

C MATERIAL UND METHODEN

1 Tiermaterial und Tierhaltung

1.1 Versuch 1: Entwicklung des Beinskeletts und das Auftreten von Erkrankungen an den Hintergliedmaßen bei kanadischen Wildputen

Es wurden 71 kanadische Wildputen als nicht geschlechtlich vorsortierte Eintagsküken eingestellt. Bei diesen Tieren handelt es sich um eine ursprüngliche, nicht auf Leistung selektierte Putenlinie mit dunkler Befiederung, Wildtyp (Abb. 1a und b). Die Schnäbel wurden nicht gekürzt. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über 24 Lebenswochen, von Mai bis November. Das erwartete Endgewicht dieser kanadischen Wildpute liegt bei 4,5 kg bei weiblichen und bis zu 10,5 kg bei männlichen Tieren zwischen der 35.- 42. LW².



a. Henne



b. Hahn

Abb. 1: a. Weibliche Wildpute, b. Männliche Wildpute (Alter 8 Monate)

Während der ersten 8 Lebenswochen wurden die Tiere in einem klimatisierten Stall in Bodenhaltung auf Hobelspänen gehalten. Die Stallgröße betrug 12 m². Die Stalltemperatur lag zwischen 30 und 32°C. Während dieser Zeit kamen zusätzlich Rotlichtstrahler zum Einsatz, die die beleuchtete Fläche auf 35°C erwärmten. Ab der 4. Lebenswoche wurde die Temperatur kontinuierlich auf 25°C abgesenkt. Die Lichtdauer lag bei 10 Stunden Kunstlicht pro Tag. Nach 8 Wochen kamen die Tiere in Stallungen im Freien. Dort wurden die Tiere auf einer ca. 47 m² großen von Maschendraht begrenzten Freifläche gehalten. Der Auslauf war ca. 2 m hoch und oben mit einem Netz überspannt. In Abbildung 2 ist der Aufbau des Freigeheges schematisch dargestellt. Die Lauffläche war zweigeteilt in eine Betonfläche, 11,4 m² und eine Rasen- bzw. Sandfläche von 23,6 m² Größe. Auf der restlichen Fläche des Auslaufes stand ein Holzhaus als Stall mit einer Grundfläche von 12,2 m². Im Stall war über die gesamte Länge in 70 cm Höhe eine Sitzstange aus Holz eingebaut. Der Stall wurde täglich mit Stroh eingestreut. Im Bereich der Betonfläche waren in 80 cm Höhe zwei weitere Holzstangen mit einer jeweiligen Länge von 2 m angebracht. Die Tiere hatten wahlweise die Möglichkeit sich drinnen oder draußen aufzuhalten. Es fand keine Trennung männlicher und weiblicher Tiere statt. Aufgrund gesetzlicher Bestimmungen (Seuchenschutz Vogelgrippe) mussten die Tiere während der letzten zwei Wochen im Haus gehalten werden.

² Quelle: www.thecontentwell.com/Fish_Game/Wild%20Turkey/Turkey_index.htm; „Understanding wild turkey“

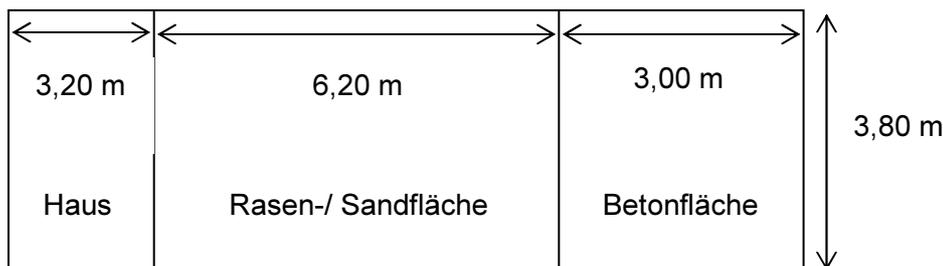


Abb. 2: Aufbau des Außengeheges

Die Fütterung erfolgte ad libitum mit einer handelsüblichen Drei-Phasen-Fütterung in pelletierter Form. Die genaue Zusammensetzung der Ration ist in Tabelle 1 dokumentiert. Wasser stand in Plasson-Rundtränken ad libitum zur Verfügung.

Tab. 1: Rationszusammensetzung Versuch 1 (Angaben in % bzw. je kg Futter)

Fütterungsphase		I (1. – 3. LW)	II (4. – 7. LW)	III (8. – 24. LW)
ME	MJ/ kg	11,6	11,4	11,6
Rp	%	27	23	17
Met. + Cys.	%	1,0	0,8	0,7
Na	%	0,18	0,2	0,2
Ca	%	1,2	1,2	1,2
P	%	0,75	0,75	0,7
Cu(II)-Sulfat	mg/ kg	16	15,8	15,7
Vit. A	IE/ kg	13.500	13.500	12.000
Vit. D3	IE/ kg	5.000	5.000	5.000
Vit. E	mg/ kg	40	40	40
Halofuginon	mg/ kg	3	3	/

In der 6. und 14. LW wurden alle Tiere über das Trinkwasser mit der doppelten Dosis gegen Newcastle-Disease (ND) (Avi Pro ND LASOTA) geimpft. Alle Tiere wurden über den gesamten Haltungszeitraum täglich klinisch kontrolliert³. Interkurrent verstorbene Tiere wurden vollständig seziiert und entsprechend der Probestiere untersucht. Die Mortalität wurde am Ende des Versuches bestimmt.

1.2 Versuch 2: Einfluss der genetischen Linie auf die Entwicklung des Beinskeletts und das Auftreten von Erkrankungen an den Hintergliedmaßen bei Mastputen

Untersucht wurden fünf genetisch verschiedene Putenlinien. Die Linien unterschieden sich in den zu erreichenden Mastendgewichten.

Es wurden Tiere der leichten Linie Kelly Bronze, der zwei mittelschweren Linien BUT 9 und Nicholas 300 und der zwei schweren Linien BUT Big 6 und Nicholas 700 verwendet.

Die Tabelle 2 zeigt die durchschnittlich zu erwartenden Endgewichte der Putenhähne nach 22 Lebenswochen (HAFEZ et al. 2004).

³ An dieser Stelle soll den Mitarbeitern des Institutes für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin ein großer Dank ausgesprochen werden, die für die Betreuung und die täglichen klinischen Kontrollen der Tiere während des Versuches 1 zuständig waren.

Tab. 2: zu erwartende Mastendgewichte bei männlichen Puten verschiedener Putenlinien

Schwere Linien		Mittelschwere Linien		Leichte Linie	
BUT Big 6	21,7 kg	BUT 9	19,6 kg	Kelly	16,0 kg
N 700	20,5 kg	N 300	18,5 kg	Bronze	

Pro Linie wurden 120 männliche Eintagsküken eingestallt, deren Schnäbel nicht gekürzt wurden. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über 22 Lebenswochen, von Februar bis Mitte Juli 2003.

Die Tiere wurden in einem klimatisierten Versuchsstall ohne Fenster in Bodenhaltung auf Hobelspänen gehalten. Der Stall war in 24 Boxen unterteilt. Jede Box hatte eine Fläche von 2,2 m². Pro Linie wurden die Tiere auf 5 Boxen verteilt. Die Tiere der Linie Kelly Bronze besetzten 4 Boxen. Die Besatzdichte lag in den ersten 5 Lebenswochen (LW) bei 10 Tieren/ m². In den darauf folgenden Wochen wurde die Tierzahl auf 2 bis 3 Tiere/ m² bis zur 22. LW reduziert, so dass am Ende der Mast die Tiere in Fünfer- bis Siebenergruppen gehalten wurden.

Die Stalltemperatur lag in den ersten Lebenswochen bei 24°C. Ab der 6. LW wurde die Temperatur kontinuierlich auf 20°C gesenkt. In den ersten zweieinhalb Wochen kamen zusätzlich Infrarotstrahler zum Einsatz, die die Liegeflächen der Tiere auf eine Temperatur von 34°C erwärmten. Die Lichtdauer wurde zwischen dem 1. und 10. LT bei einer Beleuchtungsstärke von 100 Lux von 24 auf 15 Stunden verkürzt und ab dem 11. LT konstant auf täglich 14 Stunden bei einer Lichtintensität von 60 Lux gehalten.

Die relative Luftfeuchte lag im Mittel bei 65%.

Die Fütterung erfolgte ad libitum mit einer handelsüblichen kommerziellen Sechs-Phasen-Fütterung in pelletierter Form. Die genaue Zusammensetzung der Ration ist in Tabelle 3a und 3b dokumentiert. Wasser stand in Plasson-Rundtränken ad libitum zur Verfügung.

Tab. 3a: Rationszusammensetzung Versuch 2, Fütterungsphasen 1- 3
(Angaben in % bzw. je kg Futter)

Fütterungsphase		1. Phase (1. - 2. LW)	2. Phase (3. - 5. LW)	3. Phase (6. - 9. LW)
ME	MJ/ kg	11,4	11,7	13,6
Rp	%	29	26	24
Lys.	%	1,9	1,6	1,0
Biotin	µg/ kg	305	311	300
Ca	%	1,4	1,3	1,2
P	%	1,0	1,0	0,8

Fortsetzung Tab. 3b: Rationszusammensetzung Versuch 2, Fütterungsphasen 4- 6
(Angaben in % bzw. je kg Futter)

Fütterungsphase		4. Phase (10.- 13. LW)	5. Phase (14.-17. LW)	6. Phase (ab 18. LW)
ME	MJ/ kg	12,4	12,6	13,1
Rp	%	21	18	16
Lys.	%	0,8	0,8	0,7
Biotin	µg/ kg	310	305	310
Ca	%	1,2	1,1	1,0
P	%	0,8	0,7	0,7

Die Tiere wurden zweimal (6. und 14. LW) innerhalb des Haltungszeitraumes über das Trinkwasser mit der doppelten Dosis gegen Newcastle-Disease geimpft (Avi Pro ND LASO-TA). Alle Tiere wurden über den gesamten Haltungszeitraum täglich klinisch kontrolliert.

Erkrankte Tiere wurden sofort herausgenommen und euthanasiert. Euthanasierte oder interkurrent verstorbene Tiere wurden vollständig sezziert und entsprechend der Probestiere untersucht. Mortalitätsraten wurden am Ende des Versuches berechnet.

1.3 Versuch 3: Einfluss der Fütterung auf die Entwicklung des Beinskeletts und auf das Auftreten von Erkrankungen an den Hintergliedmaßen bei Mastputen

Im Versuch 3 wurde der Einfluss der Fütterung auf das Auftreten von Beinschwäche bei Mastputen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Putenhähne der schweren Mastlinie BUT Big 6 verwendet. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über 20 Lebenswochen, von Mitte Februar bis Mitte Juli 2004. Es wurden drei unterschiedliche Fütterungsgruppen gebildet. Pro Fütterungsgruppe wurden 125 Tiere eingestallt. Die Fütterung der einzelnen Gruppen unterschied sich entsprechend den Vorgaben zur Durchführung des Versuches hauptsächlich im Energie- und Biotingehalt der Ration.

Die Zusammensetzung der Ration der Fütterungsgruppe A (kommerzielle Gruppe) entsprach einer bedarfsgerechten kommerziellen Sechs-Phasen-Fütterung und enthielt 11,4-13,7 MJ/kg, die als 100% umsetzbare Energie (ME) angesehen wurde und 265-297 µg Biotin. In der Fütterungsgruppe B (restriktive Gruppe) wurde der Energiegehalt herabgesetzt auf 80% ME. Der Biotingehalt entsprach dem der Gruppe A. In der Fütterungsgruppe C (Überschussgruppe) wurde die umsetzbare Energie erhöht auf 120% ME und der Biotingehalt verdreifacht (899 -1001 µg).

Damit die Energiewerte in den jeweiligen Rationen (restriktiv und Überschuss) erreicht werden konnten, mussten andere Bestandteile wie z. B. Rohprotein und essentielle Aminosäuren in den entsprechenden Rationen angepasst werden. Des Weiteren wurde der Trockenschnitzelanteil in der Ration der restriktiven Fütterung erhöht (ca. 170-200 g/ kg Futter). Die genaue Zusammensetzung der unterschiedlichen Rationen ist in Tabelle 4a und 4b dokumentiert.

Tab. 4a: Rationszusammensetzung Versuch 3, Fütterungsphasen 1- 3

Fütterungs-Phase		1. Phase (1. - 2. LW)			2. Phase (3. - 5. LW)			3. Phase (6. - 9. LW)		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
ME	MJ/kg	11,4	9,1	13,7	11,6	9,3	13,9	12,0	9,6	14,4
Rp	%	29	23	35	26	21	31	24	19	29
Lys.	%	1,8	1,4	2,2	1,6	1,3	1,9	1,5	1,2	1,8
Met. + Cys.	%	1,1	0,9	1,3	1,1	0,9	1,3	1,0	0,8	1,2
Biotin	µg/kg	297	297	920	288	288	980	276	276	1001
Ca	%	1,4			1,3			1,2		
P	%	1,0			1,0			0,8		

(Angaben in % bzw. je kg Futter)

Fortsetzung Tab. 4b: Rationszusammensetzung Versuch 3, Fütterungsphasen 4- 6

Fütterungsphase		4. Phase (10.- 13. LW)			5. Phase (14.- 17. LW)			6. Phase (ab 18. LW)		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
ME	MJ/k	12,3	9,8	14,8	12,6	10,1	15,1	13,0	10,4	15,6
Rp	%	21	17	25	18	14	22	16	13	19
Lys.	%	1,3	1,0	1,6	1,1	0,9	1,3	0,9	0,7	1,1
Met. + Cys.	%	0,8	0,6	1,0	0,8	0,6	1,0	0,7	0,6	0,8
Biotin	µg/kg	265	265	927	276	276	934	288	288	899
Ca	%	1,2			1,1			1,0		
P	%	0,8			0,7			0,7		

(Angaben in % bzw. je kg Futter)

Der Mineralstoffgehalt in den Rationen entsprach der Rationszusammensetzung des Versuches 2. Wasser stand aus Nippeltränken ad libitum zur Verfügung.

Die übrigen Haltungs- und Stallbedingungen entsprachen denen des Versuches 2.

Die Tiere wurden zweimal (6. und 14. LW) innerhalb des Haltungszeitraumes mit doppelter Dosierung über das Trinkwasser gegen Newcastle-Disease (Avi Pro ND LASOTA) geimpft.

Alle Tiere wurden über den gesamten Zeitraum täglich klinisch kontrolliert⁴.

Erkrankte Tiere wurden sofort herausgenommen und euthanasiert. Euthanasierte oder interkurrent verstorbene Tiere wurden vollständig sezirt und entsprechend der Proben-tiere untersucht. Mortalitätsraten wurden am Ende des Versuches berechnet.

2 Probenentnahme

2.1 Versuch 1: Entwicklung des Beinskeletts und das Auftreten von Erkrankungen an den Hintergliedmaßen bei kanadischen Wildputen

Bei den kanadischen Wildputen (Versuch 1) fand eine geschlechtliche Vorsortierung der Eintagsküken nicht statt, so dass eine frühzeitige Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Tieren nicht möglich war. Infolge dessen kamen im Laufe der Probenentnahmen auch weibliche Tiere zur Untersuchung. In den Versuchen 2 und 3 (Linienvergleich und Fütterungsversuch) wurden geschlechtlich vorsortierte männliche Eintagsküken eingestallt.

Die Entwicklung der Körpermasse und die physiologische Knochenentwicklung verlaufen bei weiblichen Tieren langsamer als bei männlichen Tieren (SALOMON et al. 1990). Auch werden weibliche Tiere nicht so groß und schwer wie die männlichen. Eine Unterscheidung zwischen männlich und weiblich wurde somit bei der Auswertung der metrischen Messdaten der Knochen und bei der Körpermasse erforderlich. Zudem blieb durch diese Trennung die Vergleichbarkeit unter den Versuchen 1-3 erhalten.

Infolge dessen variiert die Anzahl der Tiere im Versuch 1, kanadische Wildputen, aus denen die Mittelwerte und die Standardabweichungen in den Graphiken zur physiologischen Knochenentwicklung gebildet wurden, je nach Untersuchungszeitpunkt. Die genaue Anzahl untersuchter männlicher und weiblicher Tiere zu den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten ist in der Tabelle 5 dokumentiert.

⁴ An dieser Stelle soll den Mitarbeitern des Institutes für Tierernährung der Freien Universität Berlin ein großer Dank ausgesprochen werden, die für die Qualität des Futters und die Betreuung der Tiere während der Versuche 2 und 3 zuständig waren.

Tab. 5: Geschlechtsverteilung bei den Probestieren im Versuch 1 an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten, n= 8 Tiere/ Alter

Zeitpunkt	1. LT	4. LW	8. LW	12. LW	16. LW	20. LW	24. LW	Σ
männlich	8	7	7	5	7	2	2	38
Weiblich	0	1	1	3	1	6	6	18

Alle 4 Wochen (1. Lebenstag, 4., 8., 12., 16., 20 und 24. Lebenswoche) wurden 8 klinisch gesunde Tiere, im weiteren Verlauf als Probestiere bezeichnet, nach dem Zufallsprinzip entnommen. Die Tiere wurden mit einem Genickschlag betäubt und anschließend durch Blutentzug getötet. Insgesamt wurden 56 Tiere untersucht. Alle Tiere wurden unabhängig vom Geschlecht in gleicher Weise untersucht.

Da der Einfluss des Geschlechtes auf das Vorkommen von TD und PD in der Literatur sehr kontrovers diskutiert wird, wurde bei der Auswertung der pathologisch-anatomischen und histopathologischen Befunde und speziell der Erkrankungen TD und PD alle Daten geschlechtsunabhängig verwendet.

2.2 Versuch 2: Einfluss der genetischen Linie auf die Entwicklung des Beinskeletts und das Auftreten von Erkrankungen an den Hintergliedmaßen bei Mastputen

In regelmäßigen Abständen wurden nach dem Zufallsprinzip aus den gebildeten Gruppen 5 klinisch gesunde Tiere, im weiteren Verlauf als Probestiere bezeichnet, zur Untersuchung entnommen. Pro Linie wurden am ersten Lebenstag und in der 1., 4., 8., 12., 16., 20. und 22. Lebenswoche je fünf Tiere getötet. Insgesamt wurden 200 männliche Tiere im zweiten Versuch untersucht. Die Probestiere wurden je nach Alter unterschiedlich getötet. Die jungen Tiere im Alter von einer und 4 Wochen wurden durch Dislokation des Atlantookzipitalgelenks getötet. Die älteren Tiere wurden mit einem Genickschlag betäubt und anschließend durch Blutentzug getötet.

2.3 Versuch 3: Einfluss der Fütterung auf die Entwicklung des Beinskeletts und das Auftreten von Erkrankungen an den Hintergliedmaßen bei Mastputen

In der 1. LW wurden pro Fütterungsgruppe 2 Tiere untersucht. Zu den nachfolgenden Untersuchungsterminen, in der 4., 8., 12., 14., 16., 18. und 20. Lebenswoche, wurden pro Fütterungsgruppe 6 klinisch gesunde Tiere, im weiteren Verlauf als Probestiere bezeichnet, entnommen. Insgesamt wurden 132 männliche Tiere im Versuch 3 untersucht.

Aus statistischen Gründen ist die Probenzahl pro Untersuchungszeitpunkt auf sechs Tiere erhöht worden. Bei den Entnahmezeitpunkten wurde auf Proben des ersten Lebenstages und auf die der 22. LW wegen der geringen Aussagekraft verzichtet.

Dafür wurden Proben der 14. und 18. LW hinzugenommen, um den Zeitpunkt des Abschlusses des Längenwachstums der Knochen in dieser Zeitspanne genauer untersuchen zu können.

Die Tötungsmethode der Probestiere entsprach der in den Versuchen 1 und 2.

3 Untersuchungsparameter und Auswerteverfahren

3.1 Versuch 1: Entwicklung des Beinskeletts und das Auftreten von Erkrankungen an den Hintergliedmaßen bei kanadischen Wildputen

3.1.1 Bestimmung der Körpermasse

Bei den zu weiteren Untersuchungen entnommenen Tieren wurde die Lebendmasse mit Hilfe einer Tischwaage der Firma Bizerba bestimmt. Die Anzeigegenauigkeit lag bei 10 g.

Die 4-wöchentlichen Körpermassenzunahmen wurden rechnerisch ermittelt. Dabei wurde jeweils der Mittelwert der Körpermassen des nächstälteren von dem jeweils nächstfrüheren Untersuchungszeitpunkt subtrahiert.

3.1.2 Makroskopische Messungen und Wägungen der Knochen

Beide Hintergliedmaßen der Tiere wurden mit einem Messer vom Körper abgetrennt. Anschließend wurden Femur (Fe), Tibiotarsus (TT) und Tarsometatarsus (TMT) mit Messer, Skalpell und Schere von Muskelfleisch, Sehnen und Periost gesäubert.

Die Massen von Fe und TT wurden mit Hilfe einer OHAUS Tellerwaage Precision Plus TP 600 gemessen. Die Anzeigegenauigkeit lag bei 0,01 g.

Die Länge von Fe und TT wurde mit Hilfe eines Stahllineals zwischen den beiden am weitesten entfernten Knochenpunkten der proximalen und distalen Gelenkflächen auf 0,1 cm genau bestimmt (Tab. 6). Für die Bruchfestigkeitsmessung wurde am TT der Mittelpunkt der Knochen mit einem wasserfesten Stift (Edding®) markiert.

Tab.6: Knochenmesspunkte zur Bestimmung der Länge (SALOMON et al. 1990)

	Proximaler Messpunkt - Länge	Distaler Messpunkt - Länge
Os femoris	Trochanter femoris	Condylus lateralis
Tibiotarsus	Crista tibialis cranialis	Condylus lateralis
Tarsometatarsus	Eminentia intercondylaris	Trochlea metatarsi tertii

3.1.3 Pathologisch-anatomische Untersuchungen

An allen Probestieren wurde zur Feststellung von eventuellen Erkrankungen eine vollständige Sektion durchgeführt. Makroskopische Veränderungen an den Tierkörpern und an den Organen wurden protokolliert.

Für die weiteren Untersuchungen wurden beide Hintergliedmaßen verwendet. Alle 112 Hintergliedmaßen wurden pathologisch-anatomisch untersucht. Es wurde auf Abweichungen der Beinachse und auf äußere Veränderungen an den Ständern geachtet.

Die Fußballen aller Probestiere wurden auf das Vorliegen von Pododermatitiden hin untersucht.

Für die makroskopische Beurteilung der Wachstumsplatten von Fe und TT wurden die frei präparierten proximalen Knochenenden je nach Alter der Tiere mit Hilfe eines Skalpells oder einer Bandsäge der Firma Kolbe halbiert. Der Fe- Kopf wurde durch einen transversal (latero-medial) geführten Längsschnitt eröffnet. Am TT- Kopf wurde eine spezifische Schnittebene zur Darstellung der TD festgelegt, siehe Abbildung 3. An den so entstandenen Schnittflächen konnten die Wachstumsplatten auf bereits makroskopisch sichtbare Veränderungen hin beurteilt werden. Die proximalen Knochenenden wurden für die weitere Bearbeitung am Übergang der Metaphyse zur Diaphyse mit der Bandsäge vom Rest des Knochens abgetrennt.

Die Diaphysen und distalen Knochenenden von Fe, TT, TMT und die Zehenknochen wurden bei -15°C asserviert.

3.1.4 Beurteilung der proximalen Tibiotarsus- Anschnitte auf das Auftreten von tibialer Dyschondroplasie (TD)

Im Gegensatz zu den Broilern, bei denen die Veränderungen der TD die gesamte Wachstumsplatte betreffen, sind die TD- Veränderungen bei der Pute im kaudomedialen Bereich des proximalen Tibiotarsuskopfes lokalisiert. Zur Darstellung der TD wurde am TT- Kopf eine spezielle Schnittebene gewählt.

Die gewählte Schnittebene führte von kranial durch den kaudomedialen Bereich des Knochenkopfes. Die genaue Lokalisation der TD-Veränderung und die Schnittführung am TT-Kopf ist in Abbildung 3 dokumentiert.

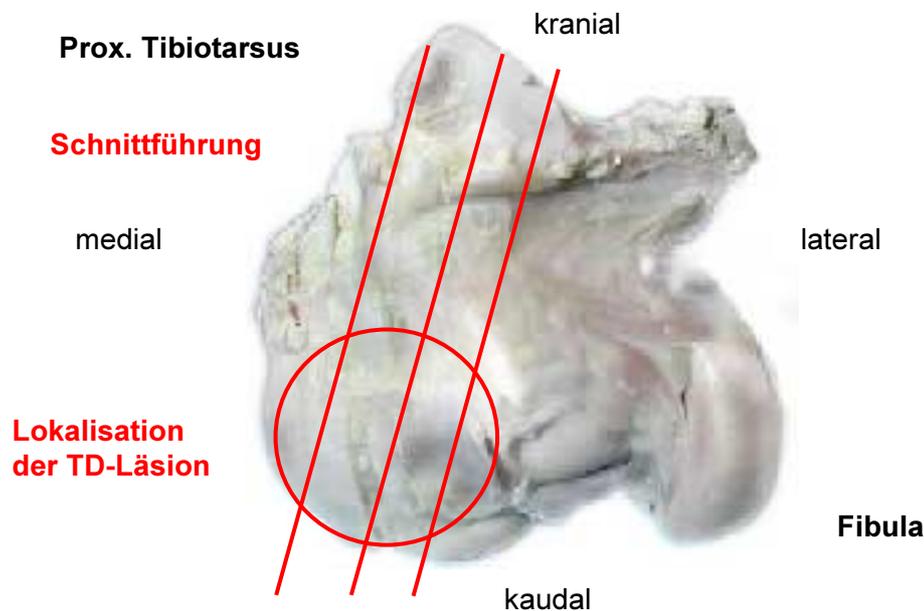


Abb. 3: Darstellung der Schnittführung zur Erkennung der TD und Lokalisation der TD-Herde (Aufsicht prox. TT-Kopf, formalinfixiert)

An der entstandenen Schnittfläche der untersuchten proximalen TT-Köpfe wurde zum einen makroskopisch das Vorliegen einer tibialen Dyschondroplasie (TD) dokumentiert. Zum anderen wurde der Schweregrad der TD anhand des folgenden Bewertungsschlüssels beurteilt (Abb.4 a-d).

Grad 1 bedeutete eine geringgradige lokale Verbreiterung der Wachstumsplatte zugunsten der proliferativen oder hypertrophen Zone bis 0,5 cm.

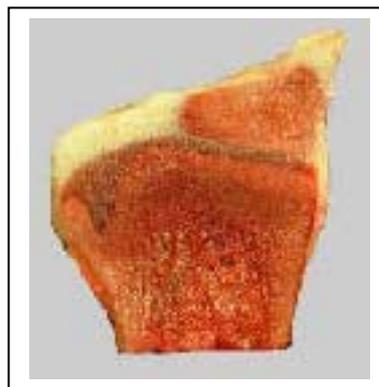
Beim Grad 2 lässt sich innerhalb der Metaphyse bereits ein deutlicher Zapfen hypertropher Knorpelzellen mit einer Länge bis zu 1 cm erkennen.

Beim Schweregrad 3 beträgt die Länge des Zapfens aus hypertrophen Knorpelzellen 1- 2 cm.

Bei Grad 4 ist der Zapfen hypertropher Knorpelzellen > 2 cm lang und kann bis in die Meta- bzw. auch Diaphyse hineinreichen.



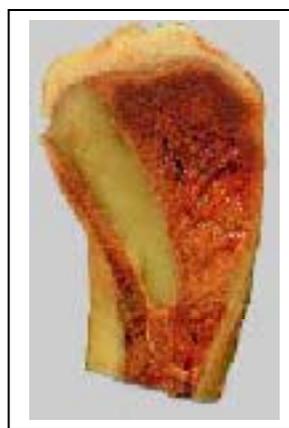
a. TD Grad 1



b. TD Grad 2



c. TD Grad 3



d. TD Grad 4

Abb. 4 a-d: Einteilung der TD-Schweregrade (Längsanschnitt prox. TT-Kopf, formalinfixiert)

- a. Grad 1: Wachstumsplatte bis 0,5 cm lokal verbreitert
- b. Grad 2: Zapfen hypertropher Knorpelzellen in der Metaphyse, bis 1 cm
- c. Grad 3: Zapfen hypertropher Knorpelzellen in der Metaphyse, 1 bis 2 cm
- d. Grad 4: Zapfen hypertropher Knorpelzellen in der Metaphyse, > 2 cm

3.1.5 Beurteilung der Fußballen auf das Vorliegen einer Pododermatitis (PD)

Die Fußballen der entnommenen Tiere wurden adspektorisch auf ihren Gesundheitszustand hin begutachtet. Die Fuß- und Zehenballen wurden mit Wasser und einer Bürste von Einstreu und Kotresten befreit und anschließend makroskopisch auf das Vorliegen einer Pododermatitis (PD) oder anderen Veränderungen hin beurteilt.

Folgender Bewertungsschlüssel wurde angewendet (modifiziert nach EKSTRAND u. ALGERS 1997) (Abb. 5 a-d):

Fußballen ohne Veränderungen wurden mit Grad 0 bewertet.

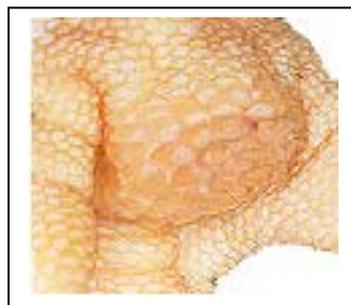
Fußballen, die eine Hyperkeratose der Hornschuppen (reticulate scales, rs) ohne weitere Veränderungen aufwiesen, wurden mit Grad 1 bewertet. Zusätzlich wurden Abheilungsstadien mit schuppenfreien Arealen, die keine weiteren Anzeichen von Veränderungen in der Sohlenhaut zeigten, ebenfalls als Grad 1 bewertet. So konnte eine übersichtliche und einfache Auswertbarkeit der Befunde gewährleistet werden.

Grad 2 beinhaltete, zusätzlich zu den Veränderungen des Grades 1 eine oberflächliche Verletzung/ Verfärbung der Haut.

Tiefe, ulzerierende Läsionen und Risse im Fußballen entsprachen dem Grad 3.



a. PD Grad 0



b. PD Grad 1



c. PD Grad 2



d. PD Grad 3

Abb. 5 a-d: Einteilung der Fußballenläsionen nach Schweregraden, modifiziert nach EKSTRAND u. ALGERS (1997)

a. Grad 0: Fußballen ohne Veränderungen

b. Grad 1: Fußballen mit Hyperkeratose

c. Grad 2: Fußballen mit oberflächlicher Pododermatitis

d. Grad 3: Fußballen mit tiefer/ ulzerierender Pododermatitis

3.1.6 Messungen der Bruchfestigkeit des Tibiotarsus

Die Bruchfestigkeit der Knochen wurde mit Hilfe eines Drei-Punkt-Biegeversuches (Automatisches Materialprüfungssystem Modell 4301, Fa. Instron) am Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgruppe Nutztierethologie und Kleintierzucht der Universität Stuttgart/ Hohenheim gemessen.⁵

Für die Messung der Bruchfestigkeit wurden die linken präparierten TT- Knochen verwendet (siehe Material und Methoden Kapitel 3.1.2.). Es wurden die Knochen der Altersstufen 12., 16. und 20. LW untersucht. Die Knochen der unterschiedlichen Altersstufen wurden bis zum Abschluss der Versuche gesammelt und bei -15°C tiefgefroren. Zwei Tage vor der Messung wurden die Knochen bei 4°C aufgetaut.

Zur Messung wurde der Knochen im Gerät mit den Knochenenden auf zwei schalenförmige Auflageflächen gelegt. Der Abstand zwischen den Auflageflächen der Knochenenden betrug 7 cm und war bei allen gemessenen Knochen gleich. Mit einer kontinuierlichen Geschwindigkeit von 200 mm/ min (Jochgeschwindigkeit) bewegte sich ein Stempel abwärts auf die markierte Mitte der Diaphyse des Knochens zu. Bei Auftreffen des Stempels wirkte dieser mit einer definierten Kraft von 5 kN (Messdose) auf den Knochenschaft ein. Die Messung endete automatisch, sobald der Knochen zerbrochen war (Abb. 6). Die Bruchfestigkeit wurde von einem an die Materialprüfmaschine angeschlossenen Computer mit Hilfe der Software der Instron Serie IX, Version 8.15, als Kraft in kN angegeben.

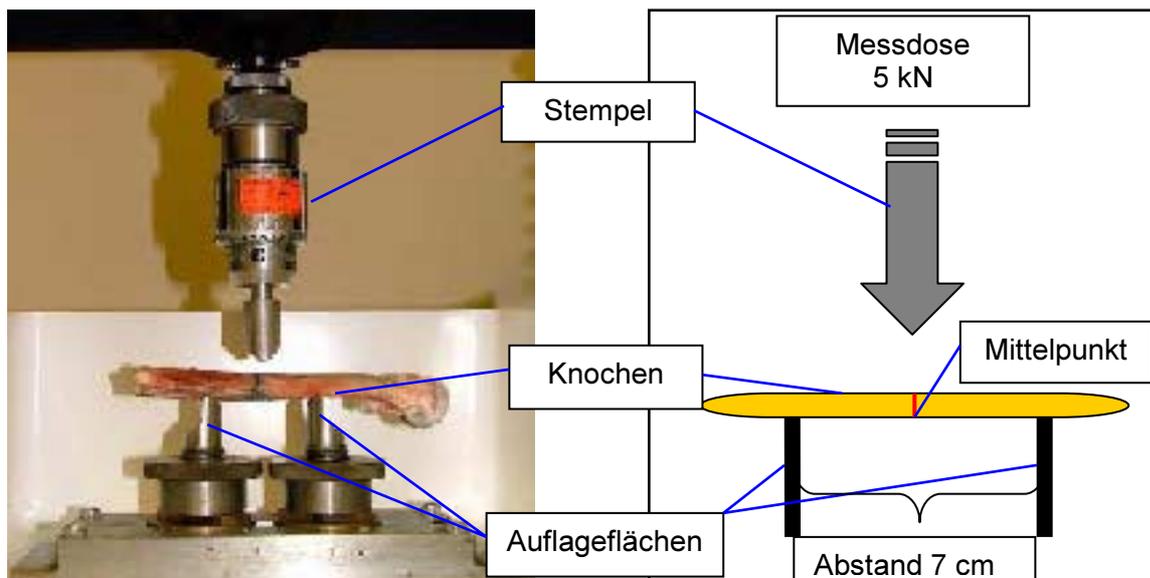


Abb. 6: Messeinrichtung zur Messung der Bruchfestigkeit, Foto und Schema der Messung

3.1.7 Histopathologische Untersuchungen

Nach der makroskopischen Beurteilung der Schnittflächen fand eine 24- 48 stündige Fixierung der halbierten Knochenenden von Fe und TT in 4% iger neutraler Formaldehydlösung statt. Nach vollständiger Fixierung wurden die Knochenstücke für zwei Stunden gewässert und danach mittels Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Titriplex[®] Fa. Merck) im Brutschrank bei 60°C schonend entkalkt. Durch diese Art der Entkalkung blieb die Morphologie der Zellen im histologischen Schnitt erhalten. In Abständen von 2- 4 Tagen, je nach Alter der

⁵ Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Grashorn, Institut für Nutztierethologie und Kleintierzucht der Universität Hohenheim, für die Hilfestellung bei der Nutzung des Gerätes bedanken.

Knochen, wurden die Knochenstücke mit Hilfe einer Präpariernadel auf ihren Entkalkungszustand hin geprüft. Je nach Härtegrad wurde entweder die EDTA- Lösung erneuert oder die Entkalkung beendet. Die Entkalkung dauerte je nach Alter der Tiere zwischen 3 Tagen und 3 Wochen. Nach Beendigung der Entkalkung wurden die Knochenstücke für zwei Stunden mit Leitungswasser gewässert und in einem Entwässerungsautomaten der Firma Sakura, Tissue Tek VIP (Vacuum Infiltration Processor) mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert. Anschließend wurden die Knochen in Paraffin (Fa. Engelbrecht) bei 56-58°C eingebettet. Nach der Einbettung wurden von den proximalen Knochenendstücken mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms der Firma Mikrom 4 ca. 4- 6 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die Paraffinschnittpräparate wurden anschließend mit einer Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung gefärbt, Hämatoxylin nach Hansen, Eosin wasserlöslich gelblich 1%ig (RO-MEIS 1989). Zur Klärung von fraglichen Strukturen im histologischen Schnitt wurden in Einzelfällen verschiedene Spezialfärbungen (Bindegewebsfärbungen) eingesetzt (v. Gieson-Färbung, Trichrom-Färbung, Azan-Färbung).

Mikroskopisch wurden die Schnitte auf Veränderungen in der Chondroepiphyse, der Wachstumsplatte, der Meta- und Diaphyse und der Knochenmarkhöhle hin beurteilt. Der Zeitpunkt des Wachstumsplattenschlusses wurde anhand des Verlustes hypertropher Knorpelzellen und dem Verschwinden der Wachstumsplatte bestimmt.

Von den Fußballen der getöteten Tiere wurden Proben für die histologische Untersuchung entnommen. Aus dem Hauptballen wurden ca. 0,5 cm dicke Gewebestücke, die alle Schichten des Ballens umfassten, herausgeschnitten. Es folgte die Fixierung der Proben in 4% iger neutraler Formaldehydlösung für 24 Stunden. Danach wurden die Fußballenproben entsprechend der Methodik der Knochen entwässert, in Paraffin eingebettet und anschließend geschnitten. Die 2- 4 µm dicken Schnitte wurden mit H.E gefärbt. Anhand der histologischen Schnitte wurde der Zustand der Gewebeschichten mikroskopisch auf Anzeichen für Entzündungen, Nekrosen und andere Veränderungen hin beurteilt und die Aussagekraft der makroskopischen Graduierung kontrolliert.

3.1.8 Histometrische Messungen an der Wachstumsplatte

Zur Beurteilung von Entwicklungsstörungen während des Längenwachstums der Knochen wurden in Stichproben die Wachstumsplatten des Tibiotarsus im Alter von 4, 8 und 12 Wochen histometrisch beurteilt. Innerhalb dieses Zeitfensters findet das stärkste Längenwachstum des Tibiotarsus statt (KORFMANN 2003). Der Knochen ist innerhalb dieser Zeitspanne am anfälligsten für Stoffwechselstörungen oder andere pathologische Einflüsse.

Es wurden folgende Daten bei den Messungen erfasst:

- Dicke der Proliferationszone (PZ)
- Dicke der hypertrophen Zone (HZ)
- Dicke der gesamten Wachstumsplatte (Addition der Teilmessungen PZ + HZ)

Zur Vereinfachung und Präzisierung der Messungen wurde die WP in zwei Hauptzonen unterteilt: Proliferationszone und hypertrophe Zone (RÜGER 1992). Die Ausdehnung der PZ reichte von der deutlich sichtbaren proximalen Grenze zur Chondroepiphyse bis hin zur prähypertrophen Zone. Die hypertrophe Zone umfasste den Bereich von der prähypertrophen Zone bis zum metaphysären Ende der überwiegenden Anzahl der hypertrophen Knorpelzellbalken. Bei dieser Art der Einteilung wurde die Ossifikationszone mit gemessen. Daraus ergab sich bei Addition beider Messwerte die Dicke der gesamten WP.

Die Messungen wurden mit Hilfe des Bildanalysesystems der Firma Soft Imaging System GmbH bestehend aus einem Mikroskop der Firma Olympus, Typ BX 41, sowie dem Rechner mit dem Bildanalyseprogramm analySIS[®] durchgeführt. Die so gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel 2003 weiterverarbeitet.

3.2 Versuch 2: Einfluss der genetischen Linie auf die Entwicklung des Beinskeletts und das Auftreten von Erkrankungen an den Hintergliedmaßen bei Mastputen

Die Durchführung und der Ablauf des zweiten Versuches sowie die Untersuchungsmethoden entsprachen der im Versuch 1 angewendeten Verfahrensweisen (s. S. 55-62).⁶

3.3 Versuch 3: Einfluss der Fütterung auf die Entwicklung des Beinskeletts und auf das Auftreten von Erkrankungen an den Hintergliedmaßen bei Mastputen

Die Durchführung und der Ablauf des Versuches 3 sowie die angewendeten Untersuchungsmethoden entsprachen mit zwei Ausnahmen denen der Versuche 1 und 2.

a) Zusätzlich zu der makroskopischen Kontrolle der Fußballen der zu den oben genannten Zeitpunkten entnommenen Probestiere wurden in jeder Fütterungsgruppe 5 bzw. 6 willkürlich ausgewählte Tiere am ersten Lebenstag mit Hilfe von Metallmarken am rechten Flügel markiert. Bei diesen Tieren wurde alle 2 Wochen der Gesundheitszustand der Fußballen nach dem gleichen Bewertungsschlüssel wie in den Versuchen 1 und 2 makroskopisch beurteilt.

b) Auf die histologische Untersuchung der Fußballen der regelmäßig entnommenen Probestiere wurde im Versuch 3 verzichtet bzw. nur im Zweifelsfall zurückgegriffen, da die Erfahrungen aus den Versuchen 1 und 2 eine hinreichende Übereinstimmung der makroskopischen und histologischen Ergebnisse ergeben hatten.

4 Statistische Auswertung

Die statistische Aufbereitung und Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels computergestützter Statistik- und Tabellenkalkulationsprogramme (SPSS 12.0 und Excel 2003 für Windows).⁷

Es wurden verschiedene Arten von Daten erhoben. Zum einen metrische Daten (Gewichts- und Längenparameter) und zum anderen nicht metrische, ordinal und nominal skalierte Daten. Zur Darstellung der metrischen Daten wurden das arithmetische Mittel und die zugehörige Standardabweichung verwendet. Die Begriffe „durchschnittlich“, „im Durchschnitt“ und „im Mittel“ im beschreibenden Text werden immer im Zusammenhang mit dem arithmetischen Mittel verwendet. Die Daten wurden hauptsächlich in Form von Grafiken dargestellt. Um die Übersichtlichkeit der Grafiken zu erhalten, wurde auf die Darstellung weiterer Fehlermerkmale verzichtet.

Zur Darstellung von eventuell bestehenden Zusammenhängen zwischen Altersgruppen und Auftreten/ Gradverteilung von tibialer Dyschondroplasie und Pododermatitis (ordinal und nominal skalierte Variablen) wurden Kreuztabellen erstellt (Chi-Quadrat-Test). Bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von 0,05 ergaben sich signifikante Unterschiede, wenn der berechnete p-Wert kleiner oder gleich 0,05 war. Das Wort Signifikanz hat in den nachfolgenden Auswertungen nur eine beschreibende Bedeutung.

Im Anhang sind alle ermittelten metrischen Daten, inklusive Mittelwerten und Standardabweichung, tabellarisch zusammengestellt (s. S. I-XVI)

⁶ Die makroskopisch ermittelten Daten zur Pododermatitis des Versuchs 2 (Linienvergleich) wurden von Frau Dr. Kerstin Wäse erhoben und mir freundlicherweise überlassen.

⁷ Hiermit möchte ich mich bei Frau K. Krainer, geboren Hornemann, Institut für Biometrie der FU Berlin, für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung bedanken.