am Training zeigten, bei denen allerdings auch nach den ersten Trainingstagen weiterhin ein höherer Grad an Ängstlichkeit erkennbar war (Typ 3), bedürfte das Training sehr vieler Pausen und voreilige bzw. zu schnelle Trainingschritte hatten oft einen Rückfall auf niedrigere Trainingsniveaus zur Folge. Für diese Tiere sollten längere Trainingszeiten eingeplant werden, um so auch bei diesen ein kontinuierliches Training zu ermöglichen.

Im Hinblick auf zu ängstliche Tiere (Typ 4) sollte für zukünftige Studien bzw. beim generellen Einsatz von Hühnern in Tierversuchen versucht werden, diese Tiere durch genaue Beobachtung zügig zu identifizieren und zeitnah aus dem Versuch auszuschließen. Die Identifikation dieser Tiere ist prinzipiell bereits in den ersten Tagen nach der Einstallung bzw. spätestens in den ersten Trainingstagen möglich.

Cockrem (2007a) beschreibt für Tiere mit reaktivem Charakter höhere Corticosteron-Spiegel als für Tiere mit proaktivem Charakter. Im Hinblick auf die in dieser hier vorliegenden Studie beschriebenen Charaktertypen konnte hingegen kein Zusammenhang zwischen einzelnen Typen und bestimmten Corticosteron-Konzentrationen erkannt werden. Hierzu sollte bedacht werden, dass im Hinblick auf die Arbeit Cockrems in erster Linie von negativem, also Distress auszugehen ist, wohingegen durch das Klicker-Training und die damit verbundene Belohnung sowohl in den aktiven als auch den akzeptierenden Tieren in gleicher Weise ein – hier positives - Stressempfinden ausgelöst wurde.

5.9.2 Steigerung des Lernerfolges durch Beobachtungslernen

Ein weiterer Aspekt, der sich im Laufe des in dieser Studie durchgeführten Trainings als nützlich erwies, ist der, dass es gerade zu Beginn des Trainings Sinn macht, die Tiere in der Gruppe zu trainieren. Hierdurch kann sich der Trainer die unterschiedlichen Charaktere der Einzeltiere zu Nutze machen und zudem spontane Anpassungen des Trainingsplanes vornehmen, sobald er Einzeltiere einem bestimmten Charaktertyp zuordnen kann.

Zusätzlich hierzu kann sich dieses Gruppentraining auch positiv auf die zu trainierenden Tiere und deren Lernerfolg auswirken, da eher zögerliche Einzeltiere bisweilen durch die Dynamik der mutigeren Tiere motiviert werden, sich ebenfalls mit dem Trainer auseinanderzusetzen. Ergänzend hierzu kann der Trainingsfortschritt des Einzeltieres auch dadurch gesteigert werden, dass dieses durch Beobachtungslernen bestimmte erfolgversprechende (weil belohnte) Verhaltensweisen anderer Gruppenmitglieder nachahmt. Durch dieses Beobachtungslernen, in welchem Kiesel und Koch (2012) einen bedeutenden Lernprozess erkannten, kann ein Individuum auf sehr schnellem Weg und ohne langwieriges Probieren und Fehlversuche herausfinden, welches Verhalten in der entsprechenden Situation das erfolgversprechendste ist (Kiesel und Koch 2012).

6. Zusammenfassung

Klicker-Training als angewandte Refinement-Maßnahme beim Huhn

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 21 Junghennen der Linie Lohmann Selected Leghorn für 23 Tage mittels Klicker-Training trainiert. Ziel des Trainings bestand darin, die Tiere dahingehend zu konditionieren, sich freiwillig und ohne Gegenwehr oder Fluchtversuche einer zweifachen Blut- und Speichelprobenentnahme sowie einem zwischengeschalteten Handling im Rahmen einer Allgemeinuntersuchung zu unterziehen. Die vom Beutetier Huhn naturgemäß als stressig empfundenen Maßnahmen, wie z.B. das Einfangen aus dem Stall oder die Fixation/Immobilisation während Probenentnahme und Handling sollten so umgangen bzw. in ihrem Stressor-Potential gemildert werden. Stetig neue positive Erfahrungen während der Phase des Klicker-Trainings sollten zudem die Resilienz und das Selbstbewusstsein der Tiere stärken sowie ihre Offenheit gegenüber neuen Situationen erhöhen. Verglichen wurden die trainierten Tiere anhand serologischer, hämatologischer und ethologischer Parameter mit einer gleich großen Kontrollgruppe.

Durch die Bestimmung der Corticosteron-Konzentrationen in Speichel und Plasma wurde eine Aussage zum aktuellen bzw. kurzfristigen Stressempfinden der Tiere möglich. Die Werte des Speichel-Corticosterons sprechen den Trainingsgruppentieren ein signifikant geringeres Anfluten und damit eine geringere Reaktion auf einsetzende Stresssituationen zu als den Tieren der Kontrollgruppe. Im Plasma zeigt sich dieser Unterschied als nicht signifikant, folgt aber dem gleichen Trend. Bei bestehenbleibender Stresssituation im Verlauf der Allgemeinuntersuchung gleichen sich die Werte von Trainings- und Kontrollgruppe in beiden Probenarten an. Der signifikante Gruppenunterschied im Speichel verliert sich und zeigt sich, wie die Unterschiede im Plasma, nur noch tendenziell. Auch wenn die im Vorfeld der eigentlichen Untersuchung durchgeführte Verifizierung aufgrund verhältnismäßig hoher Variationskoeffizienten, eine vorsichtige Interpretation der Ergebnisse empfiehlt, bleibt für die in dieser Arbeit ermittelten Plasmacorticosteron-Werte grundsätzlich festzustellen, dass diese im Vergleich zu den Werten anderer Arbeiten im generell niedrigen Bereich einzuordnen sind.

Wie sich das kontinuierliche, mehrwöchige Klicker-Training und damit die tägliche Auseinandersetzung der Tiere mit potenziell stressigen Situationen auf deren mittel- bis längerfristiges Stressempfinden auswirkt, wurde anhand der H:L-Ratio sowie dem Hämatokrit beurteilt. Auch in der H:L-Ratio zeigen sich beim Vergleich der Gruppen lediglich tendenzielle Unterschiede zu Gunsten der Trainingsgruppe und das bei Werten, die analog zu den Plasmacorticosteron-Werten insgesamt allen Tieren ein eher geringes Stressempfinden zuschreiben. Die Hämatokrit-Werte schwanken zwischen den Gruppen nur um einzelne

Prozentpunkte, was zusammen mit der Tatsache, dass dieser Wert generell durch eine Vielzahl anderer Stoffwechselfvorgänge mitbeeinflusst wird, diesen für die Beurteilung des Klicker-Trainings als ungeeignet erscheinen lässt.

Die Einschätzung des langfristigen Stressempfindens über den vollständigen Versuchszeitraum, einschließlich der Phase der Verhaltenstests, erfolgte durch die Bestimmung des in die Rückenfedern des Interscapular-Bereiches eingelagerten Feder-Corticosterons. Die hier ermittelten Werte waren in beiden Gruppen im Mittelwert nahezu identisch und liegen beim Vergleich mit Werten aus Literatur und Vorversuchen im unteren Bereich. Wenngleich dies für beide Gruppen ein insgesamt geringes Stressempfinden während des gesamten Versuchszeitraumes beschreibt, sollten diese Werte auch auf Grund relativ breiter Streuung und der Ergebnisse der Verifizierung stets mit Bedacht bewertet werden.

Die in Ergänzung zu den serologischen und hämatologischen Untersuchungen durchgeführten Verhaltenstests gestalteten sich als zwei New Area Tests sowie ein New Object Test. Durch diese sollten in erster Linie Aussagen hinsichtlich eines potentiellen Einflusses von Klicker-Training auf Resilienz, Selbstbewusstsein und Offenheit der Tiere bezüglich neuer Situationen ermöglicht werden. Der New Area Test 1 gestattete zudem Rückschlüsse bezüglich des Stressempfindens der Tiere in der diesem Test vorausgegangenen Abfolge aus Probenentnahme, Allgemeinuntersuchung und erneuter Probenentnahme. Bei den New Area Tests zeigten sich in den beurteilten Parametern teils signifikante, teils nur tendenzielle Gruppenunterschiede zu Gunsten der trainierten Tiere. In allen Fällen waren die Unterschiede jedoch größer, sofern der Test direkt im Anschluss an die - bei den Trainingsgruppentieren durch das Klicker-Training begleitete - „Probenahme-Allgemeinuntersuchung-Probenahme-Abfolge“ stattfand. Die Konfrontation der Tiere mit einem neuen Raum ohne vorausgegangenes Klickern der Trainingsgruppentiere verringerte die Gruppenunterschiede. Im New Object Test zeigten sich ebenfalls keine signifikanten, allerdings erneut tendenzielle Unterschiede zu Gunsten der Trainingsgruppe.

Auch wenn die Werte der in dieser Arbeit durchgeführten Corticosteron-Messungen aktuell noch mit Bedacht zu bewerten sind, so zeigen auch sie im Zusammenspiel mit den anderen beurteilten Parametern, dass eine positive Beeinflussung des Verhaltens bei zu Versuchszwecken gehaltenen Hühnern durch ein dreiwöchiges Klicker-Training möglich ist. Als Maßnahme des kognitiven Enrichments zur Begleitung von Hühnern durch Tierversuche scheint das Training geeignet, was zusätzlich zu den Testergebnissen auch durch die nur in zwei der drei Kontrollgruppen, nicht jedoch in den Trainingsgruppen aufgetretene Kannibalismus-Problematik unterstrichen wird. Ob durch ein Klicker-Training allerdings auch

eine nachhaltige Beeinflussung des Stressempfindens möglich ist, sollte durch auf diese Studie aufbauende Arbeiten mit längerfristigen Trainingsperioden bzw. für Situationen mit höherem Stresspotential als Probenentnahmen oder Allgemeinuntersuchung sowie durch Hinzuziehung weiterer, geeigneter Untersuchungsparameter beurteilt werden. Hierbei muss die Mitbeeinflussung bestimmter, vor allem biochemischer aber auch einiger serologischer Parameter durch das Belohnungsfutter berücksichtigt werden, insofern solche als ungeeignet zur Beurteilung des Klicker-Trainings zu betrachten sind.

Ist die grundlegende Vorgehensweise des Klicker-Trainings verstanden sowie das prinzipielle und von jedem Tierpfleger zu erwartende Wissen und Einfühlungsvermögen hinsichtlich der zu betreuenden Tiere vorhanden, so kann ein Klicker-Training leicht und ohne größere Vorbereitung als angewandte Refinement-Maßnahme in bestehende Versuchstierhaltungen integriert werden. Im Hinblick auf den generellen Einsatz des Klicker-Trainings zur Vorbereitung von Hühnern auf versuchsbedingte Manipulationen, sollte jedoch stets eine Abwägung erfolgen zwischen Belastungsgrad bzw. Dauer des geplanten Versuches und der sich daraus ergebenden notwendigen und somit zusätzlich auf den eigentlichen Versuch aufzuzählenden Trainingszeit. Da dies eine nicht unerhebliche Verlängerung des Versuchszeitraumes mit sich bringen kann und hierdurch andere Stressoren, die möglicherweise in der hier vorliegenden Studie bisher noch unbedeutend blieben, begünstigt werden könnten, sollte hierbei immer nach dem Prinzip der Verhältnismäßigkeit abgewogen und entschieden werden.

7. Summary

Clicker training as applied refinement measure in chickens

In this work, 21 pullets of the Lohmann Selected Leghorn line were trained for 23 days using clicker training. The aim of the training was to condition the animals to undergo voluntarily and without resistance or escape attempts a double blood and saliva sampling as well as an intermediate handling in the context of a general examination. The measures that are naturally perceived as stressful by the prey animal chicken, such as capture from the ground or fixation/immobilization during sampling and handling, should thus be circumvented or mitigated in their stressor potential. Continuous new positive experiences during the clicker training phase should also strengthen the animals' resilience and self-confidence and increase their openness to new situations. The trained animals were compared with an equally sized control group on the basis of serological, hematological and ethological parameters.

By determining the corticosterone concentrations in saliva and plasma, a statement on the current or short-term stress perception of the animals was possible. The values of the salivary corticosterone indicate that the animals of the training group have a significantly lower flare-up and thus a lower reaction to incipient stress situations than the animals of the control group. In plasma, this difference is shown to be not significant, but follows the same trend. If the stress situation persists during the course of the general examination, the values of the training and control groups equalize in both sample types. The significant group difference in saliva fades and, like the differences in plasma, shows only a trend. Even if the verification carried out prior to the actual study recommends a cautious interpretation of the results due to relatively high coefficients of variation, it can still be stated that the plasma corticosterone values determined in this study are generally in the low range compared to the values of other studies.

The effect of continuous clicker training over several weeks, and thus the daily exposure of the animals to potentially stressful situations, on their medium- to long-term stress perception was assessed using the H:L ratio and the hematocrit. Also in the H:L-ratio, the comparison of the groups shows only tendency differences in favor of the training group and this with values which, analogous to the plasma corticosterone values, attribute a rather low stress perception to all animals overall. The hematocrit values only vary by a few percentage points between the groups, which, together with the fact that this value is generally influenced by a large number of other metabolic processes, makes it appear unsuitable for assessing clicker training.

The assessment of long-term stress sensation over the full experimental period, including the behavioral testing phase, was made by determining the feather corticosterone stored in the dorsal feathers of the interscapular region. The values determined here were almost identical

on average in both groups and were in the lower range when compared with values from literature and previous tests. Although this describes an overall low stress sensation for both groups during the entire test period, these values should always be evaluated with caution, also due to relatively wide dispersion and the results of the verification.

The behavioral tests performed in addition to the serological and hematological examinations were two New Area Tests and one New Object Test. The main purpose of these tests was to provide information about the potential influence of clicker training on the animals' resilience, self-confidence and openness to new situations. The New Area Test 1 also allowed conclusions to be drawn regarding the stress perception of the animals in the sequence of sampling, general examination and re-sampling that preceded this test. In the New Area Tests, group differences in the assessed parameters were partly significant, partly only tended to favor the trained animals. In all cases, however, the differences were greater if the test took place directly after the "sampling-general examination-sampling sequence" - which was accompanied by clicker training in the training group animals. Confronting the animals with a new room without preceding clicker training of the training group animals reduced the group differences. The New Object Test also showed no significant, but again tended to show differences in favor of the training group.

Even if the values of the corticosterone measurements carried out in this work must currently be evaluated with caution, they also show in interaction with the other evaluated parameters that a positive influence on the behavior of chickens kept for experimental purposes is possible through a three-week clicker training. As a measure of cognitive enrichment to accompany chickens through animal experiments, the training seems to be suitable, which in addition to the test results is also underlined by the cannibalism problem occurring only in two of the three control groups, but not in the training groups. However, whether clicker training can also have a lasting influence on stress perception should be assessed by work based on this study with longer-term training periods or for situations with a higher stress potential than sampling or general examination, as well as by the inclusion of further, suitable examination parameters. In this context, the co-influence of certain, mainly biochemical but also some serological parameters by the reward food has to be taken into account, as a consequence of which such parameters have to be considered as unsuitable for the assessment of clicker training.

If the basic procedure of clicker training is understood and the basic knowledge and empathy regarding the animals to be cared for, which can be expected from every animal keeper, is available, clicker training can be integrated easily and without major preparation as an applied refinement measure in existing experimental animal husbandries. With regard to the general use of clicker training to prepare chickens for experimental manipulations, however, a

consideration should always be made between the degree of stress or duration of the planned experiment and the resulting necessary training time, which must be added to the actual experiment. Since this can result in a not inconsiderable extension of the test period and other stressors, which may have remained insignificant in the present study, could be favored as a result, the principle of proportionality should always be weighed and decided upon.

8. Literaturverzeichnis

Abobaker, H., Hu, Y., Hou, Z., Sun, Q., Idriss, AA., Omer, NA., Zong, Y., Zhao, R. (2017): *Dietary betaine supplementation increases adrenal expression of steroidogenic acute regulatory protein and yolk deposition of corticosterone in laying hens. Poult Sci., 96(12), S. 4389-4398. doi: 10.3382/ps/pex241*

Al-Maksousi, SK., Al-Hayani, WK., Hussein, FM. (2019): *Effect of the level of corticosteron hormone in the blood of local iraqi chicken mothers on the sex ratio of the produced offsprings. Plant Arch., 19(2), S. 1411-1415. e-ISSN:2581-6063; url: [http://plantarchives.org/SPL%20ISSUE%20SUPP%202019/245%20\(1411-1415\).pdf](http://plantarchives.org/SPL%20ISSUE%20SUPP%202019/245%20(1411-1415).pdf)*

Al-Murrani, WK., Al-Rawi, IK. und Raof, NM. (2002): *Genetic resistance to Salmonella typhimurium in two lines of chickens selected as resistant and sensitive on the basis of heterophil/lymphocyte ratio, Br Poult Sci., 43:4, S. 501-507. doi: 10.1080/0007166022000004408*

Antonissen, G., De Baere, S., Devreese, M., Van Immerseel, F., Martel, A., Croubels, S., (2017): *Feed contamination with Fusarium mycotoxins induces a corticosterone stress response in broiler chickens. Poult Sci., 96(1), S.14-17. doi: 10.3382/ps/pew280*

Armbrecht, Y. und Wilkens, M. (2016): *Stressfreies Handling und Medical Training. team. konkret, 12. Jg., Nr. 04, S. 20-23. Enke Verlag in Georg Thieme Verlag KG, doi: 10.1055/s-0042-115709*

Ataallahi, M., Nejad, J.G., Song, J.I., Kim, J.S. und Park, KH. (2020): *Effects of feather processing methods on quantity of extracted corticosterone in broiler chickens. J Anim Sci Technol., 62(6), S.884-892. doi: 10.5187/jast.2020.62.6.884*

Aurich, JE. (2002): *Endokrinpharmakologie. in: Frey, HH. und Löscher, W.;Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin; Enke Verlag, Stuttgart, ISBN: 978-3830410799*

Autrum, H. und Von Holst, D. (1968): *Sozialer „Stress“ bei Tupajas (Tupaia glis) und seine Wirkung auf Wachstum, Körpergewicht und Fortpflanzung. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 58(4), S.347-355. doi: 10.1007/BF00343508*

Badmus, K.A., Idrus, Z., Meng, GY., Sazili, AQ., Mamat-Hamidi, K. (2021):
Telomere Length and Regulatory Genes as Novel Stress Biomarkers and their Diversities in Broiler Chickens (Gallus gallus domesticus) Subjected to Corticosterone Feeding. Animals (Basel), 11(10), 2759. doi: 10.3390/ani11102759

Barnett, SA. (2007):
The rat: A study in behavior. Transaction Publishers. eBook ISBN: 9781315134468. doi: 10.4324/9781315134468

Bassler, AW., Arnould, C., Butterworth, A., Colin, L., De Jong, IC., Ferrante, V., Ferrari, P., Haslam, S., Wemelsfelder, F. und Blokhuis, HJ. (2013):
Potential risk factors associated with contact dermatitis, lameness, negative emotional state, and fear of humans in broiler chicken flocks. Poult Sci, 92(11), S.2811-2826. doi: 10.3382/ps.2013-03208

Bauer, T. und Fölsch, D. (2005):
Reproduktions- und Eiablageverhalten. In: Das Wohlergehen von Legehennen in Europa–Berichte, Analysen und Schlussfolgerungen, Martin, G., Sambraus, HH. und Steiger A. (Hrsg.), S.62. Internationale Gesellschaft für Nutztierhaltung IGN, Verlag Universität Kassel, Reihe Tierhaltung Band 28. ISBN 3-00-015577-5

Baum, AAGN. und Grunberg, N. (1997):
Measurement of stress hormones. In: Measuring stress: A guide for health and social scientists (Hrsg.: Cohen, S., Kessler RC. und Gordon LU., Oxford University Press, New York, Oxford.) S.175-192. ISBN: 0195121201

Baxter, M., Bailie, C.L. und O'Connell, NE. (2019):
Play behaviour, fear responses and activity levels in commercial broiler chickens provided with preferred environmental enrichments. Animal, 13(1), S.171-179. doi: 10.1017/S1751731118001118

Beuving, G., Jones, RB. und Blokhuis, HJ. (1989):
Adrenocortical and heterophil/lymphocyte responses to challenge in hens showing short or long tonic immobility reactions, Br Poult Sci, 30:1, S.175-184. doi: 10.1080/00071668908417135

Bhatnagar, S., Bell, ME., Liang, J., Soriano, L., Nagy, TR. und Dallman, MF. (2000):
Corticosterone facilitates saccharin intake in adrenalectomized rats: does corticosterone increase stimulus salience?. J Neuroendocrinol.. doi: 10.1046/j.1365-2826.2000.00487.x

Bickhardt, K. (1992):

Kompendium der Allgemeinen Inneren Medizin und Pathophysiologie für Tierärzte. Verlag Parey, Berlin, Hamburg, S.97-100. ISBN: 348979916X

Bickhardt, K., Büttner, D., Müschen, U. und Plonait, H. (1983):

Influence of bleeding procedure and some environmental conditions on stress-dependent blood constituents of laboratory rats. Lab Anim., 17(2), S.161-165.

doi: 10.1258/002367783780959565

Beerda, B., Schilder, M.B., van Hooff, J.A. und de Vries, H.W. (1997):

Manifestations of chronic and acute stress in dogs. Appl. Anim. Behav. Sci., 52(3-4), S.307-319. doi: 10.1016/S0168-1591(96)01131-8

Bessei, W. (2014):

Über den Einfluss der rationierten Fütterung auf das Wohlbefinden von Mastelertieren– Eine Literaturstudie. Europ.Poult.Sci., 78. 2014, ISSN 1612-9199, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart. doi: 10.1399/eps.2014.40

Bortolotti, GR., Marchant, TA., Blas, J. und German, T. (2008):

Corticosterone in feathers is a longterm, integrated measure of avian stress physiology. Funct Ecol, 22(3), S.494-500. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01387.x

Bortolotti, GR., Marchant, T., Blas, J. und Cabezas, S. (2009):

Tracking stress: localisation, deposition and stability of corticosterone in feathers. J Exp Biol., 212(10), S.1477-1482. doi: 10.1242/jeb.022152

Bowling, M., Forder, R., Hughes, R.J., Weaver, S. und Hynd, P.I. (2018):

Effect of restricted feed intake in broiler breeder hens on their stress levels and the growth and immunology of their offspring. Transl Anim Sci., 2(3), S.263-271.

doi: 10.1093/tas/txy064

Breuner, CW., Orchinik, M. (2002):

Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. J Endocrinol, 175(1), S.99-112. doi: 10.11908.8912

Bundesministerium der Justiz, =BMJ (1972):

Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 20 des Gesetzes vom 20. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2752) geändert worden ist. Abergufen am 07.10.2023, um 14.30 Uhr von:
<https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>

Bundesministerium der Justiz, =BMJ (2001):
Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung (TierSchNutztV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. August 2006 (BGBl. I S. 2043), die zuletzt durch Artikel 1a der Verordnung vom 29. Januar 2021 (BGBl. I S. 146) geändert worden ist. Abgerufen am 10.01.2023, um 12.12 Uhr von:
<https://www.gesetze-im-internet.de/tierschnutztv/BJNR275800001.html>

Bundesministerium der Justiz, =BMJ (2013):
Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 11. August 2021 (BGBl. I S. 3570) geändert worden ist. Abgerufen am 20.12.2022, um 13.30 Uhr von:
<https://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html>

Buchholtz, C. (2005):
Sozialverhalten beim Haushuhn. In: Das Wohlergehen von Legehennen in Europa–Berichte, Analysen und Schlussfolgerungen, Martin, G., Sambras, HH. und Steiger A. (Hrsg.), S.28-33, Internationale Gesellschaft für Nutztierhaltung IGN, Verlag Universität Kassel, Reihe Tierhaltung Band 28. ISBN 3-00-015577-5

Buckingham, JC (2007):
*Glucocorticoids, Effects of Stress on**, In: *Encyclopedia of Stress (2. Edition)*, George Fink (Hrsg.), Academic Press, S. 190-197, ISBN: 9780120885039

Buijs, S., Keeling, L.J., Vangestel, C., Baert, J., Vangeyte, J. und Tuytens, FAM. (2010):
Resting or hiding? Why broiler chickens stay near walls and how density affects this. Appl. Anim. Behav. Sci., 124(3-4), S.97-103. doi: 10.1016/j.applanim.2010.02.007

Bundesinstitut für Risikobewertung (2021):
Zahlen zu den im Jahr 2020 verwendeten Versuchstieren, abgerufen am 16.11.2021, um 14.14 Uhr von
<https://www.bf3r.de/cm/343/zahlen-zu-den-im-jahr-2020-verwendeten-versuchstieren.pdf>

Bundesinstitut für Risikobewertung (2022):

Animaltestinfo; abgerufen am 22.09.2022, um 15.59 Uhr von
https://www.animaltestinfo.de/act_search_file.cfm?CFID=35551967&CFTOKEN=501e9b7e37caad25-F6B7F831-B846-42FC-C0EA7A8FA04B37D3

Buyse, J., Janssens, K., Van der Geyten, S., Van As, P., Decuypere, E. und Darras, VM., (2002):

Pre- and postprandial changes in plasma hormone and metabolite levels and hepatic deiodinase activities in meal-fed broiler chickens. Br J Nutr., 88(6), S.641-653.

doi: 10.1079/BJN2002741

Callealta, I., Lueders, I., Luther-Binoir, I., Ganswindt, A. (2020):

Positive reinforcement conditioning as a tool for frequent minimally invasive blood and vaginal swab sampling in African lions (Panthera leo). J Appl Anim Welf Sci, 23(4), S. 508-

519. doi: 10.1080/10888705.2019.1709066

Campbell, TW. (1995):

Avian hematology and cytology. 2nd ed. ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press.

ISBN: 9780813829708

Campbell, DL., Taylor, PS., Hernandez, CE., Stewart, M., Belson, S. und Lee, C. (2019a):

An attention bias test to assess anxiety states in laying hens. PeerJ, 7, S. 7303.

doi: 10.7717/peerj.7303

Campbell, DL., De Haas, EN. und Lee, C. (2019b): A review of environmental enrichment for laying hens during rearing in relation to their behavioral and physiological development. *Poult Sci, 98(1), S.9-28. doi: 10.3382/ps/pey319*

Campler, M., Jöngren, M. und Jensen, P. (2009):

Fearfulness in red junglefowl and domesticated White Leghorn chickens. Behav Processes. 81(1), S.39-43. doi: 10.1016/j.beproc.2008.12.018

Cannon, WB. (1929):

Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage. Appleton, New York und London,

Herausgeber: Cannon Press (2007); ISBN: 978-1406755398

Carbajal, A., Tallo-Parra, O., Sabes-Alsina, M., Mular, I. und Lopez-Bejar, M. (2014):

Feather corticosterone evaluated by ELISA in broilers: a potential tool to evaluate broiler welfare. Poult Sci, 93(11), S.2884-2886. doi: 10.3382/ps.2014-04092

Carbillet, J., Rey, B., Lavabre, T., Chaval, Y., Merlet, J., Débias, F., Regis, C., Pardonnet, S., Duhayer, J., Gaillard, JM. und Hewison, AM. (2019):

The neutrophil to lymphocyte ratio indexes individual variation in the behavioural stress response of wild roe deer across fluctuating environmental conditions. Behav. Ecol. Sociobiol., 73(11), S.1-13. doi: 10.1007/s00265-019-2755-z

Carlstead, K. und Shepherdson, D. (2000):

Alleviating stress in zoo animals with environmental enrichment. In: The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare (Hrsg.: Moberg, GP., Mench, JA., CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK) S.337-354. ISBN: 0851993591

Caulfield, MP. und Padula, MP. (2020):

HPLC MS-MS analysis shows measurement of corticosterone in egg albumen is not a valid indicator of chicken welfare. Animals, 10(5), S.821. doi: 10.3390/ani10050821

Chacón, G., Laita, SGB., del Portal, JCl., Liesa, JP. (2004):

Validation of an EIA technique for the determination of salivary cortisol in cattle. Span. J. Agric. Res., (1), S.45-52. E-ISSN: 2171-9292; doi: 10.5424/sjar/2004021-59

Chera, S., Buzgariu, W., Ghila, L. und Galliot, B. (2009):

Autophagy in Hydra: a response to starvation and stress in early animal evolution. Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1793(9), S.1432-1443. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.03.010

Chloupek, P., Bedanova, I., Chloupek, J. und Vecerek, V. (2011):

Changes in selected biochemical indices resulting from various pre-sampling handling techniques in broilers. Acta Vet. Scand. 53:31. S. 1-7. doi: 10.1186/1751-0147-53-31

Choleris, E., Thomas, AW., Kavaliers, M. und Prato, FS. (2001):

A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. Neurosci Biobehav Rev., 25(3), S.235-260. doi: 10.1016/S0149-7634(01)00011-2

Cockrem, JF. (2007a):

Stress, corticosterone responses and avian personalities. J. Ornithol., 148(2), S.169-178. doi: 10.1007/s10336-007-0175-8

Cockrem, JF. (2007b):

Stress endocrinology and conservation. In: Hormone biotechnology (Saumen Kumar Maitra (Autor)), Daya Publishing House, Delhi, India, 1. Edition, S. 346-353. ISBN: 9788170354512

Cohen, J. (1988):

Statistical power analysis for the behavioral sciences (2. Edition). Hillsdale, NY: Lawrence Erlbaum Associates. ISBN: 0-8058-0283-5

Contreras-Aguilar, MD., Escribano, D., Quiles, A., López-Arjona, M., Cerón, JJ., Martínez-Subiela, S., Hevia, ML. und Tecles, F. (2019):

Evaluation of new biomarkers of stress in saliva of sheep. Animal, 13(6), S.1278-1286.

doi: 10.1017/S1751731118002707

Cook, NJ., Renema, R., Wilkinson, C. und Schaefer, AL. (2009):

Comparisons among serum, egg albumin and yolk concentrations of corticosterone as biomarkers of basal and stimulated adrenocortical activity of laying hens. Br Poult Sci, 50(5), S.620-633. doi: 10.1080/00071660903147424

Cornet, S., Bichet, C., Larcombe, S., Faivre, B., & Sorci, G. (2014):

Impact of host nutritional status on infection dynamics and parasite virulence in a bird-malaria system. J Anim Ecol., 83(1), S. 256-265. doi: 10.1111/1365-2656.12113

Craig, JV. und Adams, AW. (1984):

Behaviour and well-being of hens (Gallus domesticus) in alternative housing environments. Worlds Poult Sci J, 40(3), S.221-240. doi: 10.1079/WPS19840018

Cunnick, JE., Kojic, LD., Hughes, RA. (1994):

Stress-induced changes in immune function are associated with increased production of an interleukin-1-like factor in young domestic fowl. Brain Behav Immun., 8(2), S. 123-136.

doi: 10.1006/brbi.1994.1012

Dadone, L. I., Schilz, A., Friedman, S. G., Bredahl, J., Foxworth, S., Chastain, B. (2016):

Training giraffe (Giraffa camelopardalis reticulata) for front foot radiographs and hoof care.

Zoo Biol., 35(3), S. 228-236. doi: 10.1002/zoo.21279

Dalmau, A., Fabrega, E., Velarde, A. (2009):

Fear assessment in pigs exposed to a novel object test. Appl. Anim. Behav. Sci., 117(3-4), S. 173-180. doi: 10.1016/j.applanim.2008.12.014

Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union (2010):

Richtlinie 2010/63/EU vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, Anhang III. Amtsblatt der Europäischen Union. (ABl. L 276 vom 20.10.2010, S. 33)

Davidson, I., Altory-Natour, A., Haddas, R., Nagar, S., Meir, R., Avital-Cohen, N. und Rozenboim, I. (2020):

Evaluation of viral-induced stress by quantitating corticosterone in feathers of virus-infected specific pathogen-free chicks. J Appl Poult Res, 29(1), S.48-63. doi: 10.3382/japr/pfz027

Davison, TF. (2003):

The immunologists' debt to the chicken. Br Poult Sci, 44. Jg., Nr. 1, S. 6-21. doi: 10.1080/0007166031000085364

Davison, TF., Flack, IH. (1981):

Changes in the peripheral blood leucocyte populations following an injection of corticotrophin in the immature chicken, Res. Vet. Sci., 30 S. 79-82. doi: 10.1016/S0034-5288(18)32613-4

De Angelis, I., Ricceri, L., Vitale, A. (2019):

The 3R principle: 60 years taken well. Preface. Ann Ist Super Sanita., 55. Jg., Nr. 4, S. 398-399. doi: 10.4415/ANN_19_04_15

Dein, FJ. (1986):

Hematology. In: Harrison GJ and Harrison LR, (Hrsg.) Clinical Avian Medicine and Surgery. Philadelphia: WB Saunders Co, S. 174-191. ISBN: 978-0721612416

del Barrio, AS., Mansilla, WD., Navarro-Villa, A., Mica, JH., Smeets, JH., den Hartog, LA. und García-Ruiz, AI. (2020):

Effect of mineral and vitamin C mix on growth performance and blood corticosterone concentrations in heat-stressed broilers. J Appl Poult Res, 29(1), S.23-33.

doi: 10.1016/j.japr.2019.11.001

Dereli Fidan, E., Türkyılmaz, MK., Nazlıgül, A., Ünübol Aypak, S., Karaarslan, S. (2018):

Effect of Preslaughter Shackling on Stress, Meat Quality Traits, and Glycolytic Potential in Broilers. J. Agr. Sci. Tech. Vol. 17: S. 1141-1150. DOR:20.1001.1.16807073.2015.17.5.2.1

url: <http://ir.jkuat.ac.ke/handle/123456789/3840>

Dhabhar, FS., Miller, AH, McEwen, BS. und Spencer, RL. (1996):

Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. J Immunol., 157(4), S.1638-1644. ISSN: 1550-6606,

url: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8759750/>

Dhabhar, FS. (2002):

Stress-induced augmentation of immune function—The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. Brain Behav. Immun., 16, S. 785-798.

doi: 10.1016/S0889-1591(02)00036-3

Die Europäische Kommission (2007):

Empfehlung der Kommission 2007/526/EG vom 18. Juni 2007 mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden, S. 65 – 71, Amtsblatt der Europäischen Union

Dossey, NS. (2009):

Effects of Play Experience on Fear-related Behavior of Chickens (Dissertation, Washington State University). ID: 99900525295501842

url: <https://rex.libraries.wsu.edu/esploro/outputs/graduate/Effects-of-play-experience-on-fear-related/99900525295501842>

Downing, JA. und Bryden, WL. (2008):

Determination of corticosterone concentrations in egg albumen: a non-invasive indicator of stress in laying hens. Physiol Behav, 95(3), S.381-387. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.07.001

Döcke, F. (1994):

Nebennierenrinde. In: F. Döcke (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Aufl., Fischer Verlag, Jena, S. 314-333. ISBN: 9783334604328

Duncan, IJ., Widowski, TM., Malleau, AE., Lindberg, AC. und Petherick, JC. (1998):

External factors and causation of dustbathing in domestic hens. Behav Processes, 43(2), S.219-228. doi: 10.1016/S0376-6357(98)00017-5

Dupont, J., Derouet, M., Simon, J. und Taouis, M. (1999):

Corticosterone alters insulin signaling in chicken muscle and liver at different steps. J Endocrinol., 162(1), S.67-76. doi: 10.1677/joe.0.1620067

Edgar, JL., Nicol, CJ., Pugh, CA., Paul, ES. (2013):

Surface temperature changes in response to handling in domestic chickens. Physiol Behav, 119, S. 195-200. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.06.020

Egbunike, GN. (1979):

The Relative Importance of Dry-and Wet-bulb Temperatures in the Thermo-respiratory Function in the Chicken. Zentralbl Veterinarmed A, 26(7), 573-579.

doi: 10.1111/j.1439-0442.1979.tb01634.x

Ehinger, F. und Gschwindt, B. (1981): *Einfluss unterschiedlicher Transportzeiten auf die Fleischqualität und auf physiologische Merkmale bei Broilern verschiedener Herkunft. Archiv für Geflügelkunde. Band 45, Ausgabe 6, S.260-265. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart. ISSN : 0003-9098*

Ellis, B.J., Jackson, J.J. und Boyce, W.T. (2006):

The stress response systems: Universality and adaptive individual differences. Dev Rev, 26(2), S.175-212. doi: 10.1016/j.dr.2006.02.004

Ellis, S., Greening, L. (2016):

Positively reinforcing an operant task using tactile stimulation and food—A comparison in horses using clicker training. J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res, 15. Jg., S. 78.

doi: 10.1016/j.jveb.2016.08.008

Emmanuel, B., Berzins, R. und Robblee, A.R. (1982):

Rates of entry and oxidation of D (-)-3-hydroxybutyrate and glucose in fed and fasted chickens. Poult Sci, 61(12), S.2435-2439. doi: 10.3382/ps.0612435

Ericsson, M., Fallahsharoudi, A., Bergquist, J., Kushnir, M.M. und Jensen, P. (2014):

Domestication effects on behavioural and hormonal responses to acute stress in chickens.

Physiol Behav, 133, S.161-169. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.024

Erkekoglu, P., Giray, B.K., Basran, N. (2011):

3R principle and alternative toxicity testing methods. Fabad J Pharm Sci, 36. Jg., Nr. 1, S.101-117. ISSN: 1300-4182, e-ISSN: 2651-4648;

url: <http://dergi.fabad.org.tr/pdf/volum36/issue2/101-117.pdf>

Fair, J., Whitaker, S., Pearson, B. (2007):

Sources of variation in haematocrit in birds. Ibis. doi: 10.1111/j.1474-919X.2007.00680.x

Fell, L.R., Shutt, D.A. und Bentley, C.J. (1985):

Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma "free" cortisol arising from acute stress in sheep. Aust Vet J, 62(12), S.403-406.

doi: 10.1111/j.1751-0813.1985.tb14120.x

Filaretova, L., und Bagaeva, T. (2016):

The Realization of the Brain-Gut Interactions with Corticotropin-Releasing Factor and Glucocorticoids. Curr Neuropharmacol, 14(8), S.876–881.

doi:10.2174/1570159x14666160614094234

Florence, BD., Svendsen, L., Stodulski, G., Crowley, A. und Hau, J. (1995):
Assessment of lacrimal IgA as a potential parameter for measurement of long term stress in poultry. In vivo (Athens, Greece), 9(1), S.19-25. PMID: 7669944,
url: <https://europepmc.org/article/med/7669944>

Fölsch, DW., Vestergaard, K. (1981):
Das Verhalten von Hühnern. / The behavior of Fowl. Das Normalverhalten und die Auswirkung verschiedener Haltungssysteme und Aufzuchtmethoden. Band 12. Birkhäuser (Hrsg.), Springer Basel. ISBN 978-3-7643-1240-4.

Fölsch, DW., Gozzoli, L., Hauser, RH., Huber, HU. (1989):
Hühnerhaltung—Eine Herausforderung. In: Artgemässe Nutztierhaltung und ökologisch orientierte Landwirtschaft, S. 71-89. Birkhäuser, Basel. doi: 10.1007/978-3-0348-5271-5_7

Fraisse, F. und Cockrem, JF. (2006):
Corticosterone und fear behaviour in white and brown caged laying hens. Br Poult Sci, 47(2), S.110-119. doi: 10.1080/00071660600610534

Freeman, BM. (1966):
Physiological Responses of the adult fowl to environmental temperature. World Poult. Sci. J., 22 (2): S. 140–145. doi: 10.1079/WPS19660021

Freeman, BM. (1971a):
Stress and the domestic fowl: a physiological appraisal. World Poult. Sci. J. 27, S. 263-275. doi: 10.1079/WPS19710033

Freeman, BM. (1971b):
The corpuscles and the physical characteristics of blood. In: Bell, DJ. und Freeman, BM. (Hrsg.), Physiology and biochemistry of the domestic fowl (2) London, New York. ISBN : 012085001X

Freeman, BM. (1985):
Stress in the domestic fowl: Physiological fact or fantasy? World.Poult. Sci. J. 41, S. 45-51. doi: 10.1079/WPS19850004

Freeman, NE. und Newman, AE. (2018):

Quantifying corticosterone in feathers: validations for an emerging technique. *Conserv Physiol*, 6(1), p.coy051. doi: 10.1093/conphys/coy051

Fries, E. und Kirschbaum, C. (2009):

Chronischer Stress und stressbezogene Erkrankungen. Stress-und Schmerzursachen verstehen. In: Gesundheitspsychologie und-soziologie in Prävention und Rehabilitation, Wippert, P.; Beckmann, J. (Hrsg.), Thieme; 1. Edition, S.113-126. ISBN: 978-3131440112

Galli, S.J., Borregaard, N. und Wynn, TA. (2011):

Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. Nat Immunol, 12(11), S.1035. doi: doi.org/10.1038/ni.2109

Gallup Jr, GG., Rager, DR. und Scheuerman, KW. (1990):

Predatory aspects of open field testing: Towards a functional analysis of ongoing behaviour in chickens. Bird Behavior, 8(2), Cognizant Communication Corporation (Hrsg.) S.67-72. doi: 10.3727/015613890791784263

Gallup Jr, GG. und Suarez, SD. (1980):

An ethological analysis of open-field behaviour in chickens. Animal Behaviour, 28(2), S.368-378. doi: 10.1016/S0003-3472(80)80045-5

German, A.J., Hall, E.J. und Day, M.J. (1998):

Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. Vet Immunol Immunopathol., 64(2), S.107-121. doi: 10.1016/S0165-2427(98)00132-9

Gershon, M. (2001):

Der kluge Bauch. Die Entdeckung des zweiten Gehirns. Goldmann, München, ISBN 3-442-15114-7. ISBN: 978-3442151141

Gillis, TE., Janes, AC. und Kaufman, MJ. (2012):

Positive reinforcement training in squirrel monkeys using clicker training. Am J Primatol., 74(8), S.712-720. doi: 10.1002/ajp.22015

Goymann, W., Möstl, E. und Gwinner, E. (2002):

*Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). The Auk*, 119(4), S. 1167-1173. doi: 10.1093/auk/119.4.1167

Goymann, W. (2005):

Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. Ann N Y Acad Sci., 1046(1), S.35-53. doi: 10.1196/annals.1343.005

Götz, A. (2007):

Soziale Belastung während der Trächtigkeit bei Long-Evans Laborratten (Rattus norvegicus) und ihre Effekte auf die Reproduktion sowie die Physiologie, das Verhalten und die Reproduktion ihrer Nachkommen (Dissertation, Universität Bayreuth).

urn: urn:nbn:de:bvb:703-opus-3820. URL: <https://epub.uni-bayreuth.de/664/>

Greenwood, PL. und Shutt, DA. (1992):

Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Aust Vet J.*, 69(7), S.161-163.

doi: 10.1111/j.1751-0813.1992.tb07501.x

Gross, WB. (1989):

Factors affecting chicken thrombocyte morphology and the relationship with heterophil : lymphocyte ratios. Br Poult Sci., 30, S. 919-925. doi: 10.1080/00071668908417218

Gross, WB. und Siegel, HS. (1983):

Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. Avian dis., S.972-979. doi: 10.2307/1590198

Guhl, AM. (1953):

Social behavior of domestic fowl. Trans Kans Acad Sci. 1968 Fall;71(3), S.379-384. PMID: 5704248. url: <https://www.jstor.org/stable/3627156>

Gvaryahu, G., Ararat, E., Asaf, E., Lev, M., Weller, J.I., Robinzon, B. und Snapir, N. (1994):

An enrichment object that reduces aggressiveness and mortality in caged laying hens.

Physiol. Behav., 55(2), S.313-316. doi: 10.1016/0031-9384(94)90139-2

Gylstorff, I. und Grimm, F. (1987):

Vogelkrankheiten. Verlag Eugen Ulmer, UTB GmbH, Stuttgart. ISBN: 978-3800125418

Haase, G., Baumgartner, K., von Fersen, L., Merle, R., Wiegard, M., Will H, Reese L, Tallo-Parra O, Carbajal A, Lopez-Bejar M, Thoene-Reineke C. (2021):

Feather Corticosterone Measurements and Behavioral Observations in the Great White Pelican (Pelecanus onocrotalus) Living under Different Flight Restraint Conditions in German Zoos. Animals, 11(9), S. 2522. doi: 10.3390/ani11092522

Haemish, A. (1990):

Coping with a social conflict, and short-term changes of plasma cortisol titers in familiar and unfamiliar environments. Physiol. Behav. 47, S.1265-1270.

doi: 10.1016/0031-9384(90)90381-D

Hall, CS. (1934):

Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. J. Comp. Psychol., 18(3), S.385. doi: 10.1037/h0071444

Harris, CM., Madliger, CL. und Love, OP. (2017):

An evaluation of feather corticosterone as a biomarker of fitness and an ecologically relevant stressor during breeding in the wild. Oecologia, 183(4), S.987-996.

doi: 10.1007/s00442-017-3836-1

Hartanto, S., Ko, HS., Jee, SH., Kang, JU., Seo, JS., Kang, YH., Kim, HN. und Ohh, SJ. (2019):

Effect of dietary nutmeg oil on heat stress tolerance related parameters in Korean native chicken reared under hot temperature. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 103(4), S.1160-1167. doi: 10.1111/jpn.13113

Hasan Siddiqui, S., Kang, D., Park, J., Choi, HW. und Shim, K. (2020):

Acute heat stress induces the differential expression of heat shock proteins in different sections of the small intestine of chickens based on exposure duration. Animals, 10(7), S.1234. doi: 10.3390/ani10071234

Häffelin, KE. (2021):

Messung von Corticosteron in Federn von Jung-und Legehennen (Dissertation, TiHo Hannover) urn: urn:nbn:de:gbv:95-115774

url: https://elib.tiho-hannover.de/receive/tiho_mods_00004971

Häffelin, KE., Kaufmann, F., Lindenwald, R., Döhring, S., Spindler, B., Preisinger, R., Rautenschlein, S., Kemper, N. und Andersson, R. (2021):

Corticosterone in feathers: Inter- and intraindividual variation in pullets and the importance of the feather type. Vet Anim Sci., S.100155. doi: 10.1016/j.vas.2020.100155

Häffelin, KE., Lindenwald, R., Kaufmann, F., Döhring, S., Spindler, B., Preisinger, R., Rautenschlein, S., Kemper, N. und Andersson, R. (2020):

Corticosterone in feathers of laying hens: an assay validation for evidence-based assessment of animal welfare. Poult Sci, 99(10), S.4685-4694.

doi: 10.1016/j.psj.2020.06.065

Hedlund, L. und Jensen, P. (2021):

Incubation and hatching conditions of laying hen chicks explain a large part of the stress effects from commercial large-scale hatcheries. Poult Sci, 100(1), S.1-8.

doi: 10.1016/j.psj.2020.10.015

Hernandez, CE., Thierfelder, T., Svennersten-Sjaunja, K., Berg, C., Orihuela, A., Lidfors, L. (2014):

Time lag between peak concentrations of plasma and salivary cortisol following a stressful procedure in dairy cattle. Acta Vet Scand., 56(1), S.1-8. doi: 10.1186/s13028-014-0061-3

Hirschenhauser, K., Spreitzer, K., Lepschy, M., Kotrschal, K. und Möstl, E. (2012):

Excreted corticosterone metabolites differ between two galliform species, Japanese Quail and Chicken, between sexes and between urine and faecal parts of droppings. J. Ornithol., 153(4), S.1179-1188. doi: 10.1007/s10336-012-0848-9

Hörak, P., Jenni-Eiermann, S., Ots, I. und Tegelmann, L. (1998):

Health and reproduction: the sex-specific clinical profile of great tits (Parus major) in relation to breeding. Can J Zool, 76(12), S. 2235-2244. doi: 10.1139/z98-154

Hu, JY., Hester, PY., Xiong, Y., Gates, RS., Makagon, MM. und Cheng, HW. (2019):

Effect of cooled perches on the efficacy of an induced molt in White Leghorn laying hens previously exposed to heat stress. Poult Sci, 98(10), S.4290-4300. doi: 10.3382/ps/pez317

Hughes, BO. und Duncan, IJH. (1972):

The influence of strain and environmental factors upon feather pecking and cannibalism in fowls. Br Poult Sci, 13(6), S.525-547. doi: 10.1080/00071667208415981

Hunsaker, WG. (1969):

Effect of centrifugal force on packed cell volume and trapped plasma in avian blood. Poult Sci, 48(2), S. 705-711. doi: 10.3382/ps.0480705

Huth, JC., Archer, GS. (2015):

Comparison of two LED light bulbs to a dimmable CFL and their effects on broiler chicken growth, stress, and fear. Poult Sci., 94, S. 2027-2036. doi: 10.3382/ps/pev215

Jiang, KJ., Jiao, HC., Song, Z.G., Yuan, L., Zhao, J.P. und Lin, H. (2008):

Corticosterone administration and dietary glucose supplementation enhance fat accumulation in broiler chickens. Br Poult Sci, 49(5), S.625-631.

doi: 10.1080/00071660802337241

Johnsson, M., Williams, MJ., Jensen, P. und Wright, D. (2016):

Genetical genomics of behavior: a novel chicken genomic model for anxiety behavior. Genetics, 202(1), S.327-340. doi: 10.1534/genetics.115.179010

Jones, RB., (1982):

Effects of early environmental enrichment upon open-field behavior and timidity in the domestic chick. Dev Psychobiol. 15(2), S.105-111. doi: 10.1002/dev.420150203

Jones, RB., (1987):

Fearfulness of caged laying hens: the effects of cage level and type of roofing. Appl. Anim. Behav. Sci., 17(1-2), S.171-175. doi: 10.1016/0168-1591(87)90018-9

Jones, RB., Blokhuis, HJ. und Beuving, G. (1995):

Open field and tonic immobility responses in domestic chicks of two genetic lines differing in their propensity to feather peck. Br Poult Sci, 36(4), S.525-530.

doi: 10.1080/00071669508417798

Jønholt, L., Bundgaard, CJ., Carlsen, M., Sørensen, DB. (2021):

A Case Study on the Behavioural Effect of Positive Reinforcement Training in a Novel Task Participation Test in Göttingen Mini Pigs. Animals, 11(6), S. 1610. doi:10.3390/ani11061610

Kaab, H., Bain, MM. und Eckersall, PD. (2018):

Acute phase proteins and stress markers in the immediate response to a combined vaccination against Newcastle disease and infectious bronchitis viruses in specific pathogen free (SPF) layer chicks. Poult Sci, 97(2), S.463-469. doi: 10.3382/ps/pex340

Kang, HK., Park, SB., Kim, SH. und Kim, CH. (2016):

Effects of stock density on the laying performance, blood parameter, corticosterone, litter quality, gas emission and bone mineral density of laying hens in floor pens. Poult Sci, 95(12), S.2764-2770. doi: 10.3382/ps/pew264

Kauke, M. und Savary, P. (2010):

Effect of noise and vibration in milking parlour on dairy cow. Recherche Agronomique Suisse (3). S. 96–101. ISSN: 1663-7852. url: https://www.agrarforschungschweiz.ch/wp-content/uploads/2019/12/2010_03_1551.pdf

Kiesel, A. und Koch, I. (2012):

Beobachtungslernen–Lernen am Modell. In: Lernen. Andrea Kiesel (Hrsg.) VS Verlag für Sozialwissenschaften. S.73-81. eISBN: 978-3-531-93455-6
doi: 10.1007/978-3-531-93455-6_7

Kirschbaum, C. und Hellhammer, DH. (2000):

Salivary cortisol. In: Encyclopedia of stress. Fink, G., Academic Press, San Diego, S.379-383. ISBN: 978-0122267383

Klasing, KC., (2005):

Potential impact of nutritional strategy on noninvasive measurements of hormones in birds. Ann N Y Acad Sci, 1046(1), S.5-16. doi: 10.1196/annals.1343.003

Knowles, TG. Und Broom, DM (1990):

The handling and transport of broilers and spent hens. Appl Anim Behav Sci, 28(1-2), S.: 75-91. doi: 10.1016/0168-1591(90)90047-H

Knowles, TG. und Broom, DM. (1993):

Effect of catching method on the concentration of plasma corticosterone in end-of-lay battery hens. Vet. Rec. 133, S. 527-528. doi: 10.1136/vr.133.21.527

Kobayashi, H. und Miyazaki, Y. (2015):

Distribution characteristics of salivary cortisol measurements in a healthy young male population. J Physiol Anthropol, 34(1), S. 1-4.
doi: 10.1186/s40101-015-0068-0

Kobelt, AJ., Hemsworth, PH., Barnett, JL., Butler, KL. (2003):

Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. Res Vet Sci, 75(2), S.157-161.
doi: 10.1016/S0034-5288(03)00080-8

Kogan, L., Kolus, C. und Schoenfeld-Tacher, R. (2017):

Assessment of clicker training for shelter cats. Animals, 7(10), S.73.
doi: 10.3390/ani7100073

Koolhaas, JM., Korte, SM., De Boer, SF., Van Der Vegt, BJ., Van Reenen, CG., Hopster, H., De Jong, IC., Ruis, MAW. und Blokhuis, HJ. (1999):

Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. Neurosci Biobehav Rev, 23(7), S.925-935. doi: 10.1016/S0149-7634(99)00026-3

Korbel, R., Lierz, M. (2014):

Klinische Labordiagnostik beim Vogel. Spezielle Untersuchungen und Labordiagnostik ausgewählter Tierspezies. In: Kraft, W. und Dürr, UM.; Möritz, A. (Herausgeber) Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 7. Auflage. Schattauer Verlag. ISBN: 9783794527373

Kovács, L., Kézér, FL., Póti, P., Boros, N. und Nagy, K. (2020):

Upper critical temperature-humidity index for dairy calves based on physiological stress variables. J Dairy Sci, 103(3), S.2707-2710. doi: 10.3168/jds.2019-17459

Kowalski, A., Sokol, R., Jedlińska-Krakowska, M. (2006):

*Wpływ inwazji ptaszyńca *Dermanyssus gallinae* na poziom kortykosteronu oraz wskaźników immunologicznych i hematologicznych u kur niosek. Med. Wet*, 62(10), S. 1188-1190.

url: <http://www.medycynawet.edu.pl/images/stories/pdf/pdf2006/10/200610s11881190.pdf>

König, HE. Und Weissengruber, G. (2001):

Endokrine Drüsen. In: Anatomie und Propädeutik des Geflügels. König, HE. und Liebich, HG. (Herausgeber). Stuttgart, Schattauer Verlagsgesellschaft mbH. S.192. ISBN: 978-3794520718

Lagadic, H., Faure, JM., Mills, AD. und Williams, JB. (1990):

Effects of blood sampling on plasma concentrations of corticosterone and glucose in laying hens caged in groups. *Br Poult Sci*, 31(4), S.823-829. doi: 10.1080/00071669008417313

Lages, YV., Maisonnette, SS., Marinho, B., Rosseti, FP., Krahe, TE. and Landeira-Fernandez, J. (2021):

Behavioral effects of chronic stress in Carioca high-and low-conditioned freezing rats. Stress, 24(5), S.602-611. doi: 10.1080/10253890.2021.1934445

Lattin, CR., Reed, JM., DesRochers, DW. und Romero, LM. (2011):

Elevated corticosterone in feathers correlates with corticosterone induced decreased feather quality: a validation study. J Avian Biol, 42(3), S.247-252.

doi: 10.1111/j.1600-048X.2010.05310.x

Laule, GE., Bloomsmith, MA. und Schapiro, SJ. (2003):

The use of positive reinforcement training techniques to enhance the care, management, and welfare of primates in the laboratory. J Appl Anim Welf Sci, 6(3), S.163-173.

doi: 10.1207/S15327604JAWS0603_02

Leidinger, C., Herrmann, F., Thöne-Reineke, C., Baumgart, N. und Baumgart, J. (2017): *Introducing clicker training as a cognitive enrichment for laboratory mice. J Vis Exp: JoVE, (121).* doi: 10.3791/55415

Lensen, CM., Moons, CP., Diederich, C. (2015):

Saliva sampling in dogs: How to select the most appropriate procedure for your study. J Vet Behav. 10(6), S. 504-512. doi: 10.1016/j.jveb.2015.08.006

Levan, NF., Estevez, I. und Stricklin, WR. (2000):

Use of horizontal and angled perches by broiler chickens. Appl Anim Behav Sci., 65(4), S.349-365. doi: 10.1016/S0168-1591(99)00059-3

Lieboldt, MA., (2015):

Effects of dietary L-arginine on metabolism and immune response in layer-type chickens of different genetic backgrounds under physiological and pathophysiological conditions (Dissertation, TiHo Hannover). URN: urn:nbn:de:gbv:95-107397
url: https://elib.tiho-hannover.de/dissertations/lieboldtm_ws15

Li, H., Sheng, LP., Wang, B., Yang, ZL. und Liu, SY. (2015):

An optimized method for corticosterone analysis in mouse plasma by ultra-performance liquid chromatography-full-scan high-resolution accurate mass spectrometry. J Chromatogr Sci., 53(2), S.285-294. doi: 10.1093/chromsci/bmu056

Li, W., Wei, F., Xu, B., Sun, Q., Deng, W., Ma, H., Bai, J. und Li, S. (2019):

Effect of stocking density and alpha-lipoic acid on the growth performance, physiological and oxidative stress and immune response of broilers. Asian-Australas J Anim Sci., 32(12). doi: 10.5713/ajas.18.0939

Li, RF., Liu, SP., Yuan, ZH., Yi, JE., Tian, YN., Wu, J. und Wen, LX. (2020):

Effects of induced stress from the live LaSota Newcastle disease vaccination on the growth performance and immune function in broiler chickens. Poult Sci, 99(4), S.1896-1905. doi: 10.1016/j.psj.2019.12.004

Lisney, T.J., Rubene, D., Rózsa, J., Løvlie, H., Håstad, O. und Ödeen, A. (2011): *Behavioural assessment of flicker fusion frequency in chicken Gallus gallus domesticus*. *Vision research*, 51(12), S. 1324-1332.

doi: 10.1016/j.visres.2011.04.009

Liu, L., Song, Z., Sheikahmadi, A., Jiao, H. und Lin, H. (2012):

Effect of corticosterone on gene expression of feed intake regulatory peptides in laying hens. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 162(4), S.81-87.

doi: 10.1016/j.cbpb.2012.04.005

Loeffler, K., Gäbel, G. (2009):

Anatomie und Physiologie der Haustiere. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart-Hohenheim, 12. Auflage. S. 416-417. ISBN: 978-3-8252-0013-8

Lohmann-Breeders; Onlinepräsenz:

<https://lohmann-breeders.com/strains/lohmann-lsl-classic-alternative-housing#production>;
Abgerufen am 12.07.2022 um 17.55 Uhr

Loliger, HCH., von dem Hagen, D. und S. Matthes. (1980):

Tiergesundheit und klinische Parameter als Indiz für die Beurteilung tierschutzrelevanter Tatbestände in der Geflügelhaltung. *Archiv für Geflügelkunde*, Band 44, Ausgabe 6, S.229-236. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart. ISSN: 0003-9098

López-Arjona, M., Escribano, D., Mateo, SV., Contreras-Aguilar, MD., Rubio, CP., Tecles, F., Cerón, JJ. und Martínez-Subiela, S. (2020):

Changes in oxytocin concentrations in saliva of pigs after a transport and during lairage at slaughterhouse. *Res Vet Sci*, 133, S.26-30. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.08.015

Mack, LA., Felver-Gant, JN., Dennis, RL. und Cheng, HW. (2013):

Genetic variations alter production and behavioral responses following heat stress in 2 strains of laying hens. *Poult Sci*, 92(2), S.285-294. doi: 10.3382/ps.2012-02589

Malisch, JL. und Breuner, CW. (2010):

Steroid-binding proteins and free steroids in birds. *Mol Cell Endocrinol*, 316(1), S.42-52.
doi: 10.1016/j.mce.2009.09.019

Manciocco, A., Chiarotti, F., Vitale, A., Calamandrei, G., Laviola, G., & Alleva, E. (2009):

The application of Russell and Burch 3R principle in rodent models of neurodegenerative disease: the case of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 33(1), S. 18-32.

doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.08.002

Marino, L. (2017):

Thinking chickens: a review of cognition, emotion, and behavior in the domestic chicken, *Anim Cogn* 20:127–147, doi: 10.1007/s10071-016-1064-4

Markowski, M., Kaliński, A., Bańbura, M., Gładalski, M., Wawrzyniak, J., Skwarska, J., Bańbura, J. (2020):

Effects of experimental lead exposure on physiological indices of nestling great tits Parus major: haematocrit and heterophile-to-lymphocyte ratio, *Conserv Physiol.*, Volume 7, Issue 1, coz067. doi: 10.1093/conphys/coz067

Martin, G. (2005):

Das Nahrungserwerbsverhalten beim Haushuhn und die davon abgeleiteten Verhaltensstörungen Federpicken und Kannibalismus. In: Das Wohlergehen von Legehennen in Europa: Berichte, Analysen und Schlussfolgerungen, G. Martin, H.H. Sambras und A. Steiger (Hrsg.), *Internationale Gesellschaft für Nutztierhaltung IGN, Verlag Universität Kassel, Reihe Tierhaltung Band 28, S. 34-61. ISBN 3-00-015577-5*

Maxwell, M. (1993):

Avian blood leukocyte response to stress. World. Poult. Sci. J. 49, S. 34-43. doi: 10.1079/WPS19930004

McFarelane, JM., Curtis, SE., Simon, J., und Izquierdo, OA. (1989):

Multiple concurrent stressors in chicks: 2. Effects on hematologic, body composition, and pathologic traits. Poult Sci. 68, S.510-521. doi: 10.3382/ps.0680510

Mehner, A., Hartfiel, W. (1983):

Handbuch der Geflügelphysiologie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. ISBN: 978-3334000731

Mendel, CM. (1989):

The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. Endocr Rev. 10, S.232-246. doi: 10.1210/edrv-10-3-232

Mert, N., Yildirim, BA. (2016):

Biochemical parameters and histopathological findings in the forced molt laying hens. Braz J Poult Sci, 18(4), S. 711-718. doi: 10.1590/1806-9061-2015-0032

Metz, M., Piliponsky, AM., Chen, CC., Lammel, V., Åbrink, M., Pejler, G., Tsai, M. und Galli, SJ. (2006):

Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. Science, 313(5786), S.526-530. doi: 10.1126/science.112887

Meuser, V., Weinhold, L., Hillemacher, S. und Tiemann, I. (2021):

Welfare-related behaviors in chickens: characterization of fear and exploration in local and commercial chicken strains. Animals, 11(3), S.679. doi: 10.3390/ani11030679

Minias, P. (2020):

Ecology und Evolution of Blood Oxygen-Carrying Capacity in Birds. *Am Nat.* 195(5): S.788-801. doi: 10.1086/707720

Mirfendereski, E., Jahanian, R. (2015):

Effects of dietary organic chromium and vitamin C supplementation on performance, immune responses, blood metabolites, and stress status of laying hens subjected to high stocking density. *Poult Sci, 94(2), S. 281-288. doi: 10.3382/ps/peu074*

Moberg, GP. und Mench, JA. (2000):

The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, ISBN: 0851993591

Mohamed, R., Abou-Elnaga, A., Ghazy, E., Mohammed, H., Shukry, M., Farrag, F., Mohammed, G. und Bahattab, O. (2020):

Effect of different monochromatic LED light colour and intensity on growth performance, physiological response and fear reactions in broiler chicken. It J An Sci, 19(1), S.1099-1107. doi: 10.1080/1828051X.2020.1821802

Mohammed, AA., Jacobs, JA., Murugesan, GR. und Cheng, HW. (2018):

Effect of dietary synbiotic supplement on behavioral patterns and growth performance of broiler chickens reared under heat stress. Poult Sci, 97(4), S.1101-1108. doi: 10.3382/ps/pex421

Moeser, AJ., Ryan, KA., Nighot, PK. und Blikslager, AT. (2007):

Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 293(2), S.413-421. doi: 10.1152/ajpgi.00304.2006

- Monclús, L., Tallo-Parra, O., Carbajal, A., Quevedo, MA. und Lopez-Bejar, M. (2020):
*Feather corticosterone in Northern Bald Ibis *Geronticus eremita*: a stable matrix over time able to predict reproductive success.* *J Ornithol.*, 161:557–567. doi: 10.1007/s10336-019-01741-z
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca X., Manteuffel, G., Prinet P., van Reenen CG. und Veissier, I. (2007):
Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol behav*, 92(3), S. 317-339. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.12.003
- Morrow-Tesch, JL., Mc Glone, JJ., Salak-Johnson, JL. (1994):
Heat and social stress effects on pig immune measures. *J Anim Sci*, Volume 72, Issue 10, S. 2599–2609. doi: 10.2527/1994.72102599x
- Möbius, G. (2010):
Stallklima und dessen Überprüfung in der Nutztierhaltung. In: Leipziger Blaue Hefte, LBH: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress –Suppl. Workshops S. 112-113. ISBN: 978-3-86583-402-7
- Möstl, E., Rettenbacher, S. und Palme, R. (2005):
Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. *Ann N Y Acad Sci*, 1046(1), S.17-34. doi: 10.1196/annals.1343.004
- Nagra, CL. und Meyer, RK. (1963):
Influence of corticosterone on the metabolism of palmitate and glucose in cockerels. *Gen Comp Endocrinol*, 3(2), S.131-138. doi: 10.1016/0016-6480(63)90032-7
- Najafi, P., Zulkifli, I., Soleimani, AF. und Goh, YM. (2016):
Acute phase proteins response to feed deprivation in broiler chickens. *Poult Sci*, 95(4), S.760-763. doi: 10.3382/ps/pew001
- Nakhla, AM., Khan, MS., Rosner, W. (1988):
Induction of adenylate cyclase in a mammary carcinoma cell line by human corticosteroid-binding globulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 153(3): 1012-1018.
doi: 10.1016/S0006-291X(88)81329-9
- Neff, C. (2000):
*Die Belastung von Federfüßigen Zwerghühnern (*Gallus gallus f. dom.*), Sächsischen Feldfarbentauben (*Columba livia f. dom.*) und Zwergenten (*Anas platyrhynchos f. dom.*)*

durch unterschiedliche Beförderungsarten in einem speziellen Transportkarton (Dissertation, TiHo Hannover). URN: urn:nbn:de:gbv:95-82727

url: https://elib.tiho-hannover.de/receive/etd_mods_00003230

Nemeth, M., Pschernig, E., Wallner, B. und Millesi, E. (2016):

Non-invasive cortisol measurements as indicators of physiological stress responses in guinea pigs. PeerJ, 4, S. 1590. doi: 10.7717/peerj.1590

Neubert, E. und Guertler, H. (1996):

Metabolic effects of insulin, glucagon and adrenergic agonists in laying hens. Archiv für Geflügelkunde. Band 60, S. 29-37. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, ISSN: 0003-9098

Newell, GW. und Schaffner, CS. (1950):

Blood volume determinations in chickens. Poult Sci., 29: S.78–87. doi: 10.3382/ps.0290078

Newman, AEM., Chin, EH., Schmidt, KL., Bond, L., Wynne-Edwards, KE. und Soma, KK., (2008):

Analysis of steroids in songbird plasma and brain by coupling solid phase extraction to radioimmunoassay. Gen Comp Endocrinol, 155(3), S.503-510.

doi: 10.1016/j.ygcen.2007.08.007

Nichelmann, M. (1999):

Bedeutung der Klimafaktoren und der Klimaadaptation. In: Horst, P., Reh, I. (Hrsg.), Tierzucht in den Tropen und Subtropen. Ulmer Verlag Stuttgart, S. 35–48. ISBN: 3800132044

Nissa, SS., Sheikh, IU., Banday, MT., Zaffer, B., Shafiq, S., Chishti, A. und Qureshi, AI. (2018):

Estimation of stress level of broiler chicken reared under different sources of light. J Entomol Zool Stud. 6(5): 363-365, e-ISSN:2320-7078. uri:

<https://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue5/PartF/6-4-371-806.pdf>

Nordquist, RE., Zeinstra, EC., Dougherty, A. und Riber, AB. (2020):

Effects of dark brooder rearing and age on hypothalamic vasotocin and feather corticosterone levels in laying hens. Front Vet Sci., 7, S.19. doi: 10.3389/fvets.2020.00019

Nowaczewski, S., Kontecka, H. (2012):

Haematological indices, size of erythrocytes and haemoglobin saturation in broiler chickens kept in commercial conditions. Anim Sci Pap Rep. Auflage 30, Nr. 2, S. 181-190.

url: <https://web.p.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=4ffd3df6-ae55-4896-86f2-d1429ad58caf%40redis> ,ISSN: 0860-4037.

O'Connor, MD (2013):

The 3R principle: advancing clinical application of human pluripotent stem cells. Stem Cell Res Ther., 4. Jg., Nr. 2, S. 1-7. doi: 10.1186/scrt169

Okumura, JI., Tasaki, I. (1969):

Effect of fasting, refeeding and dietary protein level on uric acid and ammonia content of blood, liver and kidney in chickens. J Nutr., 97(3), S. 316-320. doi: 10.1093/jn/97.3.316

Olanrewaju, HA., Purswell, JL., Collier, SD., Branton, SL. (2014):

Effects of genetic strain and light intensity on blood physiological variables of broilers grown to heavy weights. Poult Sci., 93, S. 970-978. doi: 10.3382/ps.2013-03613

Ortolani, D., Oyama, LM., Ferrari, EM., Melo, LL., Spadari-Bratfisch, RC. (2011):

Effects of comfort food on food intake, anxiety-like behavior and the stress response in rats. Physiol Behav., 103(5), S. 487-492. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.03.028

Palme, R. (2005):

Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. Ann N Y Acad Sci., 1046(1), S.75-80. doi: 10.1196/annals.1343.007

Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., ElBahr, SM. und Möstl, E. (2005):

Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. Ann N Y Acad Sci., 1040(1), S.162-171. doi: 10.1196/annals.1327.021

Park, BS., Um, KH., Park, SO. und Zammit, VA. (2018):

Effect of stocking density on behavioral traits, blood biochemical parameters and immune responses in meat ducks exposed to heat stress. Arch Anim Breed., 61(4), S.425-432. doi: 10.5194/aab-61-425-2018

Parrott, RF. und Misson, BH. (1989):

Changes in pig salivary cortisol in response to transport simulation, food and water deprivation, and mixing. Br Vet J., 145(6), S.501-505. doi: 10.1016/0007-1935(89)90110-3

Parshad, DH. (2014):

Zur Stressreaktivität von Legehennen zweier Hybridlinien (LB und LSL) nach körperlicher Fixation ("Flügelkreuzen") (Dissertation, lmu). oai:edoc.ub.uni-muenchen.de:16892

url: <https://core.ac.uk/download/pdf/216085781.pdf>

Pastore, C., Pirrone, F., Balzarotti, F., Faustini, M., Pierantoni, L., Albertini, M. (2011):
Evaluation of physiological and behavioral stress-dependent parameters in agility dogs. J Vet Behav., 6(3), S. 188-194. doi: 10.1016/j.jveb.2011.01.001

Pavlova, EV. Alekseeva, GS. Erofeeva, MN, Vasilieva. NA, Tchabovsky, AV. Naidenko, SV. (2018):

The method matters: The effect of handling time on cortisol level and blood parameters in wild cats. J Exp Zool A Ecol Integr Physiol. Volume 329, Issue 3, S. 112-119. doi: 10.1002/jez.2191

Pees, M. und Pees, K. (2008):

Papageien und Sittiche–Die Untersuchung der Faeces als wichtige diagnostische Möglichkeit. kleintier konkret, 11(05), S.18-23. doi: 10.1055/s-0028-1088354

Pell, SM. und McGreevy, PD. (1999):

A study of cortisol and beta-endorphin levels in stereotypic and normal Thoroughbreds. Appl. Anim. Behav. Sci., 64(2), S.81-90. doi: 10.1016/S0168-1591(99)00029-5

Pieragostino, D., Agnifili, L., Cicalini, I., Calienno, R., Zucchelli, M., Mastropasqua, L., Sacchetta, P., Del Boccio, P. and Rossi, C. (2017):

Tear film steroid profiling in dry eye disease by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Int J Mol Sci, 18(7), S.1349. doi: 10.3390/ijms18071349

Post, J., Rebel, JM., Ter Huurne, AA. (2003):

Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. Poult Sci, 82(8), S.1313-1318. doi: 10.1093/ps/82.8.1313

Prickaerts, J., Steckler, T. (2005):

Effects of glucocorticoids on emotion and cognitive processes in animals. In: T. Steckler, N.H. Kalin und J.M.H.M. Reul (Hrsg.) Handbook of Stress and the Brain Part 1, Vol. 15, S. 359-385, Copyright 2005 Elsevier B.V. ISBN 0-444-51173-3

Prinzinger, R., Misovic, A. und Nagel, B. (2012):

Aviäre Hämatologie. Das Vogelblut: Struktur, Funktion, Diagnose und Parasiten, Cuvillier Verlag, Göttingen. ISBN: 3954041405

- Puppe, B., Ernst, K., Schön, C. und Manteuffel, G. (2007):
Cognitive enrichment affects behavioural reactivity in domestic pigs. App. Anim. Behav. Sci., 105(1-3), S.75-86. doi: 10.1016/j.applanim.2006.05.016
- Quadir, A., Khan, M., John, MA., Rafiq, A., Bhat, IA., Nabi, N., Sikander, P., Dar, FA., (2017):
Micrometrical changes in the histomorphological architecture of the broiler adrenal gland due to fasting stress. J Entomol. Zool. Stud. 5(6): S. 1876-1878. e-ISSN: 2320-7078. url: <https://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue6/PartZ/5-5-376-589.pdf>
- Qureshi, S., Khan, HM., Mir, MS., Raja, T.A., Khan, AA., Ali, H. und Adil, S. (2018):
Effect of cold stress and various suitable remedies on performance of broiler chicken. J. World Poult. Res., 8(3), S.66-73. Research Paper, PII: S2322455X1800010-8 url: https://www.researchgate.net/profile/Masood-Saleem-Mir/publication/328917596_Effect_of_cold_stress_and_various_suitable_remedies_on_performance_of_broiler_chicken/links/5c7cc34192851c69505221da/Effect-of-cold-stress-and-various-suitable-remedies-on-performance-of-broiler-chicken.pdf
- Qureshi, S., Khan, HM., Shafi, S., Adil, S. und Mir, MS. (2020):
Effect of cold stress and its various ameliorating remedies on histomorphology of lymphoid glands (Bursa of Fabricius and Spleen) in broiler chicken. J Entomol. Zool. Stud. 2020b, 8(2), S.866-871. e-ISSN: 2320-7078 url: <https://www.entomoljournal.com/archives/2020/vol8issue2/PartO/8-2-124-893.pdf>
- Ramiah, SK., Awad, EA., Mookiah, S. und Idrus, Z. (2019):
Effects of zinc oxide nanoparticles on growth performance and concentrations of malondialdehyde, zinc in tissues, and corticosterone in broiler chickens under heat stress conditions. Poult Sci, 98(9), S.3828-3838. doi: 10.3382/ps/pez093
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (2012):
Biochemie. 3. Auflage. Duale Reihe. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S.588-594. ISBN: 978-3131253538
- Reed, HJ., Wilkins, LJ., Austin, SD., Gregory, NG. (1993):
The effect of environmental enrichment during rearing on fear reactions and depopulation trauma in adult caged hens. Appl. Anim. Behav. Sci., 36(1), S. 39-46. doi: 10.1016/0168-1591(93)90097-9
- Reese, L., Baumgartner, K., von Fersen, L., Merle, R., Ladwig-Wiegard, M., Will, H., Haase, G., Tallo-Parra, O., Carbajal, A., Lopez-Bejar, M. und Thöne-Reineke, C. (2020):

Feather Corticosterone Measurements of Greater Flamingos Living under Different Forms of Flight Restraint. Animals, 10(4), S.605. doi: 10.3390/ani10040605

Remage-Healey, L. und Romero, LM. (2001):

Corticosterone and insulin interact to regulate glucose and triglyceride levels during stress in a bird. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 281(3), S.R994-R1003.

doi: 10.1152/ajpregu.2001.281.3.R994

Rensing, R., Koch, M., Rippe, B. und Rippe, V. (2006):

Mensch im Stress. Psyche, Körper, Moleküle. München. Elsevier. S.88. ISBN:3-8274-1556-x

Richard, EM., Helbling, JC., Tridon, C., Desmedt, A., Minni, AM., Cador, M., Pourtau, L., Konsman, JP., Mormede, P. und Moisan, MP. (2010):

Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice.

Endocrinology, 151(2), S.649-659. doi: 10.1210/en.2009-0862

Riedstra, B. und Groothuis, TG. (2002):

Early feather pecking as a form of social exploration: the effect of group stability on feather pecking and tonic immobility in domestic chicks. Appl. Anim. Behav. Sci., 77 (2), S. 127-138.

doi: 10.1016/S0168-1591(02)00031-X

Rietmann, TR., Stuart, AEA., Bernasconi, P., Stauffacher, M., Auer, JA. und Weishaupt, MA. (2004):

Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters. Appl. Anim. Behav. Sci., 88(1-2), S.121-136.

doi: 10.1016/j.applanim.2004.02.016

Romero, LM. und Fairhurst, GD. (2016):

Measuring corticosterone in feathers: strengths, limitations, and suggestions for the future. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 202, S.112-122.

doi: 10.1016/j.cbpa.2016.05.002

Romero, LM., Reed, JM. (2005):

Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough?. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 140(1), 73-79. doi: 10.1016/j.cbpb.2004.11.004

Ross, M., Rausch, Q., Vandenberg, B. und Mason, G. (2020):

Hens with benefits: Can environmental enrichment make chickens more resilient to stress?.

Physiol Behav, 226, S.113077. doi: 10.1016/j.physbeh.2020.113077

Rous, P. (1911):

A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J Exp Med, 13. Jg., Nr. 4, S. 397. doi: 10.1084/jem.13.4.397

Rowiński, PK. und Rogell, B. (2017):

Environmental stress correlates with increases in both genetic and residual variances: A meta-analysis of animal studies. Evolution, 71(5), S.1339-1351. doi: 10.1111/evo.13201

Rød, AMK., Harkestad, N., Jellestad, FK. und Murison, R. (2017):

Comparison of commercial ELISA assays for quantification of corticosterone in serum. Sci Rep, 7(1), S.1-5. doi: 10.1038/s41598-017-06006-4

Russell, WMS. und Burch, RL. (1959):

The principles of humane experimental technique. Methuen (ursprünglicher Verlag).

Abgerufen am 17.03.2022, um 17.40 Uhr von <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>

Saleh, SY und Jaksch, W. (1977):

The effect of stress factors on blood leucocytic count, glucose and corticoids in chickens. Zentralbl Veterinarmed A, 24(3), S. 220-228. doi: 10.1111/j.1439-0442.1977.tb01567.x

Salomon, FV. (1993):

Lehrbuch der Geflügelanatomie. Gustav Fischer Verlag: S. 300-302. ISBN: 3334604039

Samir, H., Nyametease, P., Elbadawy, M., Fathi, M., Mandour, AS., Radwan, F., Nagaoka, K., Sasaki, K. und Watanabe, G. (2020):

Assessment of correlations and concentrations of salivary and plasma steroids, testicular morphometry, and semen quality in different climatic conditions in goats. Theriogenology, 157, S.238-244. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.08.002

Sauer, FJ., Gerber, V., Frei, S., Bruckmaier, RM. und Grössl, M. (2020):

Salivary cortisol measurement in horses: immunoassay or LC-MS/MS?. Domest Anim Endocrinol., 72, S.106445. doi: 10.1016/j.domaniend.2020.106445

Sax, M., Van Caenegem, L. und Schick, M. (2012):

Optimales Stallklima dank Wärmerück-gewinnungsanlagen auch im Sommer. Recherche Agronomique Suisse, 3(9), S.428-435. url: https://www.agrarforschungschweiz.ch/wp-content/uploads/2019/12/2012_09_1800.pdf

Scanes, CG. (2016):

Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio. Poult Sci, 95(9), S.2208-2215. doi: 10.3382/ps/pew137

Scanes, CG., Hurst, K., Thaxton, Y., Archer, GS., Johnson, A. (2020):

Effect of transportation and shackling on plasma concentrations of corticosterone and heterophil to lymphocyte ratios in market weight male turkeys in a commercial operation. Poult Sci, 99(1), S.546-554. doi: 10.3382/ps/pez485

Schaefer, AL., Cook, N., Tessaro, SV., Dereg, D., Desroches, G., Dubeski, PL., Tong, AKW und Godson, DL. (2004):

Early detection and prediction of infection using infrared thermography. Can J Ani Sci, 84(1), S. 73-80. doi: 10.4141/A02-104

Schlüter, KD. (2019):

Tierversuche: Übertragbarkeit auf den Menschen und ihre Durchführbarkeit. Zeitschrift für Herz-, Thorax-und Gefäßchirurgie, 33. Jg., Nr. 1, S. 67-71. doi: 10.1007/s00398-018-0268-0

Schmidt, K. (2008):

Würde oder Integrität–Verlangt die gentechnische Veränderung von Tieren neue tierethische Konzepte. Altex, 25(4), S.313-320. doi: 10.14573/altex.2008.4.313

Scholz, B., Rönchen, S., Hamann, H., Pendl, H. und Distl, O. (2008):

Effect of housing system, group size and perch position on H/L-ratio in laying hens (Dissertation, TiHo Hannover), S.65-79. url: https://elib.tiho-hannover.de/servlets/MCRFileNodeServlet/etd_derivate_00001775/scholz_b_ws07.pdf#page=73

Schwabl, H. (1995):

Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, S.11446–11450. doi: 10.1073/pnas.90.24.11446

Selye, H. (1976a):

Stress without distress. In: Psychopathology of human adaptation, George Serban (Hrsg.), S. 137-146, Springer, Boston, MA. ISBN: 1468422405

Selye, H.(1976b):

Stress in Health and Disease. S. 14-32, Butterworth London. eISBN: 978-0-407-98510-0 doi: 10.1016/C2013-0-06263-9

Shini, S., Shini, A. und Huff, GR. (2009):

Effects of chronic and repeated corticosterone administration in rearing chickens on physiology, the onset of lay and egg production of hens. Physiol Behav, 98(1-2), S. 73-77. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.04.012

Shlosberg, A., Bellaiche, M., Berman, E., Perk, S., Deeb, N., Neumark, E. und Cahaner, A. (1998):

Relationship between broiler chicken haematocrit-selected parents and their progeny, with regard to haematocrit, mortality from ascites and bodyweight. Res Vet Sci, Volume 64, Issue 2, S.105-109, doi: 10.1016/S0034-5288(98)90004-2

Siegel, HV. und Van Kampen, M., (1984):

Energy relationships in growing chickens given daily injections of corticosterone. Br Poult Sci, 25(4), S.477-485. doi: 10.1080/00071668408454889

Siegel, P. und Hurst, D. (1962):

Social interactions among females in dubbed and undubbed flocks. Poult Sci, 41, 1, S.141-145. doi: 10.3382/ps.0410141

Siegford, JM., Walshaw, SO., Brunner, P. und Zanella, AJ., (2003):

Validation of a temperament test for domestic cats. Anthrozoös, 16(4), S.332-351. doi: 10.2752/089279303786991982

Siegmann, O. (1992):

Propädeutik. In: Heider, G. und Monreal, G. (Hrsg), Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels Erlag Gustav Fischer Jena, Stuttgart, S.15- 44. ISBN: 3334603482

Singh, R., Cook, N., Cheng, KM. und Silversides, FG. (2009):

Invasive and noninvasive measurement of stress in laying hens kept in conventional cages and in floor pens. Poult Sci, 88(7), S.1346-1351. doi: 10.3382/ps.2008-00300

Slaunwhite, WR. und Sandberg, AA. (1959):

Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma. J Clin Invest, 38(2), S.384-391. doi: 10.1172/JCI103812

Smith, RH. (1978):

Open-field freezing as a stable parameter of wildness in Mus musculus. Behav Biol, 23(1), S.67-74. doi: 10.1016/S0091-6773(78)91164-1

Sokol, R., Koziatek-Sadłowska, S. und Michalczyk, M. (2019):

*The influence of *Dermanyssus gallinae* and different lighting regimens on selected blood proteins, corticosterone levels and egg production in layer hens. Vet Res Commun, 43(1), S.31-36. doi: 10.1007/s11259-018-9743-z*

Soledad Fernández, M., Edward Nizhnikov, M., García Virgolini, R. und Marcos Pautassi, R., (2021):

Prediction of ethanol self-administration in pre-weanling, adolescent, and young adult rats. Dev Psychobiol, 63(2), S.378-384. doi: 10.1002/dev.22025

Sominsky, L. und Spencer, S.J. (2014):

Eating behavior and stress: a pathway to obesity. Front Psychol, 5, S.434. doi: 10.3389/fpsyg.2014.00434

Spielmann, H. (2002):

A chair on alternatives? ALTEX, 19. Jg., Nr. 2, S. 69-73. ISSN:0946-7785. PMID: 12098012; url: <https://altex.org/index.php/altex/article/view/1105/1099>

Spinas, GA., Fischli, S. (2011):

Endokrinologie und Stoffwechsel kompakt. 2. Vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. New York. S. 11-14 u. S.56-64. ISBN: 9783131272928

Stanford, SC. (2007):

The open field test: reinventing the wheel. J Psychopharmacol, 21(2), S.134-136. doi: 10.1177/0269881107073199

Strel'Chyonok, OA. und Avvakumov, GV. (1983):

Evidence for the presence of specific binding sites for transcortin in human liver plasma membranes. Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subjects, 755(3), S.514-517. doi: 10.1016/0304-4165(83)90257-X

Strochlic, DE. und Romero, LM. (2008):

*The effects of chronic psychological and physical stress on feather replacement in European starlings (*Sturnus vulgaris*). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 149(1), S.68-79. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.10.011*

Strychalski, J., Gugolek, A., Konstantynowicz, M. (2015):

Clicker training efficiency in shaping the desired behaviour in the following dog breeds: boxer, chow chow and yorkshire terrier. Pol J Natur Sc, 30(3), S. 235-243. ISSN: 1643-9953. url: https://wmbc.olsztyn.pl/Content/1663/Nat30_3.pdf#page=23

Suarez, SD. und Gallup, GG. (1981):
Predatory overtones of open-field testing in chickens. Animal Learning & Behavior, 9(2), S.153-163. doi: 10.3758/BF03197812

Suarez, SD. und Gallup, GG., (1983):
Social reinstatement and open-field testing in chickens. Animal Learning & Behavior, 11(1), S.119-126. doi: 10.3758/BF03212318

Suarez, SD. und Gallup Jr, GG., (1985):
Open-field behaviour in chickens: A replication revisited. Behav Processes, 10(4), S.333-340. doi: 10.1016/0376-6357(85)90034-8

Sullivan, DA. und Allansmith, M.R. (1984):
Source of IgA in tears of rats. Immunology, 53(4), S.791. PMID: 6500628 url: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1454869/>

Sun, P., Li, D., Li, Z., Dong, B., Wang, F. (2008):
Effects of glycinin on IgE-mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine. J Nutr Biochem, Vol. 19, Issue 9, S.627-633, doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.08.007

Swennen, Q., Janssens, GPJ., Millet, S., Vansant, G., Decuypere, E. und Buyse, J. (2005):
Effects of substitution between fat and protein on feed intake and its regulatory mechanisms in broiler chickens: Endocrine functioning and intermediary metabolism. Poult Sci, 84(7), S.1051-1057. doi: 10.1093/ps/84.7.1051

Szczepanek, A. (2016):
Untersuchungen zu Risikofaktoren für das Auftreten von Federpicken und Kannibalismus bei nicht-schnabelgekürzten Legehennen in Praxisbetrieben (Doctoral dissertation, Imu). doi: 10.5282/edoc.19255

Tanaka, S., Young, JW., Halberstadt, AL., Masten, VL. und Geyer, MA. (2012):
Four factors underlying mouse behavior in an open field. Behav Brain Res., 233(1), S.55-61. doi: 10.1016/j.bbr.2012.04.045

Teitelbaum, AA., Gareau MG, Jury, J., Yang, PC, und Perdue, MH. (2008):

Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 295, S.452-459. doi: 10.1152/ajpgi.90210.2008

Teruhisa, U., Ryoji, H., Taisuke, I., Tatsuya, S., Fumihiro, M. und Tatsuo, S. (1981):

Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. Clin Chim Acta, 110(2-3), S.245-253. doi: 10.1016/0009-8981(81)90353-3

Tinbergen, N. (1940):

Die Übersprungbewegung. Zeitschrift für Tierpsychologie.

doi: 10.1111/j.1439-0310.1940.tb00616.x

Thomsen, AF. und Kousholt, BS. (2021):

Transition of Farm Pigs to Research Pigs using a Designated Checklist followed by Initiation of Clicker Training-a Refinement Initiative. Journal of Visualized Experiments: Jove, (174).

doi: 10.3791/62099

Tschaikowski, KL. und Jorde, W. (1989):

Allergische Krankheiten des Magen-Darm-Traktes: ein Ratgeber für die Praxis. Springer-Verlag. ISBN: 9783540513629

Tuchscherer, M. und Manteuffel, G. (2000):

Die Wirkung von psychischem Stress auf das Immunsystem. Ein weiterer Grund für tiergerechte Haltung (Übersichtsreferat). Arch. Anim. Breed, 43(6), S.547-560.

doi: 10.5194/aab-43-547-2000

Türkyilmaz, MK. (2008):

The Effect of Stocking Density on Stress Reaction in Broiler Chickens during Summer. Turk. J Vet Anim Sci; 32(1):S. 31-36. eISSN: 1303-6181

url: <https://journals.tubitak.gov.tr/cgi/viewcontent.cgi?article=2495&context=veterinary>

Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz (2014):

Merkblatt für die tierschutzgerechte Haltung von Versuchstieren, Merkblatt Nr. 31:

Legehennen. url: file:///C:/Users/Gordon2512/Downloads/TVT-

MB_31_Tiere_im_Versuch__Legehennen__Jan_2014_-1.pdf

Uranga, JA., Martínez, V., Abalo, R. (2020):

Mast Cell Regulation and Irritable Bowel Syndrome: Effects of Food Components with Potential Nutraceutical Use. *Molecules*, 25, 4314. doi: 10.3390/molecules25184314

Vallortigara, G., Cailotto, M. und Zanforlin, M. (1990):

Sex differences in social reinstatement motivation of the domestic chick (Gallus gallus) revealed by runway tests with social and nonsocial reinforcement. J Comp Psychol, 104(4), S.361. doi: 10.1037/0735-7036.104.4.361

van der Eijk, JA., Rodenburg, TB., de Vries, H., Kjaer, JB., Smidt, H., Naguib, M., Kemp, B. und Lammers, A. (2020):

Early-life microbiota transplantation affects behavioural responses, serotonin and immune characteristics in chicken lines divergently selected on feather pecking. Sci Rep, 10(1), S.1-13. doi: 10.1038/s41598-020-59125-w

Vestergaard, KS., Skadhauge, E. und Lawson, LG. (1997):

The stress of not being able to perform dustbathing in laying hens. Physiol Behav, 62(2), S.413-419. doi: 10.1016/S0031-9384(97)00041-3

Vincent, IC. und Michell, AR. (1992):

Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. Res Vet Sci, 53(3), S.342-345. doi: 10.1016/0034-5288(92)90137-Q

Vizcarra, FR., Verghese, M. und Vizcarra, JA. (2018):

Effect of short-and long-term feed restriction on ghrelin concentrations in turkeys. Poult Sci, 97(6), S.2183-2188. doi: 10.3382/ps/pey039

Voit M., Baumgartner K., von Fersen L., Merle R., Reese L., Wiegard M., Will H., Tallo-Parra O., Carbajal A., Lopez-Bejar M., Thöne-Reineke C. (2021):

Comparison of Two Different Feather Sampling Methods to Measure Corticosterone in Wild Greater Flamingos (Phoenicopterus roseus) and Wild Mallards (Anas platyrhynchos). Animals, 11(10), S. 2796. doi: doi.org/10.3390/ani11102796

Voit, M., Merle, R., Baumgartner, K., von Fersen, L., Reese, L., Ladwig-Wiegard, M., Will, H., Tallo-Parra, O., Carbajal, A., Lopez-Bejar, M. und Thöne-Reineke, C. (2020):

Validation of an Alternative Feather Sampling Method to Measure Corticosterone. Animals, 10(11), S.2054. doi: 10.3390/ani10112054

von Engelhardt, W., Breves, G. (2010):

Physiologie der Haustiere. Wolfram, S., Scharrer, E., Physiologie des Dünndarms und seiner Anhangsdrüsen. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Enke Verlag. Stuttgart. ISBN: 978-3830410782

Vosmerova, P., Chloupek, J., Bedanova, I., Chloupek, P., Kruzikova, K., Blahova, J., Vecerek, V. (2010):
Changes in selected biochemical indices related to transport of broilers to slaughterhouse under different ambient temperatures. Poult Sci., 89, S. 2719-2725.
doi: 10.3382/ps.2010-00709

Wallon, C., Yang PC., Keita AV., Ericson, AC., McKay DM., Sherman PM., Perdue MH., Söderholm JD. (2008):
Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. Gut ; 57: 50–58. E-ISSN 1468-3288.
doi: 10.1136/gut.2006.117549

Walsh, RN. und Cummins, RA. (1976):
The open-field test: a critical review. Psychol Bull, 83(3), S.482.
doi: 10.1037/0033-2909.83.3.482

Wang, WC., Yan, FF., Hu, JY., Amen, OA. und Cheng, HW. (2018):
Supplementation of Bacillus subtilis-based probiotic reduces heat stress-related behaviors and inflammatory response in broiler chickens. J Anim Sci, 96(5), S.1654-1666.
doi: 10.1093/jas/sky092

Wang, S., Li, X., Wang, W., Zhang, H. und Xu, S. (2019):
Application of transcriptome analysis: oxidative stress, inflammation and microtubule activity disorder caused by ammonia exposure may be the primary factors of intestinal microvilli deficiency in chicken. Sci Total Environ, 696, S.134035.
doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134035

Webster, AB. und Hurnik, JF. (1990):
Open-field assessment of behavioral phenotype within genetic stocks of the White Leghorn chicken. Appl. Anim. Behav. Sci., 27(1-2), S.115-126. doi: 10.1016/0168-1591(90)90011-2

Weimer, SL., Wideman, RF., Scanes, CG., Mauromoustakos, A., Christensen, KD. und Vizzier-Thaxton, Y. (2018):
An evaluation of methods for measuring stress in broiler chickens. Poult Sci, 97(10), S.3381-3389. doi: 10.3382/ps/pey204

- Wein, Y., Shira, EB. und Friedman, A. (2017):
Avoiding handling-induced stress in poultry: use of uniform parameters to accurately determine physiological stress. Poult Sci, 96(1), S. 65-73. doi: 10.3382/ps/pew245
- Weiss, E. und Wilson, S. (2003):
The use of classical and operant conditioning in training Aldabra tortoises (Geochelone gigantea) for venipuncture and other husbandry issues. J Appl Anim Welf Sci., 6. Jg., Nr. 1, S. 33-38. doi: 10.1207/S15327604JAWS0601_03
- Wellhöner, HH. (1975):
Glucocorticoide. In: Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie. Heidelberger Taschenbücher (Basistext Medizin), vol 169. S.129-136 Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-96265-3_39
- Westerlund, E. (1942):
Der Verlauf der Alimentären Hyperlipämie bei Behandeltem Und Unbehandeltem Hypo-und Hyperthyreoidismus. Klinische Wochenschrift, 21(10), S.224-227. doi: 10.1007/BF01775189
- Will, AP., Suzuki, Y., Elliott, KH., Hatch, SA., Watanuki, Y. und Kitaysky, AS. (2014):
Feather corticosterone reveals developmental stress in seabirds. J Exp Biol, 217(13), S.2371-2376. doi: 10.1242/jeb.098533
- Wilutzky, K. (2015):
Feldversuch zu den Verhaltensuntersuchungen von konventionell gehaltenen Masthühnern der Linie Ross 308 und einem neuen Haltungskonzept mit der Linie Cobb Sasso (Doctoral dissertation, lmu). doi: 10.5282/edoc.18997
- Wittmann, J. (1994):
Endokrinologie des Geflügels. In: F. Döcke (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokriologie. 3. Aufl., Fischer Verlag, Jena, S. 713-749. ISBN: 9783334604328
- Wojtaś, J., Karpiński, M. und Czyżowski, P. (2020):
Salivary cortisol interactions in search and rescue dogs and their handlers. *Animals, 10(4), S.595. doi: 10.3390/ani10040595*
- Wood, JD., Alpers DH und Andrews PLR. (1999):
Fundamentals of neurogastroenterology. Gut; 45 (Suppl 2), S.II6–II16; doi: 10.1136/gut.45.2008.ii6

Wood-Gush, DGM. (1954):

The courtship of the Brown Leghorn cock. Animal Behaviour, 2(3), S.95-102.

doi: 10.1016/S0950-5601(54)80045-1

Xie, J., Tang, L., Lu, L., Zhang, L., Lin, X., Liu, HC., Odle, J., Luo, X. (2015):

Effects of acute and chronic heat stress on plasma metabolites, hormones and oxidant status in restrictedly fed broiler breeders. Poult Sci., 94 S. 1635-1644. doi: 10.3382/ps/pev105Get

Yan, C., Xiao, J., Chen, D., Turner, SP., Li, Z., Liu, H., Liu, W., Liu, J., Chen, S. und Zhao, X. (2021):

Feed Restriction Induced Changes in Behavior, Corticosterone, and Microbial Programming in Slow-and Fast-Growing Chicken Breeds. Animals, 11, S. 141. doi: 10.3390/ani11010141

Yancey, PH., Clark, ME., Hand, SC., Bowlus, RD. und Somero, GN. (1982):

Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science, 217(4566), S.1214-1222.

doi: 10.1126/science.7112124

Yoshidome, K., Fukano, N., Ouchi, Y., Tomonaga, S., Cockrem, JF. und Bungo, T. (2021):

The use of behavioral tests of fearfulness in chicks to distinguish between the Japanese native chicken breeds, Tosa-Kukin and Yakido. Anim Sci J., 92(1), S.13507.

doi: 10.1111/asj.13507

Yozova, ID., Sano, H., Weidgraaf, K., Candy, EJ. und Cockrem, JF. (2021):

A randomized cross-over trial assessing salivary and urinary cortisol concentrations after alfaxalone and propofol administration in healthy cats. Domest Anim Endocrinol., 74, S.106557. doi: 10.1016/j.domaniend.2020.106557

Zaboli, G., Huang, X., Feng, X. und Ahn, DU. (2019):

How can heat stress affect chicken meat quality?—a review. Poult Sci, 98(3), S.1551-1556.

doi: 10.3382/ps/pey399

Zaytsoff, SJ., Brown, CL., Montana, T., Metz, GA., Abbott, DW., Uwiera, RR. und Inglis, GD. (2019):

Corticosterone-mediated physiological stress modulates hepatic lipid metabolism, metabolite profiles, and systemic responses in chickens. Sci Rep, 9(1), S.1-13.

doi: 10.1038/s41598-019-52267-6

Zeltner, E. und Hirt, H. (2003):

Was zieht die Hühner auf die Weide?. Bauernzeitung, (36). ID: 2783.

url: http://aims.fao.org/aos/agrovoc/c_45d35147

Zeltner, E., Hirt, H. (2004):

Ökologische Legehennenhaltung: Strukturierung von Grünausläufen. DGS-Magazin, (Woche 45), S. 22-24. ID: 6450. url: http://aims.fao.org/aos/agrovoc/c_12109

Zhang, L., Yue, HY., Zhang, HJ., Xu, L., Wu, SG., Yan, HJ., Gong, YS., Qi, GH. (2009):

Transport stress in broilers: I. Blood metabolism, glycolytic potential, and meat quality. Poult Sci., 88, S. 2033-2041. doi: 10.3382/ps.2009-00128

Zippelius, HM. (1992):

Die vermessene Theorie. Eine kritische Auseinandersetzung mit der Instinkttheorie von Konrad Lorenz und verhaltenskundlicher Forschungspraxis. Braunschweig: Vieweg, S. 260, ISBN 978-3-528-06458-7.

Vortrags- und Publikationsverzeichnis

Mählis G. (2021):

Untersuchungen zum Klickertraining als angewandte Refinementmaßnahme beim Huhn. Vortrag im Rahmen der 59. Wissenschaftlichen Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS und der 20. Fortbildungsveranstaltung der IGTP, 22. - 24. September 2021.

Kleine A., Mählis G. (2021):

Untersuchungen zum Klickertraining als angewandte Refinementmaßnahme bei Hühnern. Vortrag im Rahmen des wissenschaftlichen Vortragsprogrammes „Landwirtschaftliche Nutztiere in der Versuchstierkunde – LaNiV“, 01.10.2021

Mählis G., Kleine A., Lüscho D., Bartel A., Wiegard M., Thöne-Reineke C. (2023):

*Clicker training as an applied refinement measure in chickens.
Paper in Vorbereitung.*

Danksagung

Frau Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke, Ihnen möchte ich zuerst danken. Und zwar vor allem für die stets konstruktive Kritik und noch mehr für die zuverlässigste und schnellste „Korrekturlese-und-eMail-Beantwortungsrate“, die ich in meiner gesamten Promotionszeit erlebt habe. Als Doktorand fühlte ich mich bei Ihnen stets sehr gut aufgehoben.

Anne, dir möchte ich dafür danken, dass du durch deine Idee zum Thema der Promotion und deiner Bereitschaft, meine Betreuung zu übernehmen, die Umsetzung dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hast. Danke auch für deine Nachsicht, wenn ich ab und zu mal im Eifer des Gefechts schon wieder einen oder zwei Schritte zu weit war.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Dörte bedanken, die mir gerade bei den Tücken des Corticosteron-ELISAs sehr zur Seite gestanden hat. Hierbei geht auch ein nicht weniger bedeutsamer Dank an Michaela, Carola und Gabi, die mich als „meine Labormäuse“ ferner durch die praktische Umsetzung des ELISAs und all die damit einhergehenden Frustrationen begleitet haben. Auch soll den Mitarbeitern des Instituts für Veterinärpharmakologie und Toxikologie, Prof. Dr. Wolfgang Bäumer, Jenny und Sophie in großem Maße gedankt werden. Ihre Erfahrungen haben es letztendlich möglich gemacht, auch den letzten „Gordischen Knoten“ beim ELISA zum Platzen zu bringen. Vielen Dank auch an Alexander Bartel für die Hilfestellung bei Versuchsplanung und Statistik.

Ein großer Dank geht auch an Christina und „die Gurke“ Dominic für die umsichtige und ausgezeichnete Pflege meiner Versuchstiere sowie die witzigen und teils die Zeit vergessen lassenden Pausen- und Feierabendgespräche. Larissa und Franzi danke ich für ihre Adleraugen und ihre unbeirrbar Geduld bei der Auswertung der Verhaltensstudien.

Anna möchte ich dafür danken, dass sie mir fernab der Dissertation spannende Einblicke in die Vogel-Pathologie ermöglicht hat und zeitgleich freue ich mich, sie auch als Kneipen-Freundin gewonnen zu haben.

Auch anderen Freunden möchte ich an dieser Stelle im Besonderen danken. Schnickes möchte ich danken für´s Reden und Pirus für´s Zuhören. Ich danke Christian für Sätze wie: „Du bist nicht Gott, sondern Godn!“. Ludwig danke ich für die Urlaube mit dem inneren Kind, Philip für den Mut zur Unperfektheit. Danilo danke ich für die Feierabend-Auto-Korrespondenz. Lisa und Christin danke ich für die Beständigkeit, Sophia und Jan für ihre Zuverlässigkeit und Nikola danke ich für seine Unablässigkeit. Jefferson und Dennis danke dafür, dass sie mich in den letzten Jahren immer mal wieder daran erinnern haben, auch die schönen Seiten des Lebens nicht zu sehr hinten überfallen zu lassen.

Ich danke meiner Mutter für das mir mitgegebene Feingefühl, ohne das mir die Arbeit mit den Tieren mit Sicherheit nicht so leichtgefallen wäre. Meiner Oma danke ich für das mir von ihr vorgelebte Pflichtbewusstsein und dafür, dass sie mich als Kind so oft mit in den Hühnergarten geschleppt hat. Ich danke meinem Vater für den mir mitgegebenen Pragmatismus und meinem Opa für die (meist) unerschütterliche innere Gelassenheit.

Ein großer Dank geht im Weiteren auch an Christine, die mir im Rahmen meiner Arbeit für das Veterinäramt Potsdam-Mittelmark und hierbei vor allem hinsichtlich meiner Urlaubsplanung zur Bearbeitung dieser Promotion in den vergangenen Jahren immer alle Türen offengehalten hat. Ein nicht geringerer Dank geht zeitgleich auch an Erika und Volker, die mich seit meinem Schülerpraktikum in der 9. Klasse bis hinein in mein heutiges Arbeitsleben begleitet und durch ihr Wissen, ihre Kollegialität und ihre Unkompliziertheit stets „bei Laune“ gehalten haben.

Zuletzt gilt mein Dank den Mitarbeitern der Vogelschutzwarte Baitz sowie denen der Naturwacht Hoher Fläming. Danke Dori, Katrin I, Katrin II, Olli, Marina und Norbert, dass ihr mir gezeigt habt, dass es richtig und keine „Spielerei“ ist, sich für den Schutz von Tieren als Teil unserer Welt stark zu machen. Danke, dass ihr mir in all den Jahren meines „Großwerdens“ - während Zivildienst, TFA-Ausbildung, Studium und Promotion - ein zweites Zuhause gegeben habt. Einen besonderen Dank möchte ich auch Astrid zukommen lassen, die mir über all die Jahre während unserer Arbeit im Rahmen des Großstrappenschutzprojektes den Rücken freigehalten hat. Stets konnte ich mich darauf verlassen, dass die Dienstpläne an meine Prüfungspläne angepasst und zu meinen Gunsten gestaltet wurden. Immer wusste ich, dass wir das schon alles irgendwie hinkriegen werden.

Und so ist es...man kriegt schon alles irgendwie hin ☺

Ich danke euch allen.

Finanzierungsquellen

Die Arbeit wurde nicht finanziert, insofern bestehen keine Interessens- oder Gewissenskonflikte zu etwaigen Finanzierungspartnern.

Selbstständigkeitserklärung

Ich habe die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und versichere, ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen zu haben.

Gordon Mählis

Berlin, den 05.05.2023



9 783967 292121

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-212-1