

Aus der
Tierklinik für Fortpflanzung
Fachbereich Veterinärmedizin
Freie Universität Berlin

Der Einsatz des Geruchssinns von Hunden in der Diagnostik reproduktionsmedizinischer physiologischer und pathologischer Prozesse

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Eingereicht von
Dr. med. vet. Carola Fischer-Tenhagen
Berlin 2019

Für meine Familie

Öffentlicher Vortrag: 26.11.2019

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 AUFBAU DER HABILITATIONSSCHRIFT	2
2 EINLEITUNG.....	4
3 RIECHEN.....	7
4 GERUCH.....	9
5 GERUCH IN DER MEDIZIN	13
6 GERUCH IN DER TIERMEDIZIN	16
6.1 MASTITISDIAGNOSTIK	17
6.2 BRUNSTERKENNUNG.....	19
7 QUALITÄT WISSENSCHAFTLICHER ARBEITEN MIT GERUCHSHUNDEN	24
7.1 WIE WERDEN HUNDE ZU GERUCHSHUNDEN?.....	24
7.2 KRITERIEN FÜR DIE BEWERTUNG WISSENSCHAFTLICHER ARBEITEN MIT GERUCHSHUNDEN	27
8 DISKUSSION	30
8.1. EINSATZMÖGLICHKEITEN VON GERUCHSHUNDEN AUF MILCHVIEHBETRIEBEN	30
8.1.1. <i>Der Brunstsuchhund</i>	30
8.1.2. <i>Ökonomie</i>	32
8.1.3. <i>Weitere Einsatzmöglichkeiten von Geruchshunden in der Rinderproduktion</i>	33
8.2. GERUCHSDIAGNOSE IN DER MEDIZIN.....	35
8.2.1. <i>Herausforderungen bei der Entwicklung einer Methode zur Geruchsdiagnose von Krebserkrankungen</i>	35
8.2.2. <i>Geruchsdiagnose von Bakterien</i>	37
8.3. GRENZEN IM EINSATZ VON GERUCHSHUNDEN	38
9 AUSBLICK	40
10 LITERATURVERZEICHNIS.....	42
11 ZUSAMMENSTELLUNG DER EIGENEN PUBLIZIERTEN WISSENSCHAFTLICHEN ARBEITEN UND DARSTELLUNG DES EIGENEN ANTEILS AN DIESEN ARBEITEN	53
DANKSAGUNG.....	57
CURRICULUM VITAE	58

ANHANG A: Publikationen zum Einsatz des Geruchssinnes von Hunden in der Diagnostik

ANHANG B: Liste der wissenschaftlichen Publikationen und Auswahl einiger Kongressbeiträge

Abkürzungsverzeichnis

VOC	Volatile organic compound
OR	Olfaktorischer Rezeptor
ORN	Olfaktorisches Rezeptorneuron
E-nose	Elektronische Nase
GC-MS	Gaschromatographie–Massenspektrometrie
LH	Luteinisierendes Hormon
KBE	Koloniebildende Einheit
PCR	Polymerase Kettenreaktion

1 Aufbau der Habilitationsschrift

Diese Habilitationsschrift befasst sich mit Untersuchungen zum Einsatz des Geruchs als Indikator physiologischer und pathologischer Prozesse. Als Beispiele dieser Anwendung in der veterinärmedizinischen Reproduktionsmedizin dienen die Bestimmung physiologischer Zustände am Beispiel der Brunst bei der Milchkuh und die Erkennung von Erkrankungen am Beispiel der bovinen Mastitis. Als weiteres Beispiel aus dem medizinischen Bereich dient die Suche nach Biomarkern für Krebserkrankungen des Menschen. Die Geruchshunde werden in den Arbeiten genutzt, um das Vorhandensein spezifischer Gerüche der obengenannten Zustände oder Prozesse darzustellen. Dabei werden die Ergebnisse der eigenen Arbeiten zu diesem Thema kritisch hinterfragt, evaluiert und mit den Studienergebnissen anderer Autorinnen und Autoren in Beziehung gesetzt.

Einleitend werden wissenschaftliche Erkenntnisse zum Geruch und zum Geruchssinn zusammenfassend dargestellt. Anschließend wird die Bedeutung von Geruch als Symptom von Krankheiten in der Medizin früher und heute beschrieben.

Die überdurchschnittliche Riechleistung und gute Trainierbarkeit des Hundes wird seit der Domestikation zur Unterstützung des Menschen bei der Jagd, aber auch zur Suche von gefährlichen oder illegalen Substanzen genutzt (Helton, 2009). Neben den klassischen Aufgaben der Menschen-, Sprengstoff- und Drogensuche werden Hunde auch eingesetzt um Schädlinge (Holzkäfer, Bettwanzen), Schimmel in Gebäuden oder Krankheiten des Menschen (Krebs, Diabetes) zu identifizieren (Browne et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Studien mit Geruchshunden in der Reproduktionsmedizin durchgeführt. Unter anderem werden Arbeiten zur Brunsterkennung beim Rind durch spezifische Gerüche und die Erkennung von Infektionen der Milchdrüse durch *Staphylococcus aureus* beschrieben.

In den letzten 20 Jahren mehren sich Arbeiten zu diesen Themen mit wissenschaftlichem Anspruch. Die Evidenz dieser Arbeiten wird beurteilt und Herausforderungen und Limitierungen für wissenschaftliches Arbeiten mit Geruchshunden dargestellt. Insbesondere die Konzeption von objektiven Testverfahren für die Überprüfung der Geruchsleistung der Hunde bringt große Herausforderungen mit sich, die hier diskutiert werden. Nach kritischer Betrachtung

werden Empfehlungen für einen bestmöglichen Testaufbau für Geruchstests mit Hunden gegeben.

In den Anhängen der Habilitationsschrift werden die eigenen publizierten Arbeiten aufgeführt. In Anhang A sind die Publikationen abgedruckt, die im Rahmen dieser Habilitationsschrift erstellt wurden. Anhang B ist eine Zusammenstellung aller wissenschaftlicher Publikationen und Auswahl einiger Kongressbeiträge.

Die eigenen Publikationen sind, wenn sie in der Habilitationsschrift als Zitat eingebunden sind, zum besseren Erkennen „fett gedruckt“ kenntlich gemacht.

2 Einleitung

Jede korrekte Diagnose ist das Ergebnis einer vollständigen und gewissenhaften klinischen Untersuchung. Das schließt die Erfassung möglicher Symptome mit allen Sinnen ein. Adspektion, Palpation und Auskultation gehören auch heute noch zur täglichen Routine klinisch tätiger Tierärztinnen. Auch die olfaktorische Prüfung kann wichtige Hinweise zu Art und Sitz der Erkrankung geben (Stöber und Gründer, 1990).

Jedes Lebewesen gibt ständig eine Vielzahl von Gerüchen ab, die in ihrer Gesamtheit als Volatium bezeichnet wird (Amann et al., 2014a). Dieses Volatium wird unter anderem beeinflusst durch den hormonellen Zyklus, durch Ernährung, aber auch durch Krankheiten. Die Heilkundigen im alten Griechenland, aber auch Praktiker der Traditionellen Chinesischen Medizin nutzten Geruchsveränderung zur Diagnose von spezifischen Erkrankungen. Bekannte Beispiele sind der süßlich fruchtige Geruch von Patienten mit Diabetes und der putride Geruch von Abszessen.

Die Geruchsbeurteilung ist ein nicht invasives und schnelles Diagnoseverfahren (Ma et al., 2006). Die Entwicklung technischer Verfahren, wie der Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC - MS) oder der elektronischen Nase (e – nose), hat dem Geruch in der Medizin als Diagnostikum wieder eine neue Bedeutung für die Erkennung von Krankheiten gegeben (Phillips, 1992). In der GC – MS werden die zu untersuchenden Stoffmischungen über eine Trennsäule aufgespalten. Zur Identifizierung und Quantifizierung mit der Massenspektrometrie (MS) werden die Moleküle ionisiert und über ein elektronisches Feld geleitet. In einem Analysator werden sie nach ihrer Masse zu Lage Verhältnis identifiziert. Die Geräte für GC–MS sind teuer und nur von qualifizierten Fachkräften zu bedienen. Elektronische Nasen bestehen aus verschiedenen Sensoren, die nach Kontakt mit bestimmten Molekülen elektrische Signale senden, die ein stoffspezifisches Muster bilden. Diese Muster werden durch ein künstliches neuronales Netzwerk miteinander verglichen. Zur Identifizierung eines Geruchs muss die elektronische Nase „trainiert“ werden, um ein Vergleichsmuster für die gesuchte Geruchsstoffmischung zu erstellen. Dazu sind Informationen Voraussetzung, ob es überhaupt spezifische Gerüche für einen physiologischen oder pathologischen Zustand gibt, und in welchem Medium und welchen Konzentrationen diese zu finden sind. Vorbild für die technische Entwicklung war die biologische Nase.

Bei Fragestellung zu Existenz oder Qualität eines Geruches, ist die biologische Nase, insbesondere die der Makrosmatiker wie Hund und Ratte von großer Bedeutung. Einige anatomische und physiologische Eigenschaften ermöglichen das gute Riechvermögen dieser Spezies. Im Verhältnis zur Gesamtgröße des Gehirns, ist das Riechhirn des Hundes 40 x größer als das des Menschen (Tomšič und Mušević, 2013). Die Riechschleimhaut eines mittelgroßen Hundes ist 10-mal größer und die verästelte Form der *Conchae nasales* begünstigt die Anheftung von Geruchsstoffen an die Geruchsrezeptoren (Craven et al., 2007). Statt 3%, wie beim Menschen, machen beim Hund die Gene für olfaktorische Rezeptoren 6 % des Gesamtgenoms aus (Quignon, 2003).

Hunde sind zu einem wichtigen Partner des Menschen geworden, bei der Suche nach Gerüchen, die auf andere Weise nicht gefunden werden würden (Furton und Myers, 2001). Ihr Wille, mit dem Menschen zusammenarbeiten, macht Hunde gut trainierbar. Sie können trainiert werden, spezifische Gerüche zu identifizieren und anzuzeigen, wenn diese Gerüche für den Hund wahrnehmbar sind.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob für Brunst spezifische Gerüche in verschiedenen Körpersekreten der Milchkuh zu identifizieren sind. Des Weiteren wurde untersucht, ob in der Milch von an Mastitis erkrankten Kühen der verursachende Erreger anhand eines spezifischen Geruchs identifiziert werden kann.

In der Humanmedizin ist die frühzeitige Diagnose, insbesondere von Tumorerkrankungen für die Prognose der Patienten von besonderer Bedeutung. Es gibt Hinweise, dass an malignen Tumoren erkrankte Patienten einen für den Tumor spezifischen Geruch abgeben. In dieser Arbeit wurde überprüft, ob in der Atemluft von an kleinzelligem Lungenkarzinom erkrankten Patienten spezifische Gerüche zu ermitteln sind. Weiterhin wurde untersucht, ob dieser Geruch seinen Ursprung auf zellulärer Ebene in den Tumorzellen oder auf der metabolischen Ebene des Gesamtorganismus hat.

Für die Beantwortung der Fragestellungen ergaben sich vielfältige Teilfragestellungen zum optimalen Training von Geruchshunden sowie zur Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit von wissenschaftlichen Ergebnissen in diesem Bereich. Die Validität von Geruchstests mit Hunden wurde im Rahmen von systematischen Literaturbeurteilungen einer kritischen Prüfung unterzogen.

Die Publikationen, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, leisten einen wichtigen Beitrag zur Standardisierung von Testverfahren und Studien mit Geruchshunden. Es wurden wertvolle Erkenntnisse gewonnen über die Nutzbarkeit von Gerüchen zur Brunsterkennung beim Rind und zur Erregerdiagnostik bei Mastitis, aber auch für die Entwicklung von nicht-invasiven Diagnoseverfahren für Tumorerkrankungen in der Humanmedizin.

3 Riechen

„Das beste Gedächtnis hat bekanntlich die Nase!“

(Kurt Tucholsky)

Riechen gehört zu den komplexesten chemischen Sinneswahrnehmungen der Wirbeltiere (Atzmüller und Grammer, 2000).

Gerüche werden in der *Regio olfactorii* wahrgenommen, die sich bei Säugtieren im oberen Bereich der Nasenmuschel (*Conchae nasales*) befindet und mit Riechschleimhaut ausgekleidet ist. Die Riechschleimhaut eines erwachsenen Menschen ist ca. 10 cm² groß. Bei einem mittelgroßen Hund beträgt ihr Größe dagegen ca. 100 cm² (Issel-Tarver und Rine, 1996).

Die Riechschleimhaut wird vorwiegend aus drei Zellarten gebildet: Riechzellen, Stützzellen und Basalzellen. Riechzellen sind bipolare Nervenzellen. Am ihrem apikalen Pol sendet die Zelle eine Zilie mit einem olfaktorischen Rezeptor (OR) an die Oberfläche der Riechschleimhaut (Morrison und Costanzo, 1992). Riechzellen sind die einzigen Nervenzellen, die direkten Kontakt mit der Umwelt haben. Zilien von 20 bis 30 Riechzellen bilden knotenartige Verdickungen (*Glomerula*), an die Geruchstoffe binden (Rouquier et al., 2000). Ein Geruchstoff kann an mehreren OR binden und so mehrere Riechzellen aktivieren. Die Form des olfaktorischen Rezeptors wird durch die Transkription der olfaktorischen Rezeptorgene im Zellkern der Riechzelle bestimmt. Der Kontakt zu einem bestimmten Geruchstoff führt zu einer vermehrten Transskription der Gene, die passende OR bilden (Quignon et al., 2003). Das führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit für einen Geruchsstoff. Die Riechzelle kann also trainiert werden.

Der andere Pol der Riechzelle ist ein dünnes unmyeliertes Axon, das durch die Siebbeinplatte (*Lamina cribosa*) zieht und die Riechzelle über eine synaptische Verbindung mit dem Riechkolben (*Bulbus olfactorius*) im Gehirn verbindet. Von dort laufen Traktionsbahnen zum Neocortex und zum Hypothalamus als Teil des limbischen System im Hypothalamus. Das limbische System steuert Triebverhalten, Orientierung, das Gedächtnis und Emotionen von Säugetieren. Letzteres erklärt, warum Geruch nicht nur bewusst wahrgenommen wird, sondern auch Emotionen auslösen und soziale Verhaltensmuster beeinflussen kann (Soudry et al., 2011).

Die unbewusste Geruchswahrnehmung wird durch Pheromone gesteuert. Das sind biologische wirksame Moleküle, die für die innerartliche chemische Kommunikation bedeutsam sind (Sankar und Archunan, 2004). Pheromone werden von dem vomeronasalen oder Jakobschen Organ wahrgenommen.

Das vomeronasale Organ liegt im unteren Teil der Nasenscheidewand (*Septum nasi*). Dort befinden sich auf jeder Seite des Nasenganges kleine Einstülpungen (Adams und Wiekamp, 1984). Die Rezeptoren des vomeronasalen Organs unterscheiden sich in ihrer Struktur von den OR in der Riechschleimhaut und werden auch von einer eigenen Gruppe von Genen codiert (Firestein, 2001).

Geruchsrezeptoren findet man auf nahezu allen Zellen des Körpers (Spehr et al., 2004). Wirbeltiere besitzen zwischen 600 und 1400 funktionale Gene für olfaktorische Rezeptoren (Kaupp, 2010). Damit werden die OR von einer der größten Genfamilien der Säugetiere codiert. Beim Menschen machen sie 3% des Erbgutes aus (Sosinsky et al., 2000), beim Hund 6 % (Quignon et al., 2003)

Geruchsrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bei diesen Rezeptoren kommt es durch Bindung eines Liganden zur Aktivierung des G-Proteins. Dieses wiederum aktiviert die Adenylcyclase, wodurch Adenosintriphosphat in zyklisches Adenosinmonophosphat umgewandelt wird. Bindet das zyklische Adenosinmonophosphat an einen Ionenkanal, kommt es durch Einstrom von Ionen zu einer Depolarisation und damit zur Reizauslösung der Riechzelle (Firestein, 2001).

Für die Öffnung der Ionenkanäle, die zur Depolarisation der Zelle führen, ist ein bestimmter Potentialunterschied nötig. Das bedeutet, dass eine gewisse Anzahl von olfaktorischen Rezeptoren aktiviert werden muss, um eine Reizauslösung zu generieren. Damit ist eine bestimmte Menge an Geruchsstoffen nötig, um einen Geruch wahrzunehmen. Ein OR kann aber von mehreren unterschiedlichen Geruchsstoffen aktiviert werden, so dass die Auslösung eines Geruchsreizes nicht nur von der Konzentration des Geruches, sondern auch von seiner Zusammensetzung abhängt (Firestein, 2001).

4 Geruch

*„Was ist ein Name? Was uns Rose heißt, wie es auch hieße, würde lieblich riechen.“
(William Shakespeare)*

Ein Geruch ist die Wahrnehmung von Reizen durch Aktivierung der Geruchsrezeptoren in den primären Riechorganen. Geruch ist also keine spezifische Eigenschaft einer Substanz, sondern die für den wahrnehmenden Organismus spezifische Empfindung in den Riechorganen (Auffarth, 2013). Ein Geruch wird meist von mehreren Geruchsstoffen erzeugt. Geruchsstoffe sind oberflächenaktive Substanzen mit niedriger Polarität und hohem Dampfdruck. Die Anzahl von Geruchsstoffen, die einen Geruch bilden, kann sehr unterschiedlich sein. Blumendüfte setzen sich aus Dutzenden Geruchsstoffen zusammen, wogegen das Bouquet von Wein aus tausenden Geruchsstoffen besteht (Raguso, 2008; Louw et al., 2009). Bis heute ist es noch nicht gelungen, ein einheitliches System zur Klassifizierung von Gerüchen zu entwickeln. Grundsätzlich können drei verschiedene Ansätze zur Klassifikation von Gerüchen unterschieden werden (Ohloff, 1990):

1. Struktur – Geruch – Beziehung

Geruchsstoffe können anhand ihrer molekularen Eigenschaften beschrieben werden. Eigenschaften wie Molekülgröße, funktionelle Gruppen und Methyl - Gruppen haben einen Einfluss auf die Aktivitätsmuster der Geruchsrezeptoren (Johnson und Leon, 2000). Besonders große und wenig volatile Moleküle lösen oft lange und komplexe Signale aus (Kermen et al., 2011).

Chemisch ähnliche Moleküle können eine ähnliche Geruchsempfindung hervorrufen. So erzeugt Benzylaldehyd den Geruch von Mandeln, der auch bei Nitrobenzol empfunden wird (Ohloff, 1990). Es ist aber nicht grundsätzlich möglich, anhand der Molekülstruktur den Geruch vorherzusagen (Auffarth, 2013). Benzylaldehyd unterscheidet sich chemisch stark von Zyanid, welches ebenfalls nach Mandeln riecht. Spiegelbildisomere, also chemisch mehr oder weniger gleiche Substanzen, lösten dagegen oft völlig unterschiedliche Signale in den Geruchsrezeptoren aus (Laska und Shepherd, 2007).

2. Semantischer Ansatz

Bei der semantischen Methode wird ein Geruch durch eine Liste von

3. Geruchsqualitäten wie z.B. fruchtig, honigartig oder faulig beschrieben, wobei mehrere Geruchsqualitäten zur Beschreibung eines Geruches verwendet werden können. Erstmals hat Henning (1916) versucht, eine Gruppierung verschiedener Gerüche durchzuführen, indem er ein Geruchsprisma entwickelte, das auf 6 Geruchsqualitäten basierte. Harper et al. (1968) erweiterten diese Liste um weitere 44 Geruchsqualitäten um Gerüche zu beschreiben. Dravnieks (1982) allerdings zeigte, dass mehr Geruchsqualitäten nötig sind, um wiederholbar und vergleichbar Gerüche zu beschreiben. 150 Probanden verwendeten 146 Geruchsqualitäten um wiederholbar 10 Gerüche zu beschreiben.
4. Rezeptorbasierte Methode
Geruchsstoffe binden an den OR nach dem Schlüssel – Schloss - Prinzip. Ein Geruchstoff könnte auch durch die Rezeptoren klassifiziert werden, die durch ihn aktiviert werden. Geruchsstoffe werden allerdings von mehr als einem Rezeptor erkannt, und die meisten Rezeptoren binden mehr als einen Geruchsstoff (Firestein, 2001). Durch diese kombinierte Strategie können eine Vielzahl von Gerüchen differenziert werden. Der Verlust von einzelnen Rezeptoren durch Erkrankungen kann dadurch auch Einfluss auf das Riechvermögen haben. So konnte gezeigt werden, dass der Verlust eines bestimmten OR zum Verlust der Fähigkeit führt, Androstenon zu riechen, ein Pheromon das im Ebergeruch enthalten ist (Keller et al., 2007).

Die Problematik, Gerüche zu klassifizieren, wird auch das „Stimulus – Problem“ genannt, da eine genaue Reiz - Reaktionsvorhersage im Geruchssinn bisher nicht möglich ist (Auffarth, 2013). Bei einigen Gerüchen ist die Geruchsempfindung auch von der Konzentration der Geruchsstoffe abhängig. Thiol riecht in hoher Konzentration unerträglich beißend, wogegen es in niedriger Konzentration leicht nach Zitrone riecht. Amylacetat dagegen riecht in weiten Konzentrationsstufen immer angenehm fruchtig (Rubin und Katz, 1999).

Mit der Entwicklung der Gaschromatographie –Massenspektrometrie (GC –MS) in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts konnten die Substanzen (Geruchsstoffe), die einen Geruch erzeugen, chemisch identifiziert werden (Moncrieff, 1961). Bei diesen Methoden werden die Geruchsproben mittels einer chromatographischen Trennsäule analysiert. Durch unterschiedliche Siedepunkte und Wechselwirkungen werden die einzelnen Substanzen aufgetrennt und können so einzeln dokumentiert und bestimmt werden. Damit sind zwar die Substanzen in ihrer jeweiligen

Zusammensetzung und Konzentrationen bekannt, es ist aber nicht geklärt, in wie weit diese Substanzen bei der Auslösung der Geruchsempfindung beteiligt sind.

Eine weitere technische Möglichkeit, Gerüche zu identifizieren, ist die elektronische Nase. Bei diesem Prinzip wandeln Sensoren Eigenschaften von Gasen in elektrische Signale um. Als Sensoren kommen Metalloxide, Halbleiterpolymere, elektroaktive Polymere sowie optische oder elektrochemische Gassensoren zum Einsatz (Wilson und Baietto, 2009). Die Signale dieser Sensoren werden mit mathematischen Ansätzen, einem künstlichen neuronalen Netzwerk, in zwei- bzw. dreidimensionale Muster umgerechnet. Die entstehenden Muster werden miteinander verglichen und so ähnliche Gerüche identifiziert (Turner und Magan, 2004). Ist also das Muster eines spezifischen Geruchs bekannt, kann die elektronische Nase diesen wiederfinden. Elektronische Nasen werden z.B. in der Autoindustrie für Raumduftentwicklung und in der Lebensmittelindustrie zur Qualitätskontrolle eingesetzt. In der Medizin verwendet man elektronische Nasen z.B. zur Tuberkulosediagnose (Weetjens et al., 2009).

Da Geruch eine Sinnesempfindung ist, kann Geruch bisher nicht qualitativ und quantitativ gemessen werden. Für Gerüche werden in Verhaltenstests mit Tieren oder mit in-vitro Zell-Tests mit Geruchszellen Nachweisgrenzen bestimmt (Ohloff, 1990). Geruch kann also gerochen werden oder nicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit speziell trainierten Hunden Verhaltenstests durchgeführt, um die Existenz spezifischer Gerüche in diversen Medien nachzuweisen. In zwei Arbeiten wurde mit Hunden getestet, ob in Vaginalsekret, Harn, Milch und Speichel von Kühen ein Östrus –spezifischer Geruch zu identifizieren ist. In der in **PUBLIKATION 1** beschriebenen Studie wurde Vaginalsekret, Harn, und Milch von Kühen (N = 48) im Östrus bzw. Diöstrus gewonnen. Der Östrus wurde durch eine transrektale Ultraschalluntersuchung diagnostiziert. Dabei wurde Östrus durch einen polygonalen Follikel größer als 1,2 cm bestimmt. Kühe im Diöstrus hatten ein Corpus luteum > 1 cm (Roelofs et al., 2010). Sieben Hunde verschiedener Rassen wurden auf einer speziellen Trainingsplattform trainiert, die Sekrete von Kühen im Östrus und Diöstrus zu unterscheiden. Es wurden vier Trainingseinheiten durchgeführt, bei denen die Hunde beim Riechen an 52 Proben von Vaginalsekret von Kühen im Östrus belohnt wurden.

Der Geruch von Kühen im Diöstrus blieb unbelohnt. Beim anschließenden Test mit unbekanntem Proben konnten die Hunde Vaginalsekret von Kühen im Östrus mit einer durchschnittlichen Sensitivität von 80,3% und Spezifität von 97,0 % aus einer Gruppe von Proben identifizieren. Harn von Kühen im Östrus und Diöstrus identifizierten die so trainierten Hunde mit einer Genauigkeit von 80,0 %. Mit dieser Studie wurden die Ergebnisse von früheren Studien (Kiddy et al., 1978; Hawk et al., 1984; Kiddy et al., 1984) bestätigt, dass Hunde den Brunstgeruch von Kühen erkennen können und so grundsätzlich zur Brunsterkennung geeignet sind. Allerdings war in diesen frühen Studien ein Einsatz von Hunden an Kühen auf Milchviehbetrieben nicht Untersuchungsgegenstand. Für den Einsatz in einem Milcherzeugerbetrieb, wäre es von Vorteil, wenn der Hund den Östrus - spezifischen Geruch erkennen könnte, während er zur Fütterungszeit auf dem Futtertisch an den Köpfen der Kühe entlangläuft. Daher wurde getestet, ob auch im Speichel Östrus - spezifischer Geruch zu identifizieren ist (**PUBLIKATION 3**). In einem an **Publikation 1** angelehnten Versuchsaufbau wurde Speichel von Kühe in den unterschiedlichen Zyklusphasen gewonnen. Diesmal wurden 13 Hunde in die Studie eingeschlossen. Die Genauigkeit (Anzahl der richtig angezeigten Proben / Anzahl der untersuchten Proben) der Identifikation der Proben von Kühen im Östrus lag bei 57,6 %, wobei die einzelnen Hunde zwischen 40 % und 75 % der Speichelproben von Kühen im Östrus richtig erkannten.

5 Geruch in der Medizin

„*Si aeger transire sanguine pus in urina squamassi gravibus odor est, ulcera vesicae est indicavi*“
(Hippocratis).

Schon vor 2000 Jahren wussten Hindus um die Bedeutung des Geruchs als Symptom für verschiedene Erkrankungen (Copeman, 1964). Auch Hippokrates als Begründer der modernen Medizin um 400 v.Chr. betonte die Bedeutung des Geruches eines Patienten in der klinischen Untersuchung (Mandl, 1922). Selbst ohne die Kenntnisse über pathologische Prozesse sowie Bakterien und Viren, erkannten die damaligen Heilkundigen, dass es durch spezifische Pathologien zu einer Veränderung des Geruchs in Atem, Urin, Schweiß oder anderen Sekreten des Patienten kommen kann. Bei an Gelbfieber erkrankten Patienten wird Geruch einer Fleischerei beschrieben, Patienten mit Tuberkuloseinfektion sollen einen Geruch nach abgestandenen Bier ausströmen und bei einer Rötelinfection riechen Patienten nach frisch gerupften Federn (Hayden, 1980). Aber auch Stoffwechselerkrankungen können einen spezifischen Geruch verursachen. So strömen Patienten mit Diabetes mellitus einen süßlich fruchtigen Geruch nach Apfelessig aus (Smith et al., 1982). Tatsächlich werden derzeit in Angola und Mosambik Riesenratten (*Crietomys gambianus*) eingesetzt, um im Sputum von Patienten mit Atemwegserkrankungen *Mycobacterium tuberculosis* zu detektieren. Die Sensitivität und Spezifität der Identifikation von Infektionen mit *M. tuberculosis* durch die Ratten liegt bei 86,5 % und 89,1 % (Weetjens et al., 2009). Ein großer Vorteil der Geruchsdiagnostik ist, dass im Gegensatz zur Kultur die Anzuchtdauer von 7 Tagen wegfällt.

Auch der gesunde Mensch gibt über den Atem, die Haut oder den Urin eine Vielzahl von Gerüchen ab. Die Gesamtheit der Gerüche, die ein Mensch ausströmt, wird als Volatium bezeichnet (Amann et al., 2014a). Mit der GC – MS wurden in der Atemluft neben den Hauptkomponenten Stickstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid Spuren von über 3000 volatilen organischen Komponenten (VOCs) im nano- bis picomolaren Bereich nachgewiesen (Mukhopadhyay, 2004). Diese Gerüche hängen von Lebens- und Ernährungsgewohnheiten des Individuums ab, aber auch von Alter, Hormonstatus und Erkrankungen. Infektionen mit Erregern oder andere Krankheiten

erzeugen in Zellen oxidativen Stress. Durch Oxidation von Peptiden und Lipiden entstehen spezifische VOCs, die als Biomarker für diese Krankheiten dienen können. Die Muster von Biomarkern variieren von Krankheit zu Krankheit (Mukhopadhyay, 2004).

Viele Studien machten sich zur Aufgabe, die physiologische Zusammensetzung von Geruchsstoffen des menschlichen Atems zu erforschen, um auf diese Weise Biomarker für bestimmte Krankheiten zu finden (Whittle et al., 2007).

Gerade im Bereich von Tumorerkrankungen wird im Geruch ein Potential für Früherkennung gesehen. Tumorwachstum geht mit einer Veränderung der Genexpression, sowie einem veränderten Zellstoffwechsel einher. Damit verändert sich auch die Produktion von VOCs durch den betroffenen Organismus (Krilaviciute et al., 2015). Einige Studien haben gezeigt, dass mittels Analytik von VOC-Mustern aus Atemluft- und Urinproben Lungenkrebspatienten von gesunden Personen unterschieden werden können (Phillips et al., 1999; Bajtarevic et al., 2009; Fuchs et al., 2010; Song et al., 2010; Ulanowska et al., 2011; Saalberg und Wolff, 2016). In diesen Studien wurden zwischen 4 und 50 VOCs, meist Aldehyde, identifiziert, deren Konzentration sich in Atemluft oder Urin bei Lungenkrebspatienten und Gesunden unterschieden. Die Sensitivität der Tests lag zwischen 71,6 % und 100 % und die Spezifität zwischen 66,7 % und 100 %. Das ist vergleichbar mit der Sicherheit der Erkennung dieser Tumore durch die Computertomographie (Fuchs et al., 2010). Damit könnte das Screening von Urin oder Atemluft auf krebsspezifische Gerüche ein nicht - invasives, die Patienten nicht belastendes, schnelles Diagnoseverfahren sein. Derzeit hat sich dieses Verfahren aber noch nicht im klinischen Alltag durchgesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob biologische Nasen einen Tumor – spezifischen Geruch auf Zellkulturebene identifizieren können (**PUBLIKATION 6**, Schallschmidt et al., 2015). Es wurde getestet, ob im Luftüberstand von Zellkulturen humaner Lungenkrebszellen (A649) im Vergleich zu Zellkulturen (Lu7466) gesunder Lungenzellen ein spezifischer Krebsgeruch zu finden ist. Dazu wurden Verhaltenstests sowohl mit Hunden (N=2) als auch mit Bienen (N=20) durchgeführt. Weder Bienen noch Hunde konnten den Luftüberstand der beiden Zellkulturen anhand des Geruches unterscheiden.

In einer Machbarkeitsstudie (**PUBLIKATION 10**) wurde geprüft, ob Geruchshunde geeignet sind, die Substanzen zu identifizieren, die in einem Screening mögliche

Biomarker für Krebs sein könnten. In dieser Studie wurden vier Hunde trainiert, Atemluft von Patienten mit Lungenkrebs (N =30) von Atemluft von gesunden Probanden (N=30) zu unterscheiden. Nur zwei Hunde konnten das Training erfolgreich abschließen. Die beiden Hunde zeigten in einem anschließenden Geruchstest mit unbekanntem Proben 9 von 9 bzw. 8 von 9 Atemluftproben von Krebspatienten richtig an. Die Atemluftproben wurden parallel mit der GC –MS analysiert. Anschließend wurden vier Substanzen mittels mathematischer Modelle ausgewählt, in denen sich die Atemluftproben von Krebspatienten von den Proben der gesunden Probanden unterschieden. Dabei handelte es sich um 1-Butanol, 2-Butanon, 2-Pentanon und Hexanal. Auf dieser Grundlage wurden mit den o.g. Substanzen synthetische Proben hergestellt, die einen krebsspezifischen Geruch simulieren sollten. Diese Proben wurden den auf Lungenkrebs trainierten Hunden präsentiert. Beide Hunde zeigten drei von vier der synthetischen Proben als Krebs positiv an.

6 Geruch in der Tiermedizin

„Der erfahrene Tierarzt nimmt abnorme geruchliche Befunde meist ganz unwillkürlich wahr, weil seine Nase beim Umgang mit dem zu untersuchenden Tier ständig in Bereitschaft ist.“

(Gustav Rosenberger)

Auffällige, meist unangenehme Gerüche geben auch in der Tiermedizin Hinweise auf Erkrankungen. Die olfaktorische Untersuchung wird als wichtiger, oft vernachlässigter Teil der klinischen Untersuchung betrachtet (Stöber und Gründer, 1990). Jauchiger Geruch aus dem Maul (*Foetor ex ore*) wird als hinweisend auf nekrotisierende Prozesse in der Maulhöhle oder Lungengangrän angesehen. Abstoßend dumpfer Geruch im hinteren Teil des Tieres ist als pathognostisch für Entzündungen des weiblichen Genitaltraktes und Zwischenschenkelektzeme beschrieben (Stöber und Gründer, 1990). An Urämie erkrankte Katzen oder an Parvovirose erkrankte Hunde sollen einen beißenden, bzw. dumpfen Geruch ausströmen, der wichtige Hinweise auf Art und Lokalisation der Erkrankung geben kann (Niemand und Arnold-Gloor, 2006). Für die Sektion von Tieren werden verschiedene pathognostischer Gerüche beschrieben (Tabelle 1).

Tabelle 1: Geruchsqualitäten, die im Rahmen der Sektion von Tieren auf spezifische Erkrankungen hinweisen (modifiziert nach King et al. (2014))

Geruchsqualität	Erkrankung
Ranzige Butter	<i>Clostridium chauvoie</i> Infektion
Faulgrube	Salmonellose
Vergärung	Septische Mastitis
Zwiebel /Knoblauchgeruch	Vergiftung mit organischen Phosphaten
Altöl	Bleivergiftung
Synthetische Süße	Pentobarbitalvergiftung
Holzteer	Terpentin /Kresolvergiftung
Apfelicider	Magenulzera
Fisch	Pannikulitis

In wissenschaftlichen veterinärmedizinischen Arbeiten wird Geruch als deskriptive Qualität einer Erkrankung, meist einer Infektionskrankheit, erwähnt (Cooper, 2000; Vivrette et al., 2000; voor Dieren und Mekkes, 2005). Bei der klinischen Endometritis des Rindes ist faulig dumpfer Geruch des Vaginalsekrets mit der Höhe der Bakteriendichte von Uterustupfern assoziiert (OR: 1.76, CI: 1.50–2.06, $P < 0.001$) worden (Williams et al., 2005). Die akute Metritis beim Rind wird durch übelriechenden, wässrigen, rotbraunen Ausfluss und eine erhöhte Körpertemperatur $\geq 39,5^\circ\text{C}$ innerhalb der ersten 21 Tage nach dem Abkalben definiert (Sheldon et al., 2006). Eine Behandlung der akuten Metritis erfolgt in der Regel mit einem Antibiotikum (Pohl et al., 2016). Die Geruchsempfindung des Untersuchers kann daher entscheidend für die Anwendung eines Antibiotikums sein. Die Sensitivität und Spezifität, eine akute Metritis am Geruch des vaginalen Schleims zu erkennen, lag bei Tierärztinnen, Tierärzten und Studierenden bei 75 bzw. 60 % (Sannmann et al., 2013). Allerdings war die Übereinstimmung der Untersucher in dieser Studie nur moderat. Eine e - nose dagegen erkannte die Metritis mit einer Sensitivität und Spezifität von 92 bzw. 100% (Sannmann et al., 2013).

Geruch könnte also auch in der Tiermedizin durch Entwicklung sensitiver Geräte, die spezifische Gerüche erkennen können, als diagnostische Methode an Bedeutung gewinnen.

6.1 Mastitisdiagnostik

Die Mastitis ist die häufigste Ursache für den Einsatz von Antibiotika beim Milchrind (Thomson et al., 2008; Kuipers et al., 2016; Machado und Bicalho, 2018). Obwohl die Mastitis meist durch eine Infektion mit laktogen aufsteigende Bakterien verursacht wird, ist nicht immer eine antibiotische Behandlung angezeigt (Krömker und Leimbach, 2017). Bei leichten und mittelschweren Mastitiden (Pinzón-Sánchez und Ruegg, 2011), bei denen keine oder nur gram - negative Erreger nachgewiesen werden, kommt es durch eine antibiotische Behandlung zu keiner verbesserten Heilungsrate (Mansion-de Vries et al., 2014). Daher ist eine schnelle Identifizierung des Erregers wichtig. Auch die Europäische Union fordert zur Minimierung des Antibiotikaeinsatzes in der Veterinärmedizin den Einsatz von Schnelltesten (Europäische Kommission, 2015).

Der Goldstandard für die Erregerdiagnostik bei der Mastitis ist die aseptische Entnahme von Viertelgemelksproben und die Kultivierung der potentiellen Erreger auf Nährmedien (Krömker und Leimbach, 2017). Molekularbiologische Methoden wie die Polymerase Kettenreaktion (PCR), sind sensitiver als die kulturellen Methoden. Sie identifizieren jedoch auch abgestorbenes Erregermaterial und geringe Keimmengen (Steele et al., 2017). Für die Differenzierung von in kulturellen Methoden isolierten Bakterien, kommt neben kulturellen und molekularbiologischen Methoden das Matrix – assistierte - Laser- Desorptions - Ionisierung – Time off light (MALDI – TOF) Verfahren zum Einsatz (Böhme et al., 2012).

Für eine evidenzbasierte Therapieentscheidung am Tier ist die Klassifizierung der verursachenden Erreger in gram - positiv, gram - negativ und kein Wachstum hilfreich (Roberson, 2012). Dies führt zu einer deutlichen Reduzierung des Antibiotikaeinsatzes (Vasquez et al., 2017).

Derzeit sind Schnelltestverfahren für Erregeranzucht auf Trockenagar (Mansion-de Vries et al., 2014), Selektivnährböden (Ganda et al., 2016) oder in Röhrcchen mit Farbumschlag (Krömker et al., 2018) evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass mit einem evidenzbasierten Therapiekonzept mit Hilfe eines Schnelltestverfahrens höhere klinische Heilungsraten erreicht werden, signifikant weniger lokale Antibiotika eingesetzt werden und auch die Kosten pro klinischer Mastitis gesenkt werden können (Mansion-de Vries et al., 2016).

Dennoch sind bei allen diesen Schnelltestverfahren Inkubationszeiten von 12 bis 48 Stunden notwendig (Krömker et al., 2018). Eine Diagnose der Erreger mittels Bestimmung von leichtflüchtigen organischen Komponenten könnte in Echtzeit durchgeführt werden. Erste Studien haben gezeigt, dass sich die VOCs im Luftüberstand von Milchproben von akut an Mastitis erkrankten und gesunden Eutervierteln unterscheiden (Eriksson et al., 2005). Andere Autoren (Hettinga et al., 2009) analysierte die VOCs im Luftüberstand von Milchproben von gesunden und von an Mastitis erkrankten Kühen bei denen *Escherichia coli*, koagulase negative Staphylokokken, *Streptococcus dysgalactia* und *Streptococcus uberis* isoliert worden waren. Es zeigte sich, dass in der GC – MS weniger VOCs bei gesunder Milch identifiziert wurden. Durch Entwicklung eines künstlichen neuronalen Netzwerkes konnten die Milch gesunder und infizierter Viertel zu 100 % unterschieden werden (Hettinga et al., 2009). Für den Einsatz zur Schnelldiagnose von Erregern in der Praxis ist die GC – MS jedoch zu teuer und zu aufwändig zu bedienen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese geprüft, dass Hunde trainiert werden können, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) als einen wichtigen Erreger von Euterentzündungen in Milchproben von an Mastitis erkrankten Kühen zu erkennen und von anderen verbreiteten Erregern wie *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus uberis*, *Trueperella pyogenes* und *Candida albicans* zu unterscheiden (**PUBLIKATION 9**). In einem dreistufigen Trainingskonzept wurden in dieser Studie neun Hunde unterschiedlicher Rassen trainiert. Der Geruch von *S. aureus* wurde als Zielgeruch definiert. Im ersten Experiment lernten die Hunde den Geruch auf Baumwolltupfern, die für 24 h im Deckel einer Anzuchtplatte von den genannten Keimen verblieben waren, zu identifizieren. Nach einem Monat Training erkannten die Hunde *S. aureus* mit einer Sensitivität und Spezifität von 91,3 % bzw. 97,3 %. Im zweiten Experiment wurde hocherhitze Milch (3,5 % Fett) mit den Erregern versetzt und ein weiteres Training von einem Monat durchgeführt. An dem abschließenden Test mit 105 Milchproben, von denen 15 Proben *S. aureus* enthielten und 90 Proben mit *E. coli*, *Sc. uberis*, und Enterokokken versetzt waren, zeigten die Hunde die *S. aureus* Proben mit einer Sensitivität und Spezifität von 83,3 % bzw. 98,0 % an. Abschließend wurden die so trainierten Hunde mit Proben von an Mastitis erkrankten Kühen (N= 70) getestet. Die Fragestellung dabei war, ob sie in den z.T. grobsinnlich stark veränderten Proben Proben mit *S. aureus* (N=10) von Proben (N= 60) mit *T. pyogenes*, *Sc.uberis*, *Sc. dysgalactiae*, sowie *C. albicans* unterscheiden können. In diesem Experiment erreichten die Hunde eine Sensitivität bzw. Spezifität des Nachweises von 59,0 % bzw. 93,2 %. Es konnte also gezeigt werden, dass *S. aureus* einen spezifischen Geruch hat, der auch in der Milch von mit *S. aureus* infizierten Kühen zu finden ist.

6.2 Brunsterkennung

Effektive Brunsterkennung hat einen großen Einfluss auf die Fruchtbarkeitsleistung von Milchkühen und ist damit von großer ökonomischer Bedeutung für Milchviehbetriebe (Mottram, 2016). Der Östrus bei Milchkühen dauert im Schnitt sechs bis acht Stunden (Roelofs et al., 2010). Daher ist eine effektive Brunsterkennung eine Herausforderung und zu einem der größten limitierenden Faktoren für gute Fruchtbarkeitsleistungen bei Milchkühen geworden (Lucy et al, 2007).

Sekundäre Brunstanzeichen, wie Kopfauflegen, Aufreiten und Duldung (Lordose) werden zur Brunstbeobachtung genutzt (Van Eerdenburg et al., 1996). Bei einer Brunstbeobachtung mit drei jeweils 30 min dauernden Beobachtungen pro Tag können 74 - 90 % der Kühe in Brunst erkannt werden: Das ist möglich, wenn alle Verhaltensänderungen im Östrus in die Beobachtung mit einbezogen werden (Roelofs et al., 2010). Dieses Vorgehen ist jedoch sehr arbeits – und kostenintensiv und setzt zudem eine systematische Schulung aller Betriebsangehörigen voraus. Zur automatisierten Brunsterkennung wird die physiologische Aktivitätserhöhung der Kühe vor dem Östrus und während des Östrus genutzt (Roelofs et al., 2010). Sensoren, die an den Beinen oder an dem Hals befestigt werden, zeichnen die Bewegungsaktivität (u.a. Schrittzahl und/oder Steh- und Liegeverhalten) der Kühe auf. Computerbasiert wird die in einem festgelegten Zeitfenster gemessene Aktivität mit der Aktivität in einem vorangegangenen Zeitfenster verglichen. Bei Abweichungen wird ein Signal auf einen Computer oder ein mobiles Endgerät gesendet. Die Brunsterkennungsrate derartiger technischer Ansätze soll über 80 % liegen (Saint-Dizier und Chastant-Maillard, 2012), ist allerdings stark von den Haltungs- und Umweltbedingungen abhängig (López-Gatius et al., 2005). Die Investitionskosten für 100 Kühe liegen bei ca. 10.000 € (Saint-Dizier und Chastant-Maillard, 2012).

Der Bulle erkennt die Brunst der Kuh am Geruch. Das weibliche Tier sendet im Östrus spezifische Gerüche aus. Das männliche Tier testet durch Beriechen und Schmecken von Urin oder vaginalem Schleim, ob sich die Kuh im Östrus befindet (Rajanaayanan und Archunan, 2004). Gerüche spielen in der sexuellen Kommunikation innerhalb einer Art und zwischen verschiedenen Arten bei Säugetieren und Insekten eine wichtige Rolle (Wyatt, 2010). Pheromone sind insbesondere für das Sexualverhalten, wie z.B. Werbung, Attraktivität, Ausprägung von Brunstverhalten und Kopulation, von großer Bedeutung (Sankar and Archunan, 2004). Bei dem Empfängertier können Pheromone stereotype Verhaltensweisen oder physiologische Veränderungen im Organismus auslösen (Rekwot et al., 2001). Bei Färsen konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung von LH aus dem Hypophysenvorderlappen durch den Östrus - spezifischen Geruch beeinflusst werden kann (Nordéus et al., 2012). Ein solcher Geruch konnte bei Milchkühen im Urin, Vaginalsekret, Milch, Blut und auch im Kot nachgewiesen werden (Kiddy et al., 1984; Sankar et al., 2007). Bei dem Versuch, Substanzen zu identifizieren, die

diesen Geruch erzeugen, wurden unter anderem Di-N-Propylphthalate und 1-Iodo-undecane im Urin von Kühen im Östrus gefunden (Kumar et al., 2000).

Es konnte unter experimentellen Bedingungen gezeigt werden, dass Hunde trainiert werden können, diesen Östrus – spezifischen Geruch mit einer Genauigkeit von über 80% zu erkennen (Kiddy et al., 1978; Hawk et al., 1984; Jezierski et al., 1992).

In Rahmen dieser Arbeit wurden Trainingsmethoden für Hunde für die Brunsterkennung bei Kühen entwickelt und validiert. Trainingssubstanzen aus synthetisch hergestelltem Brunstgeruch wurden auf ihre Effektivität als Trainingsmaterial getestet. Es wurde geprüft, ob Speichel brünstiger Kühe ausreichend Geruch für die Brunsterkennung durch Hunde enthält, um eine Arbeit des Hundes vom Futtergang aus zu ermöglichen. Schließlich wurde überprüft, ob trainierte Hunde auch unter Praxisbedingungen im Stall Kühe in Brunst anzeigen können.

Zunächst wurden auf einer speziellen Trainingsplattform (Abbildung 1) Hunde trainiert, Proben mit Vaginalsekret, Harn und Speichel von Kühen im Östrus und Diöstrus zu unterscheiden (**PUBLIKATION 1, PUBLIKATION 3**). Die Konstruktion der Trainingsplattform ermöglicht eine hochfrequente Belohnung der Wahrnehmung des Zielgeruchs, der in dieser Studie Östrus- spezifischer Geruch war. Dadurch konnten sieben Hunde mit nur vier Trainingseinheiten trainiert werden, Östrus – spezifischen Geruch mit einer Sensitivität und Spezifität von 80,3 % bzw. 97,0 % zu unterscheiden. Die Identifikation des Östrus - spezifischen Geruches im Speichel war mit einer Genauigkeit von 57,6 % bei einer Zufallswahrscheinlichkeit vom 25,0 % möglich.



Abbildung 1: Trainingsplattform für Geruchstraining

Die Gewinnung von ausreichend Proben zum Training für potentielle Brunstsuchhunde ist zeit - und kostenaufwändig, da bei jedem Tier, von dem eine Probe genommen wird, eine genaue Zyklusbestimmung durchgeführt werden muss. Es muss auch mit Proben von vielen verschiedenen Kühen trainiert werden, da die Hunde sonst möglicherweise den Geruch individueller Kühe lernen. Ein synthetisch herstellbarer Brunstgeruch wäre daher von Nutzen. In einer weiteren Studie (**PUBLIKATION 5**) wurde deshalb untersucht, ob Hunde (N= 5), die auf natürlichen Östrus - spezifischen Geruch trainiert worden sind, auch eine Mischung aus unterschiedlichen chemischen Substanzen als Brunstgeruch erkennen. Mittels GC - MS wurden die Substanzen Squalen, 1,2-Dichloroethylene und 2-Butanone als Östrus - spezifisch identifiziert. Im weiteren Vorgehen wurden weitere fünf Hunde auf diesen synthetischen Geruch trainiert. Anschließend wurde getestet, ob diese Hunde Vaginaltupfer von Kühen im Östrus als positiv anzeigen. Die Hunde, die auf natürlichen Brunstgeruch trainiert worden waren, zeigten auch den synthetischen Geruch als Östrus - spezifisch an. Sie hatten allerdings eine geringere Genauigkeit (69 % versus 50%). Nach Training mit dem synthetischen Geruch konnten die Hunde, diesen Geruch mit einer Genauigkeit von 82,4% erkennen, zeigten aber den natürlichen Östrus – spezifischen Geruch nur mit einer Genauigkeit von 37, 6 % an. Die Ergebnisse zeigen, dass die Substanzen, die in dem synthetischen Geruch enthalten sind, für Hunde, die auf natürlichen Geruch trainiert wurden, ausreichen um Östrus - spezifischen Geruch zu erkennen. Allerdings scheint der natürliche Geruch

komplexer zu sein, so dass Hunde, die auf eine Mischung aus den drei chemisch distinkten Substanzen trainiert worden waren, nur unzureichend natürlichen Brunstgeruch erkennen. Ein Training von Brunstsuchhunden mit dieser Geruchsmischung allein erscheint daher nicht erfolgsversprechend.

Alle bisherigen Studien zur Brunsterkennung mit Hunden wurden unter Laborbedingungen mit isolierten Medien (Vaginalsekret, Urin, Speichel) durchgeführt. In der folgenden Studie (**PUBLIKATION 4**) wurden Hunde (N= 6) trainiert, Kühe in Brunst im Stall anzuzeigen. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Herausforderungen beim Training gelegt. Abschließend wurden wiederum die Sensitivität und Spezifität getestet, mit der Hunde unter diesen Bedingungen Kühe in Brunst erkennen können.

Über ein Jahr wurden die Hunde 1 x wöchentlich trainiert. Die reine Trainingszeit betrug im Durchschnitt 50 Stunden. Dieser enorme Zeitaufwand lag darin begründet, dass viel Zeit verwendet wurde, um ein ruhiges, angstfreies Suchverhalten der Hunde an den Kühen zu trainieren. Vier Hunde konnten das Training erfolgreich abschließen. Im abschließenden Test an 40 Kühen (8 im Östrus, 17 tragend, 15 im Diöstrus) zeigten die Hunde brünstige Kühe mit einer Sensitivität und Spezifität von 71,9 % und 93 % an. Es konnte also gezeigt werden, dass der Einsatz von Hunden auf dem Futtergang eine effektive Möglichkeit zur Brunsterkennung auf Milchviehbetrieben sein kann. Eine Vorauswahl geeigneter Hunde, die Kühen gegenüber angstfrei sind, könnte den Trainingsaufwand verringern.

7 Qualität wissenschaftlicher Arbeiten mit Geruchshunden

„Indem also der Schöpfer dem Hund einen besonders feinen Geruch verlieh, gab er ihm die Möglichkeit, momentane und temporäre Vereinheitlichungen seines Wesens zu erlangen, welche ihn auf eine höhere Stufe im Tierreich erhoben und ihn geeignet machten, den Menschen zu verstehen, ihm zu dienen und ein treuer Lebensbegleiter desselben zu sein“

(Giessler)

7.1 Wie werden Hunde zu Geruchshunden?

Bisher gibt es keine standardisierten Trainingsmethoden um aus Hunden Geruchshunde zu machen (Schoon, 1996; Helton, 2009). Dies konnte in einem systematischen Review aufgezeigt werden (**PUBLIKATION 2**). Daher sind die Ergebnisse verschiedener Studien mitunter nur bedingt zu vergleichen und die Beurteilung der Qualität eine Herausforderung. Das Training von Hunden, einen Geruch zu erkennen, zu suchen und anzuzeigen beinhaltet aber einige Grundelemente (**PUBLIKATION 1**). Als Erstes muss der gesuchte Geruch (Zielgeruch) dem Hund präsentiert werden. Dafür werden spezifische Geruchsträger verwendet. Der Zielgeruch soll nun eine Bedeutung für den Hund bekommen, Dafür wird der Geruch mit einer Erfahrung, meist in positiver Form durch Futter, Spielzeug oder Lob assoziiert. Es findet eine klassische Konditionierung statt (Pavlov, 1927). Dabei hat die Qualität der Belohnung einen Einfluss auf die Lerneffektivität (Walker et al., 2006; Hall et al., 2015). Im nächsten Schritt wird der Geruch durch operantes Konditionieren (Lernen am Erfolg) als Signal trainiert, das ein Anzeigeverhalten auslöst. Je nach späterer Suchaufgabe werden passive (z.B. Verharren) oder aktive Verhaltensweisen (z.B. Bellen und Scharren) gewählt (Furton und Myers, 2001; Schoon et al., 2014). Schließlich lernt der Hund, die Geruchsaufgabe im geforderten Kontext auszuführen. Das kann eine freie Suche im Gelände oder in Gebäuden sein, das systematische Absuchen von Fahrzeugen oder Koffern auf dem Fließband oder die Unterscheidung von Geruchsproben im Labor (Diskriminierung) (Porritt et al., 2015).

Die Wahl des Geruchs für das Training ist eine nicht zu unterschätzende Herausforderung. Der Trainingsgeruch sollte möglichst identisch zu dem Zielgeruch

sein (Lazarowski und Dorman, 2014). Bei der Suche nach Sprengstoffen und Drogen erfordert dies den Umgang mit gefährlichen oder illegalen Substanzen. Daher gab es Versuche, Hunde mit ungefährlichen und legalen, aber chemisch ähnlichen Substanzen zu trainieren. Bei der Herstellung von Trainingssubstanzen werden oft die häufigsten volatilen organischen Komponenten aus dem Luftüberstand der Echsubstanzen verwendet. Diese Ansätze waren allerdings wenig erfolgreich (Rice und Koziel, 2015). Es zeigte sich, dass ausgebildete Drogen- oder Sprengstoffsuchhunde (N =30) keine der künstlichen Trainingssubstanzen für Marihuana -, Heroin - oder TNT in einem Test anzeigten (Macias et al., 2008). Noch schwieriger ist es, wenn der Zielgeruch gar nicht bekannt ist oder dessen Existenz nur vermutet wird. Das trifft beim Training für Geruchshunde für Krebserkrankungen beim Menschen zu (Elliker et al., 2014), aber auch bei der Brunstanzeige bei Milchkühen (**PUBLIKATION 3**). In diesen Fällen werden den Hunden im Training Proben präsentiert, von denen angenommen wird, dass der Zielgeruch enthalten ist. Im Falle der Anzeige von Lungenkrebs sind das Atemluft - oder Urinproben von Patienten mit einer gesicherten Krebsdiagnose. Als negative Kontrollprobe wird Probenmaterial von gesunden Probanden verwendet. Die Existenz eines spezifischen Krebsgeruchs wird angenommen, wenn die Hunde die Proben von kranken und gesunden Menschen nach dem Training unterscheiden können. Es muss also exakt darauf geachtet werden, dass die Proben sich ausschließlich durch die Krebserkrankung unterscheiden. Gibt es andere systematische Unterschiede, z.B. der Entnahmeort der Proben (Krankenhaus, Praxis, Wohnung), Lebensgewohnheiten (Rauchen oder Nichtraucher) oder Geschlecht kann es zu systematischen Trainingsfehlern kommen. Tatsächlich kann nicht vorhergesagt werden, wie ein Hund einen Geruch erkennt (Göth et al., 2003). Eine Hypothese ist, dass der Hund die Gesamtheit der Geruchsstoffe in einer Probe als einen Geruch wahrnimmt. Andererseits ist aber auch möglich, dass die Hunde einzelne Geruchsstoffe aus der Stoffmischung zur Identifizierung des Geruchs verwenden. Unbekannt ist auch, ob und wie sich ein Geruch durch Hinzufügen oder Entfernen einzelner Geruchsstoffe verändert. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der Geruchssinn analytisch arbeitet und die einzelnen Geruchsstoffe in einer Mischung identifiziert. Alternativ könnte auch durch

einen neuen Geruchsstoff ein völlig anderer Geruch wahrgenommen werden, da das Stimulationsmuster der OR verändert wird (Lazarowski und Dorman, 2014).

Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit Fragestellungen zu synthetischen Geruchsmischungen für das Training von Brunstsuchhunden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine chemisch hergestellte Geruchsmischung mit Substanzen die bei der GC - MS Analyse von Vaginalsekret von Kühen im Östrus identifiziert worden sind, von Brunstsuchhunden als Östrus erkannt wurden. Umgekehrt reichte ein Training mit diesen Substanzen jedoch nicht aus, um Hunde zu trainieren, natürlichen Östrus - spezifischen Geruch zu erkennen (**PUBLIKATION 5**).

Des Weiteren wurde ein standardisiertes Geruchsmodell entwickelt. Damit haben wir geprüft, ob der Lernerfolg der Hunde sich unterscheidet, wenn Hunden der zu lernende Geruch im Training in einer Mischung oder als reiner Geruch präsentiert wird (**PUBLIKATION 8**). Dazu wurden Geruchsmischungen mit 7 Kräutern in unterschiedlicher Zusammensetzung mit oder ohne Kamille als Zielgeruch hergestellt. Fünf Hunde in zwei Gruppen wurden für diese Studie trainiert. Drei Hunde wurden mit reiner Kamille trainiert und zwei Hunde mit Geruchsmischungen, die Kamille enthielten. Hunde beider Gruppen konnten Kamille in dem vorher trainierten Kontext mit einer Sensitivität zwischen 64 % und 83 % und einer Spezifität zwischen 79 % und 88 % erkennen. Die Hunde in der Trainingsgruppe mit der Geruchsmischung benötigten mehr Trainingseinheiten für den Trainingserfolg. In einem weiteren Test wurde geprüft, ob die Hunde Kamille in dem jeweilig anderen Kontext anzeigen können. Hier bei zeigt sich, dass die Hunde, die mit Kamille in der Geruchsmischung trainiert worden waren, Kamille als Einzelsubstanz genauer anzeigten, als die Hunde die mit der isolierten Kamille trainiert worden waren und diese jetzt in der Geruchsmischung erkennen sollten. Mit dieser Studie konnten wir zeigen, dass mit beiden Trainingsansätzen (Mischung oder Einzelsubstanz) der Zielgeruch trainiert werden konnte. Ein Training mit den komplexeren Mischungen dauerte zwar länger, allerdings konnten so trainierte Hunde den Zielgeruch in anderen Kontexten besser wiederfinden.

In einem weiteren Projekt wurden Geruchsmischungen hergestellt, die Substanzen enthielten, die in der GC -MS als krebverdächtig identifiziert worden sind (**PUBLIKATION 10**). Es konnte gezeigt werden, dass Hunde, die auf Atemluft von

Patienten mit Lungenkrebst trainiert wurden, diese Substanzen in synthetischen Luftproben als positive für Krebs anzeigten.

7. 2 Kriterien für die Bewertung wissenschaftlicher Arbeiten mit Geruchshunden

Unbestritten ist, dass Hunde einen hervorragenden Geruchssinn haben. Allerdings scheinen die Leistungen von einzelnen Suchhunden überdurchschnittlich zu sein. Traditionell wurde Wissen und Erfahrungen über Arbeit mit Geruchshunden unter Hundetrainern ohne wissenschaftliche Evidenz weitergegeben. Mit den wachsenden Aufgabengebieten, ist aber der Anspruch an die Zuverlässigkeit der Hunde gestiegen (Hickey et al., 2012). In Amerika gilt die Anzeige von Geruchshunden bei der Identifizierung von mutmaßlichen Tätern, sowie Besitzern von Drogen als gerichtsfest (Furton et al., 2015). Werden Hunde in der Diagnose für Erkrankungen eingesetzt, ist eine hohe Genauigkeit besonders wichtig. Andernfalls könnten vorhandene Erkrankungen nicht erkannt oder gesunde Probanden fälschlicherweise als krank definiert werden. Im ersten Fall würde eine Behandlungsoption vergeben werden. Im zweiten Fall würden unnötige und belastende weitere Untersuchungen, unnötige Ängste oder überflüssige Therapien verursacht werden (Pirrone und Albertini, 2017). Daher kann ein gesteigertes wissenschaftliches Interesse an der Arbeit mit Geruchshunden verzeichnet werden. Bei einer Literaturrecherche mit den Schlagwörtern „scent“ und „detection“ und „dog“ konnten 2012 nur 31 englische oder deutsche Artikel zu dem Thema „Geruchshunde“ gefunden werden; 2015 dagegen waren es 87 (**PUBLIKATION 2 und 7**).

Insbesondere auf dem Gebiet der Diagnostik von Tumorerkrankungen sind nach der Veröffentlichung eines Fallberichtes in „The Lancet“ vor 30 Jahren (Williams und Pembroke, 1989) zahlreiche Arbeiten mit speziell trainierten Hunden zu diesem Thema erschienen (Edwards et al., 2017). Die Ergebnisse dieser Studien waren heterogen. Einige Arbeiten berichteten von Spezifitäten und Sensitivitäten der Erkennung durch Hunde von 78 - 98 % und 71 - 99 % (McCulloch et al., 2006; Ehmann et al., 2012), wogegen andere Autoren wesentlich geringere Sensitivitäten (3 - 71 %) und Spezifitäten (8 - 53 %) berichteten (Amundsen et al., 2014; Elliker et al., 2014). Die Komplexität von Training und anschließendem Test spiegelt sich in unterschiedlichen Ergebnissen zu Sensitivität und Spezifität wieder (**PUBLIKATION**

7) und macht eine sorgfältige Qualitätssicherung im Umgang mit Geruchshunden notwendig (Edwards et al., 2017).

Eine mangelnde Genauigkeit in der Geruchserkennung von Hunden kann viele Ursachen haben. Dieses kann unter anderem an der mangelnden Fähigkeit des individuellen Hundes liegen. Leider ist die durchschnittliche Anzahl der Hunde in den Geruchsstudien mit 4,6 so gering, dass individuelle Faktoren nicht untersucht werden konnten (**PUBLIKATION 2**). Nur eine Studie basierte auf 164 Hunden (Jezierski et al., 2014), welche vier unterschiedlichen Rassen angehörten. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Terrier eine geringere Genauigkeit als Deutsche Schäferhunde in der Sucharbeit erreichten.

Die Wahl des Trainingsgeruchs kann eine entscheidende Fehlerquelle sein, indem der Hund auf einen falschen Geruch trainiert wird (Edwards et al., 2017).

Belohnungs- und Bestrafungskonzepte (Nevin, 2012), Einfluss des Trainers (Ruffman und Morris-Trainor, 2011) und Anzahl der Trainingsproben (Edwards et al., 2017) können weitere Ursachen für unterschiedliche Studienergebnisse sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden wissenschaftliche Publikationen zum Thema Geruchshunde auf ihre wissenschaftliche Evidenz hin beurteilt. In einer systematischen Literaturrecherche wurden 14 Arbeiten zu Geruchshunden analysiert (**PUBLIKATION 2**). Es konnte gezeigt werden, dass die Beurteilung und Vergleichbarkeit der Studien durch große methodische Unterschiede und mangelnde Informationen schwierig ist. Selten werden Informationen zu Qualifikationen der Hundetrainer gegeben. Auch die Strategie bei Falschanzeigen der Hunde wird nicht genannt. Die Verblindung des Hundetrainers bzw. Versuchsleiters in den Geruchstests ist wichtig, um versteckte Hinweise durch den Menschen zu vermeiden. Solche versteckten Hinweise können die Suchergebnisse stark verfälschen (Lit et al., 2011). Dieses Kriterium wurde nur in 7 von 14 Studien beschrieben. Als weitere Einflussmöglichkeit wurde die Qualität der Testproben identifiziert. Es ist von großer Bedeutung, dass in einer Testsituation nur Geruchsproben verwendet werden, die nicht im Training eingesetzt wurden. Nach einer systematischen Literaturrecherche 2015 zum Thema Geruchshunde wurden 53 geeignete Veröffentlichungen nach ihrer Evidenz anhand einer Checkliste bewertet (**PUBLIKATION 7**). Elf dieser Arbeiten wurden als exzellent, 29 als ausreichend und 13 als mangelhaft bewertet. Eine niedrige Evidenzstufe wiesen Untersuchungen auf mit einer geringen Anzahl an Hunden, mangelnden Informationen über Trainingsablauf und/oder einer nicht

durchgeführten Verblindung während des Geruchstests, der Verwendung von bekannten Proben im Test und einer ungenügenden Diskussion möglicher Einflüsse auf die Testergebnisse. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine „best practice“ Empfehlung für Geruchstests entworfen, um die Fehlerquellen bei der Konzeption von Testverfahren für Geruchshunde minimieren zu können (**PUBLIKATION 7**).

8 Diskussion

„Keine Kritik würde mich härter treffen, wie der misstrauische Blick einer meiner Hunde!“

(James Gardner)

Die im Rahmen dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Untersuchungen konnten zeigen, dass der Einsatz von Geruchshunden in Praxis und Forschung eine valide und sinnvolle Methode zur Geruchsdiagnose ist. Voraussetzung ist allerdings die kritische Evaluierung der Aufgabenstellung und die Konzipierung und Umsetzung evidenzbasierter Testverfahren. Im Folgenden soll diskutiert werden, wie der Einsatz von Geruchshunden im Fruchtbarkeitsmanagement von Milchrindern zu bewerten ist, welche Rolle Geruchshunde in der Weiterentwicklung der Geruchsdiagnostik in der Humanmedizin spielen könnten, und schließlich welche Limitationen beim Einsatz von Geruchshunden zu beachten sind.

8.1. Einsatzmöglichkeiten von Geruchshunden auf Milchviehbetrieben

8.1.1. Der Brunstsuchhund

Gutes Fruchtbarkeitsmanagement wird durch rechtzeitiges Besamung der Kuh nach der Kalbung gewährleistet. Effektive Brunsterkennung ist dafür eine wesentliche Voraussetzung. Wie oben aufgeführt, gibt es verschiedene Methoden zur Brunsterkennung, die sich durch Arbeitsaufwand, Investition und erreichbare Brunsterkennungsraten unterscheiden.

Für die Brunsterkennung anhand eines Östrus – spezifischen Geruches kann ein Suchbulle eingesetzt werden. Die Brunsterkennungsrate eines Suchbullen liegt über 80 % (Banuvalli et al., 2015). Ein Suchbulle ist in der Regel vasektomiert und trägt ein Farbkissen an der Brust, mit dem die Kühe, die er bespringt, gekennzeichnet werden. Die Haltung von Bullen, ins besonders in der Laufstallhaltung ist allerdings mit erheblichen Gefahren verbunden. Die Zahl der in Deutschland gemeldeten Arbeitsunfälle mit Bullen lag im Jahr 2016 bei 565. Dabei starben 4 Personen (Sozialversicherung für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau, 2017).

Auch Hunde können den Östrus - spezifischen Geruch von Kühen identifizieren. Die Genauigkeit der Hunde ist mit der Brunsterkennungsrate von Suchbullen vergleichbar (Kiddy et al., 1978; Hawk et al., 1984; Kiddy et al., 1984, **PUBLIKATION**

1 und 3). In den genannten Studien wurden Proben von den Kühen entnommen und den Hunden „kuh – fern“ und unter kontrollierten Bedingungen präsentiert. Ein Brunstsuchhund in einem Rinderbetrieb wäre aber nur sinnvoll, wenn der Hund selbständig den Östrus - spezifischen Geruch „kuh – nah“ aufsucht. Die Fähigkeit, Gerüche selbständig aufzusuchen, ist ein wesentlicher Vorteil von Hunden in der Geruchsdiagnostik.

In der Annahme, dass die Hauptgeruchsquellen für Östrus - spezifischen Geruch Vaginalsekret oder Urin sind, müsste der Hund allerdings im urogenital Bereich der Kuh schnüffeln. Dabei ist die Kontamination des Hundes mit Kot und Gülle nicht zu vermeiden. Das ist hygienisch problematisch. Weiterhin würde ein Hund, der zwischen den Kühen läuft, zu Unruhe führen und eventuell aggressives Verhalten der Kühe dem Hund gegenüber auslösen. Eine mögliche Alternative ist, dass Geruchshunde auf einem milcherzeugenden Betrieb brünstige Kühe anzeigen, wenn die Kühe im Fressfanggitter fixiert sind und der Hund sich auf dem Futtergang bewegt. Deshalb war es die Hypothese einer von mir durchgeführten Untersuchungen zu prüfen, ob Kühe auch im Kopfbereich Östrus - spezifischen Geruch ausscheiden. Mögliche Ausscheidungswege sind Atemluft oder Speichel. Die Gewinnung und Lagerung von Speichelproben von brünstigen und nicht brünstigen Kühen erwies sich im Gegensatz zu Atemluftproben als praktikabel. Es konnte gezeigt werden, dass für Geruchshunde ausreichend Östrus - spezifischer Geruch im Speichel vorhanden ist (**PUBLIKATION 3**). Die Genauigkeit der Hunde in der Differenzierung von brünstigen und nicht brünstigen Kühe war allerdings geringer, als in den Arbeiten mit Vaginalsekret und Urin. Es ist anzunehmen, dass die Konzentration des Geruches im Speichel geringer ist, da der primäre Ausscheidungsort der Urogenitaltrakt ist.

Alle bisherigen Studien, die sich mit der Frage beschäftigen, ob Geruchshunde Östrus - spezifischen Geruch erkennen können, wurden in einer laborähnlichen Umgebung durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Geruchshunde Östrus – spezifischen Geruch auch in der Stallumgebung erkennen können und der brünstigen Kuh zuordnen können. In unserer Studie zeigten die Hunde in abschließenden Test brünstige Kühe mit einer Sensitivität von 71,9 % und Spezifität von 93 % an (**PUBLIKATION 4**) an. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Aktivitätsmessungen (Saint-Dizier und Chastant-Maillard, 2012), 3 x 30 min

Brunstbeobachtung (Roelofs et al., 2010) oder dem Einsatz von Suchbullen (Banuvalli et al., 2015).

Das Training der Hunde in dieser Studie hatte 14 Monaten gedauert. Die Ausbildung von Zoll -, Sprengstoff -, oder Drogen - Suchhunden dauert nach einer vorbereitenden Junghundeausbildung 16 -18 Monate (Fjellanger et al., 2002) und ist somit vergleichbar. In unserer Studie musste ein großer Teil der Trainingszeit für die Adaptation der teilnehmenden Hunde an die Stallumgebung und die Kühe aufgewendet werden, da die Hunde zu Beginn starkes Meide - Verhalten gegenüber den Kühen zeigten. Die Auswahl der Hunde für dieses Projekt erfolgte auf der Basis ihrer Verfügbarkeit. Es ist anzunehmen, dass die Ausbildungsdauer durch die Auswahl geeigneter Hunde verkürzt werden kann. Meist sind die Kriterien für die Auswahl von Geruchshunden subjektiv (Rooney et al., 2004), Brunstsuchhunde sollten keine Angst vor Kühen und eine hohe Arbeitsmotivation haben.

8.1.2. Ökonomie

Bei der Auswahl der geeigneten Brunsterkennungsmethode für einen Milchviehbetrieb spielt die Ökonomie eine große Rolle (Mottram, 2016).

Investitionskosten für ein technisches System zur Brunsterkennung anhand der Bewegungsaktivität liegen zwischen € 150 - 300 /pro Kuh (Fasching, 2017). Die Anschaffung eines Hundes liegt bei € 500 - 1000 und ca. € 500 Unterhalt pro Jahr (VDH, 2017). Hinzukommen Kosten für die Ausbildung des Hundes. Diese werden je nach Eignung des Hundes und Trainingsfähigkeiten des Hundeführers stark variieren. Derzeit gibt es noch keine Lehrgänge für die Ausbildung von Brunstsuchhunden.

Es konnte gezeigt werden, dass Geruchshunde eine mögliche Methode zur Brunsterkennung in einem Milchviehbetrieb sind. Der umfassende Vergleich unter Berücksichtigung von wirtschaftlichen und arbeitszeitlichen Aspekten, sowie der Brunsterkennungsrate von technischen Methoden, wie der Aktivitätsmessung und einem Brunstsuchhund steht noch aus.

8.1.3. Weitere Einsatzmöglichkeiten von Geruchshunden in der Rinderproduktion

Es ist bekannt, dass Hunde auf mehr als einen Geruch trainiert werden können (Williams und Johnston, 2002). Sowohl Drogenspürhunde als auch Sprengstoffhunde müssen mehr als einen Geruchsstoff anzeigen (z.B. Marihuana und Kokain) (Lazarowski und Dorman, 2014). Hat sich ein Landwirt für die Anschaffung eines Brunstsuchhundes entschieden, stellt sich die Frage, ob es weitere Einsatzgebiete für einen Geruchshund auf einem Milchviehbetrieb geben kann. Eine potentielle Anwendung ist die Diagnose von puerperalen Erkrankungen oder Stoffwechselerkrankungen. Bei der puerperalen Metritis ist z.B. die Qualität des Geruches pathognostisch und therapieentscheidend (Sheldon et al., 2006). Bei der Endometritis des Rindes konnte die Dichte der Bakterienpopulation mit der Qualität des Geruches korreliert werden (Williams et al., 2005). Untersuchungen mit einer e - nose haben gezeigt, dass Metritis mit großer Genauigkeit am Geruch erkannt werden kann. Die Übereinstimmung der Geruchsempfindung verschiedener menschlicher Untersucher war allerdings nur moderat (Sannmann et al., 2013). Es kann angenommen werden, dass Hunde darauf trainiert werden können, den Metritis - spezifischen Geruch zu erkennen. Der Einsatz eines Hundes hätte den Vorteil, dass der Hund, eine an Metritis erkrankte Kuh im Stall selbstständig aufsuchen könnte. Bei einer Diagnose mit einer e - nose müsste Vaginalsekret entnommen werden, und „kuh – fern“ untersucht werden.

Auch bei der Ketose kann Geruch pathognostisch sein. Die Ketose der Milchkuh kann die Gesundheit, Fruchtbarkeit und Produktivität negativ beeinflussen (Cooper, 2014). Die Prävalenz der klinischen Ketose in der Früh lactation liegt bei bis zu 20 %, der subklinischen Ketose sogar bei bis zu 50 % (Duffield, 2000). Die subklinische Ketose wird durch die Bestimmung von Beta-hydroxy-butyrate im Blut, bei einem Grenzwert von 1,2 mmol/l diagnostiziert (McArt et al., 2012; Ruoff et al., 2016). Durch den Überschuss an Ketonkörpern im Blut strömen Kühe mit klinischer Ketose einen Geruch von Aceton aus (Stöber und Gründer, 1990). Der Geruch von Aceton ist auch für Diabetes mellitus Patienten, während der hypoglykämischen Phasen (< 4mmol/l) bekannt. Sogenannte „Hypohunde“ oder Diabeteswarnhunde reagieren auf den Abfall an Blutglukose ihres Halters und zeigen es durch Bellen oder Pföteln an

(Seewoodhary et al., 2014). Es ist also anzunehmen, dass Hunde trainiert werden können, auch die Ketose des Rindes anzuzeigen. Es wäre zu überprüfen, ob der Hund in der Lage ist, auch subklinische Formen der Ketose am Geruch zu erkennen.

8.2. Geruchsdiagnose in der Medizin

Geruchsdiagnose, mit technischen oder biologischen Verfahren, kann ein schnelles, empfindliches und nicht – invasives Diagnoseverfahren für Tumor-, Stoffwechsel- und Infektionskrankheiten bei Menschen sein (Capelli et al., 2016).

Eine in den letzten Jahren ansteigende Anzahl von Veröffentlichungen beschreibt Studien zur Diagnose von Erkrankungen im Geruch von Atemluft, Urin und Blut (Edwards et al., 2017). Die Ergebnisse der Studien zeigen überwiegend, dass mit e-nose, GC –MS oder mit Geruchshunden verschiedene Gesundheitszustände mit großer Genauigkeit anhand spezifische Gerüche unterschieden werden können (Ulanowska et al., 2011; Wallace und Pleil, 2018). Daher ist es erstaunlich, dass nach Erscheinen der ersten Arbeit vor 50 Jahren (Cone, 1968) bis heute nur wenige Methoden von der Europäischen Arzneimittel Agentur als Diagnoseverfahren anerkannt wurden. Zu den anerkannten Methoden gehören zum Beispiel die Atemanalysen zum Alkoholkonsum von Autofahrern, die Diagnose von *Helicobacter pylori* bei Magengeschwüren oder die Erkennung von Abstoßungsreaktionen bei Herztransplantationen (Amann et al., 2014). Nach meiner Kenntnis wird derzeit keine der Methoden der Geruchserkennung zur Routinediagnostik von Erkrankungen eingesetzt.

8.2.1. Herausforderungen bei der Entwicklung einer Methode zur Geruchsdiagnose von Krebserkrankungen

In Studien zur Identifizierung eines Geruches, der für Krebs spezifisch sein könnte (Brooks et al., 2015, Pirrone und Albertini, 2017), werden Geruchsproben von Krebspatienten mit Proben von gesunden oder anderweitig erkrankten Probanden verglichen. Die Beschaffung einer ausreichenden Menge an geeigneten Proben ist eine Herausforderung. Denn für die Validität dieser Studien ist von großer Bedeutung, dass die zu untersuchenden Proben sich nur durch die Krebserkrankung unterscheiden. Ansonsten besteht die Gefahr, dass andere Kriterien, wie z.B. der Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern, alten und jungen Menschen sowie Proben aus dem Krankenhausumfeld und Proben aus niedergelassenen Praxen einen Geruch erzeugen, durch den die Proben unterschieden werden können (Jezierski et al., 2014, **PUBLIKATION 2**). Diese Gefahr besteht auch, wenn Hunde

trainiert werden, einen krebsspezifischen Geruch zu erkennen. Walczack et al. (2012) stellten fest, dass die Unterscheidung von gesunden und an Lungenkrebs erkrankten Probanden für Geruchshunde schwieriger war, wenn alle Proben im Krankenhaus genommen worden waren. Sie vermuten, dass der Geruch der Krankenhausluft ein Einflussfaktor für die Genauigkeit der Hunde war.

Der überwiegende Anteil der veröffentlichten Arbeiten, beschränkt sich Untersuchungen mit einer Methode der Geruchsdiagnostik. Eine Kombination von Geruchshunden und technischen Diagnoseverfahren wie der e – nose oder GC –MS könnte die Limitationen der jeweiligen Methode verringern.

Die Säugetiernase erkennt Geruchsstoffe mit einer kombinierten Strategie. Ein olfaktorischer Rezeptor kann an mehrere unterschiedliche Geruchsstoffe binden und ein Geruchsstoff kann von unterschiedlichen Rezeptoren gebunden werden (Firestein, 2001). Ein Makrosmatiker kann so mit den ca. 1000 funktionalen olfaktorischen Rezeptoren eine Vielzahl von Gerüchen differenzieren. Die Funktionsweise der e – nose wurde der Säugetiernase nachempfunden. Die olfaktorischen Rezeptoren wurden durch chemische Sensoren verschiedener Art simuliert. Allerdings hat eine e –nose zur Geruchsdifferenzierung statt 1000 Rezeptoren je nach Bauart nur eine verhältnismäßig kleine Anzahl von Sensoren (8 - 64). Die von den Sensoren empfangenen Signale werden durch ein künstliches neuronales Netzwerk zu einem Muster verarbeitet. Durch Mustervergleiche können so Gerüche differenziert werden. Eine e – nose muss also, ebenso wie ein Hund, auf Gerüche trainiert werden.

Mit der GC -MS können Geruchsstoffe qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Inwieweit diese Substanzen einen spezifischen Geruch erzeugen, ist daraus allerdings nicht abzuleiten (Gasparri et al., 2016). So wurden in den letzten 10 Jahren mehr als 100 Geruchsstoffe identifiziert, die vermehrt oder ausschließlich in Geruchsproben von Patienten mit Lungenkrebs vorkamen. Ob und welche dieser Substanzen einen für Lungenkrebs spezifischen Geruch erzeugen, konnte aber noch nicht ausreichend evaluiert werden (Haick et al., 2014).

In zwei Studien wurden die Analyse der GC – MS mit Geruchshunden kombiniert (Buszewski et al.,2012, **PUBLIKATION 10**). Buszewski et al. (2012) untersuchten einen Zusammenhang zwischen dem Anzeigeverhalten von Hunden bei Proben von Lungenkrebspatienten und den Ergebnissen aus der GC- MS Analyse dieser Proben. Sie konnten zeigen, das 2-Pentanon und Ethylacetat die höchste positive Korrelation ($r= 0,85$ und $r= 0,5$) mit einer Anzeige der Hunde hatten.

Wir konnten zeigen, dass Geruchshunde einen Geruch aus komplexen Geruchsmischungen als gemeinsame Komponente herausfiltern können **(PUBLIKATION 1,3 und 8)**. Mit Geruchshunden könnte getestet werden, ob Proben von Patienten unterschiedlicher Gesundheitszustände am Geruch unterschieden werden können. So kann herausgefunden werden, ob es überhaupt einen spezifischen Geruch für eine Erkrankung gibt, mit dem anschließend eine e – nose zur Erkennung von z.B. Lungenkrebs, Asthma oder Pneumonie trainiert werden könnte.

8.2.2. Geruchsdiagnose von Bakterien

Die Behandlung von bakteriell bedingten Infektionskrankheiten erfolgt meist mit antimikrobiell wirksamen Substanzen. Für eine spezifische Therapie und zur Vermeidung von Resistenzen ist die Bestimmung des kausalen Erregers nötig. Der Goldstandard für die Erregerbestimmung ist nach wie vor die Anzucht auf Nährböden (Krömker und Leimbach, 2017). Eine Geruchsdiagnose kann ohne vorherige Anzucht erfolgen, eine Zeitverzögerung von Erregerdiagnose und Therapie entfällt. Von einigen Erregern ist bereits gezeigt worden, dass sie durch einen spezifischen Geruch identifiziert werden können (Weetjens et al., 2009; Bomers et al., 2012, **PUBLIKATION 9**). In Krankenhäusern wurden Geruchshunde für die Detektion von *Clostridium difficile* eingesetzt (Bomers et al., 2012). In Angola und Mosambik ist der Einsatz von Riesenhamsterratten (*Cricetomys gambianu*) als Screeningmethode für *Mycobacterium tuberculosis* Infektionen des Menschen (Weetjens et al., 2009) erfolgreich getestet worden.

Auch in der Nutztierpraxis ist die Bestimmung des kausalen Erregers einer Infektionskrankheit wichtig für die Auswahl des wirksamen Antibiotikums. Eine der häufigsten Indikationen für den Einsatz von Antibiotika beim Milchrind ist die Mastitis (Kuipers et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass *Staphylococcus aureus*, ein häufiger Mastitiserreger, anhand seines spezifischen Geruchs mit einem kolorimetrischen Sensorarray oder mit trainierten Hunden identifiziert werden kann (Lim et al., 2016, **PUBLIKATION 9**). Die Geruchshunde wurden mit Milchproben trainiert, in die *S. aureus* in einer Konzentration von 10^8 KBE/ml inokuliert worden war. Die so trainierten Hunde wurden getestet, ob sie *S.aureus* in Milchproben von an Mastitis erkrankten Kühen erkennen. Diese Proben waren grobsinnlich stark

verändert und hatten Eiter – und Blutbeimengungen. Trotz der stark veränderten Begleitgerüche erkannten die Geruchshunde die Proben mit *S. aureus* mit einer Spezifität und Sensitivität von 93,2 % und 59,0 % (**PUBLIKATION 9**). Der Einsatz von Hunden im Labor ist impraktikabel, aber die Erkenntnis, dass Erreger durch einen spezifischen Geruch ohne vorherige Anzucht in Milchproben zu erkennen sind, lässt die Entwicklung labortauglicher Geräte, wie einer e - nose (Lim et al., 2016) vielversprechend erscheinen. Allerdings muss hier noch untersucht werden, welche Erregerkonzentrationen in der Milch tatsächlich von den Hunden oder der e – nose erkannt werden können.

8.3. Grenzen im Einsatz von Geruchshunden

Zur Kontrolle der Messgenauigkeit werden technische Geräte in der klinischen Diagnostik regelmäßig kalibriert. Üblicherweise werden dafür negative oder positive Standardproben mituntersucht.

Geruchshunde sind Lebewesen, deren Leistung durch Faktoren wie Motivation, Konzentration, Ermüdung, Hunger, Durst und äußerliche Ablenkungen negativ beeinflusst werden kann (Hackner und Pleil, 2017). Wie oben beschrieben, ist die Wahrnehmung eines Geruches eine Empfindung, die bisher nicht mit qualitativen oder quantitativen Messmethoden bestimmt werden kann (Auffarth et al., 2013). Eine Evaluierung der Leistung eines Geruchshundes ist daher eine Herausforderung (Jezierski et al., 2014).

Es kann sich zum Beispiel um einen Trainingsfehler handeln. Geruchsdetektion wird Hunden über operante Konditionierung mit positiver Verstärkung beigebracht. Dabei wird ein Verhalten trainiert, z.B. Sitzen oder Bellen, mit dem der Hund das Vorhandensein des Zielgeruches anzeigt (**PUBLIKATION 1**). Eine große Herausforderung im Geruchstraining ist, dass die Hundetrainerin nicht kontrollieren kann, welchen Geruch ein Hund aktuell wahrnimmt, wenn dieser das Anzeigeverhalten zeigt. Es ist durchaus möglich, dass der Hund auf einen zufälligen Begleitgeruch des Zielgeruchs trainiert wird. Lorenzo et al. (2003) zeigten, dass Sprengstoffhunde nicht die gesuchte Substanz, sondern ein Lösungsmittel in der Explosivstoffmischung anzeigten. Die so trainierten Hunde werden einen Sprengstoff, der dieses Lösungsmittel nicht enthält, nicht anzeigen.

Bei nachlassender Suchleistung, kann das Interesse für den Zielgeruch verloren gegangen sein, oder die Konzentration des Hundes bei der Suche eingebrochen sein

(Jeziarski et al., 2014). Geruchsproben werden üblicherweise den Hunden auf immer gleiche Weise präsentiert, z.B. in Gefäßen in einer Reihe oder Kreis. Im Gegensatz zu der freien Jagd im Feld ist diese Arbeit eintönig und die Arbeitsmotivation der Hunde kann verloren gehen (Hackner und Pleil, 2017).

Um abschätzen zu können, in welcher Verfassung sich der Hund vor einem Einsatz befindet, wurde für Sprengstoffhunde ein „universal detector calibrant“ entwickelt. Dieser Geruchstoff ist temperaturstabil mit geringer chemischer Reaktivität, kommt selten in der Umwelt vor und ist ungefährlich im Umgang (Furton und Beltz, 2017). Vor dem Einsatz kann die Leistungsbereitschaft des Hundes mit diesem Geruchstoff objektiv geprüft werden.

Bei Geruchdiagnostik von Erkrankungen mit Geruchshunden könnte man vergleichbar mit den technischen Verfahren, positive oder negative Kontrollen untersuchen, um die Zuverlässigkeit des Geruchshundes zu überprüfen. Bei technischen Diagnosemethode können entsprechende Standards verwendet werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass Hunde in der Lage sind, sich individuelle Proben zu merken (**PUBLIKATION 7**), so dass positive und negative Kontrollproben nicht mehrfach verwendet werden dürfen. Es ist eine große Herausforderung einem Geruchshund für jeden Testdurchlauf zusätzlich zu der zu untersuchenden Probe, eine unbekannt positive und negative Probe zu präsentieren (Elliker et al., 2014). Eine so große Anzahl an von Patienten mit einer gesicherten Diagnose (positiv Kontrolle) und negativen Kontrollen von gesunden Probanden oder Patienten mit anderen Erkrankungen (z.B. Asthmapatienten beim Test auf Lungenkrebs) bereit zu stellen, ist ein Problem.

9 Ausblick

*„Dem Hunde, wenn er gut erzogen, wird selbst ein weiser Mann gewogen.“
(Johann Wolfgang von Goethe)*

Die Vor – und Nachteile von drei diagnostischen Methoden von Gerüchen, Geruchshunde, e – nose und GC – MS, wurden im Rahmen dieser Arbeit diskutiert. Weiterhin wurde festgestellt, dass derzeit keine Methode zur Geruchsdiagnostik für die Erkennung einer Erkrankung routinemäßig eingesetzt wird.

Es ist gezeigt worden, dass Hunde einen spezifischen Geruch in verschiedenen Geruchsmischungen und Medien wiedererkennen können (Hackner und Pleil, 2017, **PUBLIKATION 8**). Brunstsuchhunde wurden eingesetzt, um zu testen, ob ein synthetisch hergestelltes Spray mit Substanzen, die in der GC – MS als Östrus - spezifisch identifiziert worden sind, geruchlich dem natürlichen Brunstgeruch entspricht (**PUBLIKATION 5**). Ein ähnlicher Ansatz wurde in einer Machbarkeitsstudie mit zwei auf Lungenkrebs trainierten Hunden durchgeführt (**PUBLIKATION 10**). Ziel dieser Studie war es, in der GC –MS identifizierten Substanzen einen mutmaßlichen krebsspezifischen Geruch zuzuordnen. Dafür wurde das Anzeigeverhalten der Geruchshunde getestet, wenn ihnen synthetisch hergestellte Luftproben präsentiert wurden. Die Proben in dieser Studie enthielten 1-Butanol, 2-Butanon, 2-Pentanon und Hexanal. Diese Substanzen waren zuvor mit einer GC - MS aus Atemluftproben von Lungenkrebspatienten herausgearbeitet worden und in Publikationen zu diesem Thema als spezifisch für Lungenkrebs beschrieben worden (Ulanowska et al., 2011). Bei drei von vier Proben zeigten die Hunde das Verhalten, dass sie für die Anzeige von Krebsgeruch gelernt hatten. Die Anzahl der Hunde und auch die Variation der getesteten Proben waren in dieser Studie sehr begrenzt (**PUBLIKATION 10**). Die Erkenntnisse weisen aber darauf hin, dass sich in Studien zur Identifikation eines krebsspezifischen Geruches, Geruchshunde und chemischer Analytik sinnvoll ergänzen können.

Für die Entwicklung eines Verfahrens zur Geruchsdiagnostik für den klinischen Alltag wäre somit ein mehrstufiges Vorgehen, indem alle drei Methoden eingesetzt werden, denkbar.

Im ersten Schritt würden mit der GC –MS Substanzen identifiziert werden, die für die gesuchte Erkrankung spezifisch sein könnten. Mit diesen Substanzen in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen würden synthetische Geruchsproben hergestellt. Im nächsten Schritt würden Geruchshunde trainiert, die gesuchte Erkrankung am Geruch zu erkennen. Mit diesen Hunden könnte getestet werden, welche Kombination von Substanzen in den synthetischen Proben einen Geruch erzeugen, den die Hunde als krebsspezifisch anzeigen. In einem letzten Schritt könnte mit diesem, synthetisch und daher wiederholbar herstellbarem, Geruch eine e – nose trainiert werden. Die so trainierte e – nose könnte im klinischen Alltag zur Diagnose der gesuchten Erkrankung eingesetzt werden.

Der Einsatz einer Methode zur Geruchsdiagnose im klinischen Alltag sollte eine große Zuverlässigkeit, d.h. eine hohe Wiederholbarkeit und Genauigkeit der Ergebnisse bedingen. Bisher führen Unterschiede im Versuchsaufbau, Durchführung und Auswertung von Studien zur Diagnose von Erkrankungen am Geruch zu einer geringen Vergleichbarkeit der einzelnen Arbeiten (**PUBLIKATION 7**, Ulanowska et al., 2011; Dragonieri et al., 2017). Deshalb müssen vergleichbare, standardisierte Vorgehensweisen entwickelt, evaluiert und veröffentlicht werden, um eine solide Datenbasis zu bekommen, auf der geprüft werden kann, ob der Einsatz von Geruch als diagnostische Methode für den klinischen Alltag geeignet ist.

10 Literaturverzeichnis

- Adams, D.R., Wiekamp, M.D., 1984. The canine vomeronasal organ. *Journal of anatomy* 138, 771.
- Amann, A., de Lacy Costello, B., Miekisch, W., Schubert, J., Buszewski, B., Pleil, J., Ratcliffe, N., Risby, T., 2014a. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *Journal of breath research* 8,034001.
- Amann, A., Miekisch, W., Schubert, J., Buszewski, B., Ligor, T., Jezierski, T., Pleil, J., Risby, T., 2014b. Analysis of exhaled breath for disease detection. *Annual review of analytical chemistry* 7, 455-482.
- Amundsen, T., Sundstrøm, S., Buvik, T., Gederaas, O.A., Haaverstad, R., 2014. Can dogs smell lung cancer? First study using exhaled breath and urine screening in unselected patients with suspected lung cancer. *Acta oncologica* 53, 307-315.
- Atzmüller, M., Grammer, K., 2000. Biologie des Geruchs: Die Bedeutung von Pheromonen für Verhalten und Reproduktion. *Speculum-Zeitschrift für Gynäkologie und Geburtshilfe* 18, 12-18.
- Auffarth, B., 2013. Understanding smell—the olfactory stimulus problem. *Neuroscience & biobehavioral reviews* 37, 1667-1679.
- Bajtarevic, A., Ager, C., Pienz, M., Klieber, M., Schwarz, K., Ligor, M., Ligor, T., Filipiak, W., Denz, H., Fiegl, M., 2009. Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath. *BMC cancer* 9, 348.
- Banuvalli, N., Harisha, M., Gururaj, P., Umesh, B., Gowda, B., Gopala, G., 2015. Heat (estrus) detection techniques in dairy farms-a review. *Theriogenology Insight: An international journal of reproduction in all animals* 5, 125.
- Bikov, A., Hernadi, M., Korosi, B.Z., Kunos, L., Zsamboki, G., Sutto, Z., Tarnoki, A.D., Tarnoki, D.L., Losonczy, G., Horvath, I., 2014. Expiratory flow rate, breath hold and anatomic dead space influence electronic nose ability to detect lung cancer. *BMC pulmonary medicine* 14, 202.
- Böhme, K., Morandi, S., Cremonesi, P., Fernández No, I.C., Barros-Velázquez, J., Castiglioni, B., Brasca, M., Cañas, B. and Calo-Mata, P., 2012. Characterization of *S taphylococcus aureus* strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 33, 2355-2364.

- Bomers, M.K., van Agtmael, M.A., Luik, H., van Veen, M.C., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Smulders, Y.M., 2012. Using a dog's superior olfactory sensitivity to identify *Clostridium difficile* in stools and patients: proof of principle study. *thebmj* 345, 7396.
- Brooks, S.W., Moore, D.R., Marzouk, E.B., Glenn, F.R., Hallock, R.M., 2015. Canine olfaction and electronic nose detection of volatile organic compounds in the detection of cancer: a review. *Cancer investigation* 33, 411-419.
- Browne, C., Stafford, K., Fordham, R., 2006. The use of scent-detection dogs. *Irish Veterinary journal* 59, 97-103.
- Buszewski, B., Ligor, T., Jezierski, T., Wenda-Piesik, A., Walczak, M., Rudnicka, J., 2012. Identification of volatile lung cancer markers by gas chromatography–mass spectrometry: comparison with discrimination by canines. *Analytical and bioanalytical chemistry* 404, 141-146.
- Capelli, L., Taverna, G., Bellini, A., Eusebio, L., Buffi, N., Lazzeri, M., Guazzoni, G., Bozzini, G., Seveso, M., Mandressi, A., 2016. Application and uses of electronic noses for clinical diagnosis on urine samples: A review. *Sensors* 16, 1708.
- Cone, T.E., 1968. Diagnosis and treatment: Some diseases, syndromes, and conditions associated with an unusual odor. *Pediatrics* 41, 993-995.
- Cooper, V.L., 2000. Diagnosis of neonatal pig diarrhea. *Veterinary clinics: Food animal practice* 16, 117-133.
- Copeman, W., 1964. The Evolution of Clinical Methods in Medicine. *Medical history* 8, 297.
- Craven, B.A., Neuberger, T., Paterson, E.G., Webb, A.G., Josephson, E.M., Morrison, E.E., Settles, G.S., 2007. Reconstruction and morphometric analysis of the nasal airway of the dog (*Canis familiaris*) and implications regarding olfactory airflow. *The anatomical record* 290, 1325-1340.
- Dragonieri, S., Pennazza, G., Carratu, P., Resta, O., 2017. Electronic nose technology in respiratory diseases. *Lung* 195, 157-165.
- Dravnieks, A., 1982. Odor quality: semantically generated multidimensional profiles are stable. *Science* 218, 799-801.
- Duffield, T., 2000. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Veterinary clinics of north america: Food animal practice* 16, 231-253.
- Edwards, T.L., Browne, C.M., Schoon, A., Cox, C., Poling, A., 2017. Animal olfactory detection of human diseases: Guidelines and systematic review. *Journal of veterinary behavior: Clinical applications and research* 20, 59-73.

- Ehmann, R., Boedeker, E., Friedrich, U., Sagert, J., Dippon, J., Friedel, G., Walles, T., 2012. Canine scent detection in the diagnosis of lung cancer: revisiting a puzzling phenomenon. *European respiratory journal* 39, 669-676.
- Elliker, K.R., Sommerville, B.A., Broom, D.M., Neal, D.E., Armstrong, S., Williams, H.C., 2014. Key considerations for the experimental training and evaluation of cancer odour detection dogs: lessons learnt from a double-blind, controlled trial of prostate cancer detection. *BMC urology* 14, 22.
- Eriksson, Å., Waller, K.P., Svennersten-Sjaunja, K., Haugen, J., Lundby, F., Lind, O., 2005. Detection of mastitic milk using a gas-sensor array system (electronic nose). *International dairy journal* 15, 1193-1201.
- Europäische Kommission, 2015. COMMISSION NOTICE: Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine (2015/C 299/04), Official Journal of the European Union C299/7 vom 11.09.2015
- Fasching, C., 2017. Brunsterkennung- Moderne Systeme im Vergleich, Bautagung Raumberg- Gumpenstein, 63-66.
- Firestein, S., 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211.
- Fuchs, P., Loeseken, C., Schubert, J.K., Miekisch, W., 2010. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *International journal of cancer* 126, 2663-2670.
- Furton, K.G., Beltz, K., 2017. Universal detector calibrant, Google Patents.
- Furton, K.G., Caraballo, N.I., Cerreta, M.M., Holness, H.K., 2015. Advances in the use of odour as forensic evidence through optimizing and standardizing instruments and canines. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370, 201-262.
- Furton, K.G., Myers, L.J., 2001. The scientific foundation and efficacy of the use of canines as chemical detectors for explosives. *Talanta* 54, 487-500.
- Ganda, E.K., Bisinotto, R.S., Decter, D.H., Bicalho, R.C., 2016. Evaluation of an on-farm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens associated with clinical mastitis in dairy cows. *PLoS one* 11, e155314.
- Gasparri, R., Santonico, M., Valentini, C., Sedda, G., Borri, A., Petrella, F., Maisonneuve, P., Pennazza, G., D'Amico, A., Di Natale, C., 2016. Volatile signature for the early diagnosis of lung cancer. *Journal of breath research* 10, 016007.
- Göth, A., McLean, I.G., Trevelyan, J., 2003. How do dogs detect landmines. *Mine detection dogs* 18, 195-208.
- Hackner, K., Pleil, J., 2017. Canine olfaction as an alternative to analytical instruments for disease diagnosis: Understanding 'dog personality' to achieve reproducible results. *Journal of breath research* 11, 012001.

- Haick, H., Broza, Y.Y., Mochalski, P., Ruzsanyi, V., Amann, A., 2014. Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers. *Chemical society reviews* 43, 1423-1449.
- Hall, N.J., Glenn, K., Smith, D.W., Wynne, C.D., 2015. Performance of pugs, german shepherds, and greyhounds (*Canis lupus familiaris*) on an odor-discrimination task. *Journal of comparative psychology* 129, 237.
- Harper R., Land, D., Griffiths, N.M., Bate-Smith, E., 1968. Odour qualities: A glossary of usage. *British journal of psychology* 59, 231-252.
- Hawk, H., Conley, H., Kiddy, C., 1984. Estrus-related odors in milk detected by trained dogs. *Journal of dairy science* 67, 392-397.
- Hayden, G.F., 1980. Olfactory diagnosis in medicine. *Postgraduate medicine* 67, 110-116.
- Helton, W.S., 2009. Overview of scent detection work. *Canine Ergonomics: The Science of Working Dogs*, CRC Press, Boca Raton, U.S., 83.
- Henning, H., 1916. Der Geruch. *Zeitschrift für Psychologie*, 290 -295.
- Hettinga, K., Van Valenberg, H., Lam, T., Van Hooijdonk, A., 2009. The origin of the volatile metabolites found in mastitis milk. *Veterinary microbiology* 137, 384-387.
- Hickey, S., McIlwraith, F., Bruno, R., Matthews, A., Alati, R., 2012. Drug detection dogs in Australia: More bark than bite? *Drug and alcohol review* 31, 778-783.
- Issel-Tarver, L., Rine, J., 1996. Organization and expression of canine olfactory receptor genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 10897-10902.
- Jeziński, T., 1992. The effectiveness of estrus detection in cows by a trained dog. *Animal science papers and reports* 10, 57-66.
- Jeziński, T., Adamkiewicz, E., Walczak, M., Sobczyńska, M., Górecka-Bruzda, A., Ensminger, J., Papet, E., 2014. Efficacy of drug detection by fully-trained police dogs varies by breed, training level, type of drug and search environment. *Forensic science international* 237, 112-118.
- Johnson, B.A., Leon, M., 2000. Modular representations of odorants in the glomerular layer of the rat olfactory bulb and the effects of stimulus concentration. *Journal of comparative neurology* 422, 496-509.
- Kaupp, U.B., 2010. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nature reviews neuroscience* 11, 188.
- Keller, A., Zhuang, H., Chi, Q., Vosshall, L.B., Matsunami, H., 2007. Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. *Nature* 449, 468.

- Kermen, F., Chakirian, A., Sezille, C., Joussain, P., Le Goff, G., Ziessel, A., Chastrette, M., Mandairon, N., Didier, A., Rouby, C., 2011. Molecular complexity determines the number of olfactory notes and the pleasantness of smells. *Scientific reports* 1, 206.
- Kiddy, C., Mitchell, D., Bolt, D., Hawk, H., 1978. Detection of estrus-related odors in cows by trained dogs. *Biology of reproduction* 19, 389-395.
- Kiddy, C., Mitchell, D., Hawk, H., 1984. Estrus-related odors in body fluids of dairy cows. *Journal of dairy science* 67, 388-391.
- King, J.M., Roth-Johnson, L., Dodd, D.C., Newsom, M.E., 2014. *The Necropsy Book: A guide for veterinary students, residents, clinicians, pathologists, and biological researchers*. The Internet-first university press, Cornell, U.S., 81-83.
- Krilaviciute, A., Heiss, J.A., Leja, M., Kupcinskas, J., Haick, H., Brenner, H., 2015. Detection of cancer through exhaled breath: a systematic review. *Oncotarget* 6, 38643.
- Krömker, V., Leimbach, S., 2017. Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in domestic animals* 52, 21-29.
- Krömker, V., Schmenger, A., Kock, J., Klocke, D., Paduch, J.-H., Leimbach, S., 2018. Aspekte einer modernen Mastitistherapie. *Praktischer Tierarzt* 99, 180-189.
- Kuipers, A., Koops, W., Wemmenhove, H., 2016. Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *Journal of dairy science* 99, 1632-1648.
- Kumar, K.R., Archunan, G., Jeyaraman, R., Narasimhan, S., 2000. Chemical characterization of bovine urine with special reference to oestrus. *Veterinary research communications* 24, 445-454.
- Laska, M., Shepherd, G.M., 2007. Olfactory discrimination ability of CD-1 mice for a large array of enantiomers. *Neuroscience* 144, 295-301.
- Lazarowski, L., Dorman, D.C., 2014. Explosives detection by military working dogs: Olfactory generalization from components to mixtures. *Applied animal behaviour science* 151, 84-93.
- Lim, S.H., Mix, S., Anikst, V., Budvytiene, I., Eiden, M., Churi, Y., Queralto, N., Berliner, A., Martino, R.A., Rhodes, P.A., 2016. Bacterial culture detection and identification in blood agar plates with an optoelectronic nose. *Analyst* 141, 918-925.
- Lit, L., Schweitzer, J.B., Oberbauer, A.M., 2011. Handler beliefs affect scent detection dog outcomes. *Animal cognition* 14, 387-394.
- López-Gatiús, F., Santolaria, P., Mundet, I., Yániz, J., 2005. Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology* 63, 1419-1429.

- Lorenzo, N., Wan, T., Harper, R.J., Hsu, Y.-L., Chow, M., Rose, S., Furton, K.G., 2003. Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var. familiaris* active odor signature chemicals from drugs, explosives, and humans. *Analytical and bioanalytical chemistry* 376, 1212-1224.
- Louw, L., Roux, K., Tredoux, A., Tomic, O., Naes, T., Nieuwoudt, H.I.n.H., Van Rensburg, P., 2009. Characterization of selected South African young cultivar wines using FTMIR spectroscopy, gas chromatography, and multivariate data analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 2623-2632.
- Ma, W., Liu, X., Pawliszyn, J., 2006. Analysis of human breath with micro extraction techniques and continuous monitoring of carbon dioxide concentration. *Analytical and bioanalytical chemistry* 385, 1398-1408.
- Machado, V., Bicalho, R., 2018. Prepartum application of internal teat sealant or intramammary amoxicillin on dairy heifers: Effect on udder health, survival, and performance. *Journal of dairy science* 101, 1388-1402.
- Macias, M.S., Harper, R.J., Furton, K.G., 2008. A comparison of real versus simulated contraband VOCs for reliable detector dog training utilizing SPME-GC-MS. *American laboratory* 40, 16.
- Mandl, F., 1922. Ueber den „Geruch in der klinischen Diagnostik“. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift* 48, 1280-1281.
- Mansion-de Vries, E., Lücking, J., Wenthe, N., Zinke, C., Hoedemaker, M., Krömker, V., 2016. Comparison of an evidence-based and a conventional mastitis therapy concept with regard to cure rates and antibiotic usage. *Milk Science International*. 69, 27-32.
- Mansion-de Vries, E.M., Knorr, N., Paduch, J.-H., Zinke, C., Hoedemaker, M., Krömker, V., 2014. A field study evaluation of Petrifilm™ plates as a 24-h rapid diagnostic test for clinical mastitis on a dairy farm. *Preventive veterinary medicine* 113, 620-624.
- McArt, J., Nydam, D., Oetzel, G., 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of dairy science* 95, 5056-5066.
- McCulloch, M., Jezierski, T., Broffman, M., Hubbard, A., Turner, K., Janecki, T., 2006. Diagnostic accuracy of canine scent detection in early-and late-stage lung and breast cancers. *Integrative cancer therapies* 5, 30-39.
- Moncrieff, R.W., 1961. An instrument for measuring and classifying odors. *Journal of applied physiology* 16, 742-749.

- Morrison, E.E., Costanzo, R.M., 1992. Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microscopy research and technique* 23, 49-61.
- Mottram, T., 2016. Animal board invited review: precision livestock farming for dairy cows with a focus on oestrus detection. *Animal* 10, 1575-1584.
- Mukhopadhyay, R., 2004. Don't waste your breath, *Analytical chemistry*, 273-276.
- Nevin, J.A., 2012. Resistance to extinction and behavioral momentum. *Behavioural processes* 90, 89-97.
- Niemand, H.G., Arnold-Gloor, S., 2006. *Praktikum der Hundeklinik*. Paul Parey, Berlin..
- Nordéus, K., Båge, R., Gustafsson, H., Söderquist, L., 2012. Changes in LH pulsatility profiles in dairy heifers during exposure to oestrous urine and vaginal mucus. *Reproduction in domestic animals* 47, 952-958.
- Ohloff, G., 1990. *Riechstoffe und Geruchssinn: die molekulare Welt der Düfte*. Springer-Verlag, Berlin 71.
- Pavlov, I.P., 1927. *Conditional reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*.
- Phillips, M., 1992. Breath tests in medicine. *Scientific American* 267, 74-79.
- Phillips, M., Gleeson, K., Hughes, J.M.B., Greenberg, J., Cataneo, R.N., Baker, L., McVay, W.P., 1999. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *The Lancet* 353, 1930-1933.
- Pinzón-Sánchez, C., Ruegg, P., 2011. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *Journal of dairy science* 94, 3397-3410.
- Pirrone, F., Albertini, M., 2017. Olfactory detection of cancer by trained sniffer dogs: A systematic review of the literature. *Journal of veterinary behavior: Clinical applications and research* 19, 105-117.
- Porritt, F., Shapiro, M., Waggoner, P., Mitchell, E., Thomson, T., Nicklin, S., Kacelnik, A., 2015. Performance decline by search dogs in repetitive tasks, and mitigation strategies. *Applied animal behaviour science* 166, 112-122.
- Quignon, P., Kirkness, E., Cadieu, E., Touleimat, N., Guyon, R., Renier, C., Hütte, C., André, C., Fraser, C., Galibert, F., 2003. Comparison of the canine and human olfactory receptor gene repertoires. *Genome biology* 4, 80.
- Raguso, R.A., 2008. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual review of ecology, evolution, and systematics* 39, 549-569.
- Rajanarayanan, S., Archunan, G., 2004. Occurrence of flehmen in male buffaloes (*Bubalus bubalis*) with special reference to estrus. *Theriogenology* 61, 861-866.

- Rekwot, P., Ogwu, D., Oyedipe, E., Sekoni, V., 2001. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Animal reproduction science* 65, 157-170.
- Rice, S., Koziel, J.A., 2015. Characterizing the smell of marijuana by odor impact of volatile compounds: an application of simultaneous chemical and sensory analysis. *PloS one* 10, e0144160.
- Roberson, J.R., 2012. Treatment of clinical mastitis. *Veterinary clinics: Food animal practice* 28, 271-288.
- Roelofs, J., López-Gatius, F., Hunter, R., Van Eerdenburg, F., Hanzen, C., 2010. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology* 74, 327-344.
- Rooney, N.J., Bradshaw, J.W., Almey, H., 2004. Attributes of specialist search dogs—a questionnaire survey of UK dog handlers and trainers. *Journal of forensic science* 49, 1-7.
- Rouquier, S., Blancher, A., Giorgi, D., 2000. The olfactory receptor gene repertoire in primates and mouse: evidence for reduction of the functional fraction in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 2870-2874.
- Rubin, B.D., Katz, L.C., 1999. Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 23, 499-511.
- Ruffman, T., Morris-Trainor, Z., 2011. Do dogs understand human emotional expressions? *Journal of veterinary behavior: Clinical applications and rNiemandesearch* 6, 97-98.
- Ruoff, J., Borchardt, S., Mahrt, A., Heuwieser, W., 2016. *Advances in Dairy Research*.
- Saalberg, Y., Wolff, M., 2016. VOC breath biomarkers in lung cancer. *Clinica chimica acta* 459, 5-9.
- Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S., 2012. Towards an automated detection of oestrus in dairy cattle. *Reproduction in domestic animals* 47, 1056-1061.
- Sankar, R., Archunan, G., 2004. Flehmen response in bull: role of vaginal mucus and other body fluids of bovine with special reference to estrus. *Behavioural processes* 67, 81-86.
- Sankar, R., Archunan, G., Habara, Y., 2007. Detection of oestrous-related odour in bovine (*Bos taurus*) saliva: bioassay of identified compounds. *animal* 1, 1321-1327.
- Sannmann, I., Burfeind, O., Suthar, V., Bos, A., Bruins, M., Heuwieser, W., 2013. Evaluation of odor from vaginal discharge of cows in the first 10 days after calving by olfactory cognition and an electronic device. *Journal of dairy science* 96, 5773-5779.

- Schallschmidt, K., Becker, R., Zwaka, H., Menzel, R., Johnen, D., Fischer-Tenhagen, C., Rolff, J., Nehls, I., 2015. In vitro cultured lung cancer cells are not suitable for animal-based breath biomarker detection. *Journal of breath research* 9, 027103.
- Schoon, A., Fjellanger, R., Kjeldsen, M., Goss, K.-U., 2014. Using dogs to detect hidden corrosion. *Applied animal behaviour science* 153, 43-52.
- Schoon, G., 1996. Scent identification lineups by dogs (*Canis familiaris*): experimental design and forensic application. *Applied animal behaviour science* 49, 257-267.
- Seewoodhary, J., Dacruz, T., Lloyd, E., Evans, P.J., 2014. The role of diabetic alert dogs in the management of impaired hypoglycaemia awareness. *Practical diabetes* 31, 323-325.
- Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516-1530.
- Smith, M., Smith, L., Levinson, B., 1982. The use of smell in differential diagnosis. *The Lancet* 320, 1452-1453.
- Song, G., Qin, T., Liu, H., Xu, G.-B., Pan, Y.-Y., Xiong, F.-X., Gu, K.-S., Sun, G.-P., Chen, Z.-D., 2010. Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients. *Lung cancer* 67, 227-231.
- Sosinsky, A., Glusman, G., Lancet, D., 2000. The genomic structure of human olfactory receptor genes. *Genomics* 70, 49-61.
- Sozialversicherung für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau (SVLFG), 2017. Präventionsbericht SVLFG 2016, S. 47 http://www.svlfg.de/60-service/serv13_daten/05_praeventionsbericht_2016.pdf, Zugriff am 10.12.2018
- Soudry, Y., Lemogne, C., Malinvaud, D., Consoli, S.M. and Bonfils, P., 2011. Olfactory system and emotion: common substrates. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases*, 128, 18-23.
- Spehr, M., Schwane, K., Heilmann, S., Gisselmann, G., Hummel, T., Hatt, H., 2004. Dual capacity of a human olfactory receptor. *Current biology* 14, R832-R833.
- Steele, N., Williamson, J., Thresher, R., Laven, R., Hillerton, J., 2017. Evaluating a commercial PCR assay against bacterial culture for diagnosing *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* throughout lactation. *Journal of dairy science* 100, 3816-3824.
- Stöber, M., Gründer, H., 1990. Die klinische Untersuchung des Rindes. 3. Aufl. Parey Buchverlag, Berlin und Hamburg, 102.

- Thomson, K., Rantala, M., Hautala, M., Pyörälä, S., Kaartinen, L., 2008. Cross-sectional prospective survey to study indication-based usage of antimicrobials in animals: results of use in cattle. *BMC veterinary research* 4, 15.
- Tomšič, U., Muševič, I., 2013. Detection of explosives: Dogs vs. CMOS capacitive sensors, March.
- Turner, A.P. and Magan, N., 2004. Electronic noses and disease diagnostics. *Nature reviews microbiology*, 2, 161-165.
- Ulanowska, A., Kowalkowski, T., Trawińska, E., Buszewski, B., 2011. The application of statistical methods using VOCs to identify patients with lung cancer. *Journal of breath research* 5, 046008.
- Van Eerdenburg, F., Loeffler, H., Van Vliet, J., 1996. Detection of oestrus in dairy cows: a new approach to an old problem. *Veterinary quarterly* 18, 52-54.
- Vasquez, A., Nydam, D., Capel, M., Eicker, S., Virkler, P., 2017. Clinical outcome comparison of immediate blanket treatment versus a delayed pathogen-based treatment protocol for clinical mastitis in a New York dairy herd. *Journal of dairy science* 100, 2992-3003.
- Verein deutsches Hundewesen, 2017. Finanzieller Aufwand für einen Hund. <https://www.vdh.de/welpen/zeitbedarf-und-finanzieller-aufwand>, Zugriff 10.12.2018.
- Vivrette, S.L., Sellon, D.C., Gibbons, D.S., 2000. Clinical application of a polymerase chain reaction assay in the diagnosis of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in a horse. *Journal of the american veterinary medical association* 217, 1348-1350.
- voor Dieren, G., Mekkes, D.R., 2005. Diagnosis and incidence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infections in commercial broiler chickens at slaughter. *The Veterinary record* 156, 315-317.
- Walczak, M., Jezierski, T., Górecka-Bruzda, A., Sobczyńska, M., Ensminger, J., 2012. Impact of individual training parameters and manner of taking breath odor samples on the reliability of canines as cancer screeners. *Journal of veterinary behavior: clinical applications and research* 7, 283-294.
- Walker, D.B., Walker, J.C., Cavnar, P.J., Taylor, J.L., Pickel, D.H., Hall, S.B., Suarez, J.C., 2006. Naturalistic quantification of canine olfactory sensitivity. *Applied animal behaviour science* 97, 241-254.
- Wallace, M.A.G., Pleil, J.D., 2018. Evolution of clinical and environmental health applications of exhaled breath research: review of methods and instrumentation for gas-phase, condensate, and aerosols. *Analytica chimica acta* 1024, 18-38.

- Weetjens, B., Mgone, G., Machang'u, R., Kazwala, R., Mfinanga, G., Lwilla, F., Cox, C., Jubitana, M., Kanyagha, H., Mtandu, R., 2009. African pouched rats for the detection of pulmonary tuberculosis in sputum samples. *The international journal of tuberculosis and lung disease* 13, 737-743.
- Whittle, C.L., Fakharzadeh, S., Eades, J., Preti, G., 2007. Human breath odors and their use in diagnosis. *Annals of the New York academy of sciences* 1098, 252-266.
- Williams, E.J., Fischer, D.P., Pfeiffer, D.U., England, G.C., Noakes, D.E., Dobson, H., Sheldon, I.M., 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63, 102-117.
- Williams, H., Pembroke, A., 1989. Sniffer dogs in the melanoma clinic? *The Lancet* 333, 734.
- Williams, M., Johnston, J.M., 2002. Training and maintaining the performance of dogs (*Canis familiaris*) on an increasing number of odor discriminations in a controlled setting. *Applied animal behaviour science* 78, 55-65.
- Wilson, A.D., Baietto, M., 2009. Applications and advances in electronic-nose technologies. *Sensors* 9, 5099-5148.
- Wyatt, T.D., 2010. Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *Journal of comparative physiology* 196, 685-700.

11 Zusammenstellung der eigenen publizierten wissenschaftlichen Arbeiten und Darstellung des eigenen Anteils an diesen Arbeiten

Diese Publikationen sind Bestandteil der Habilitationsschrift. Die Auflistung erfolgt chronologisch in der Reihenfolge ihres Erscheinens.

Der Anteil der beteiligten Autorinnen und Autoren an den im Anhang aufgeführten Publikationen wird anhand nachfolgender Kriterien dargestellt:

- A. Idee und Versuchsplanung
- B. Versuchsdurchführung
- C. Auswertung der Ergebnisse
- D. Erstellung des Manuskriptes

Publikation 10:

Fischer-Tenhagen, C., Johnen, D., Nehls, I., & Becker, R. (2018). A proof of concept: are detection dogs a useful tool to verify potential biomarkers for lung cancer? *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 52.

- A. Idee und Versuchsplanung: Fischer-Tenhagen, Nehls
- B. Versuchsdurchführung: Fischer-Tenhagen, Nelhs, Johnen
- C. Auswertung der Ergebnisse; Becker
- D. Erstellung des Manuskriptes: Fischer-Tenhagen, Nehls, Becker

Publikation 9:

Fischer-Tenhagen, C., Theby, V., Krömker, V., & Heuwieser, W. (2018). Detecting *Staphylococcus aureus* in milk from dairy cows using sniffer dogs. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4317-4324.

- A. Idee und Versuchsplanung: Fischer-Tenhagen, Theby, Heuwieser
- B. Versuchsdurchführung: Theby, Fischer-Tenhagen

C. Auswertung der Ergebnisse: Fischer-Tenhagen

D. Erstellung des Manuskriptes: Fischer-Tenhagen, Heuwieser

Publikation 8:

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

A. Idee und Versuchsplanung: Fischer-Tenhagen, Nehls

B. Versuchsdurchführung: Fischer-Tenhagen, Johnen, Nehls, Schallschmitt

C. Auswertung der Ergebnisse: Fischer-Tenhagen, Becker

D. Erstellung des Manuskriptes: Fischer-Tenhagen, Nehls, Heuwieser

Publikation 7:

Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2017). An approach to identify bias in scent detection dog testing. *Applied Animal Behaviour Science*, 189, 1-12.

A. Idee und Versuchsplanung: Fischer-Tenhagen, Johnen

B. Versuchsdurchführung: Johnen, Fischer-Tenhagen

C. Auswertung der Ergebnisse: Johnen

D. Erstellung des Manuskriptes: Johnen, Fischer-Tenhagen, Heuwieser

Publikation 6:

Schallschmidt, K., Becker, R., Zwaka, H., Menzel, R., Johnen, D., Fischer-Tenhagen, C., Rolff, J. & Nehls, I. (2015). In vitro cultured lung cancer cells are not suitable for animal-based breath biomarker detection. *Journal of Breath Research*, 9(2), 027103

A. Idee und Versuchsplanung: Schallschmidt, Nehls, Becker,

B. Versuchsdurchführung: Schallschmidt, Zwaka, Menzel, Johnen, Fischer-Tenhagen, Becker

C. Auswertung der Ergebnisse: Schallschmidt, Becker, Nehls

D. Erstellung des Manuskriptes: Schallschmidt, Nehls

Publikation 5:

Fischer-Tenhagen, C., Johnen, D., Le Danvic, C., Gatien, J., Salvetti, P., Tenhagen, B.-A., & Heuwieser, W. (2015). Validation of bovine oestrous-specific synthetic molecules with trained scent dogs; Similarities between natural and synthetic oestrous smell. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(1), 7-12.

- A. Idee und Versuchsplanung: Fischer-Tenhagen, LeDanvic, Heuwieser
- B. Versuchsdurchführung: Fischer-Tenhagen, Johnen, Gattien, Salvetti
- C. Auswertung der Ergebnisse: Fischer-Tenhagen, Tenhagen
- D. Erstellung des Manuskriptes: Fischer-Tenhagen, Gatien, LeDanvic, Heuwieser

Publikation 4

Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2015). How to train a dog to detect cows in heat—training and success. *Applied Animal Behaviour Science*, 171, 39-46.

- A. Idee und Versuchsplanung: Fischer-Tenhagen, Johnen, Heuwieser
- B. Versuchsdurchführung: Johnen, Fischer-Tenhagen
- C. Auswertung der Ergebnisse: Johnen, Fischer-Tenhagen
- D. Erstellung des Manuskriptes: Johnen, Fischer-Tenhagen, Heuwieser

Publikation 3:

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

- A. Idee und Versuchsplanung: Fischer-Tenhagen, Heuwieser
- B. Versuchsdurchführung: Fischer-Tenhagen,
- C. Auswertung der Ergebnisse: Fischer-Tenhagen, Tenhagen
- D. Erstellung des Manuskriptes: Fischer-Tenhagen, Heuwieser

Publikation 2:

Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2013). Canine scent detection—Fact or fiction? *Applied Animal Behaviour Science*, 148(3), 201-208.

- A. Idee und Versuchsplanung: Fischer-Tenhagen, Johnen, Heuwieser
- B. Versuchsdurchführung: Johnen, Heuwieser
- C. Auswertung der Ergebnisse: Fischer-Tenhagen, Heuwieser
- D. Erstellung des Manuskriptes: Johnen, Fischer-Tenhagen, Heuwieser,

Publikation 1:

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

- A. Idee und Versuchsplanung: Fischer-Tenhagen, Heuwieser
- B. Versuchsdurchführung: Fischer-Tenhagen, Wetterholm
- C. Auswertung der Ergebnisse: Fischer-Tenhagen, Tenhagen
- D. Erstellung des Manuskriptes: Fischer-Tenhagen, Tenhagen, Heuwieser

Danksagung

Ohne die Unterstützung unterschiedlichster Art wäre diese Habilitationsschrift nicht vollendet worden.

Prof. Wolfgang Heuwieser danke ich für die gelebte Freiheit in Forschung und Lehre. Der gegenseitige Respekt und konstruktives kritisches Hinterfragen haben mein wissenschaftliches Denken und Arbeiten wesentlich geformt und möglich gemacht.

Meiner gesamten Familie danke ich für das Selbstverständnis mir dieses Vorhaben zuzutrauen. Selbstzweifel können mit solcher mentalen Unterstützung erst gar nicht aufkommen.

Den Doktorandinnen Dorothea Johnen und Viviane Theby danke ich für ihren Einsatz beim Ausfeilen der Trainingspläne und Ausbildung der Hunde. Die unzähligen Stunden in Trainingsräumen, Kuhställen und bei Spaziergängen gehören zu den besten Erinnerungen in den Projekten.

Den schwedischen Hundetrainerkollegen Lennart Wetterholm und Kim Salomonson danke ich für die Einführung in die Geruchsarbeit mit Hunden, schwedische Lebensart und substantielle Unterstützung bei den Projekten.

Frau Prof. Irene Nehls und ihren Mitarbeitern danke ich für die großartige und produktive Kooperation in den BIOAIR Projekten. Zudem hat mich Frau Prof. Nehls, wie mehrere andere Professorinnen, außerordentlich motiviert, das Projekt Habilitation anzugreifen und zu vollenden. Danke dafür.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kollegen in der Tierklinik für Fortpflanzung. Nicht nur dass einige ihrer Hunde für die verschiedenen Projekte zur Verfügung gestellt haben, die Atmosphäre in unserer „Anstalt“ ist das beste Arbeitsumfeld, das man sich wünschen kann.

In einer Arbeit über Geruchsdiagnostik mit Hunden spielen die vierbeinigen Kollegen eine wesentliche Rolle. Ich hoffe, Menge und Art der Leckerchen konnten diesen Einsatz wettmachen. Auch wenn er diese Arbeit nicht mehr erlebt hat, danke ich meinem Hund Teddy, durch dessen Auftreten und Verhalten überhaupt erst der Eindruck entstand, ich würde etwas von Hunden verstehen.

Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

PUBLIKATION 10

Fischer-Tenhagen, C., Johnen, D., Nehls, I., & Becker, R. (2018). a Proof of concept: are Detection Dogs a Useful Tool to Verify Potential Biomarkers for lung cancer?.

Frontiers in veterinary science, 5, 52.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00052>

PUBLIKATION 9

Fischer-Tenhagen, C., Theby, V., Krömker, V., & Heuwieser, W. (2018). Detecting *Staphylococcus aureus* in milk from dairy cows using sniffer dogs. *Journal of dairy science*, 101(5), 4317-4324.

<https://doi.org/10.3168/jds.2017-14100>

PUBLIKATION 8

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

<https://doi.org/10.1093/chemse/bjx020>

Publikation 7

Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2017). An approach to identify bias in scent detection dog testing. *Applied Animal Behaviour Science*, 189, 1-12.

<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.01.001>

PUBLIKATION 6

Schallschmidt, K., Becker, R., Zwaka, H., Menzel, R., Johnen, D., Fischer-Tenhagen, C., ... & Nehls, I. (2015). In vitro cultured lung cancer cells are not suitable for animal-based breath biomarker detection. *Journal of breath research*, 9(2), 027103.

<https://doi.org/10.1088/1752-7155/9/2/027103>

PUBLIKATION 5

Fischer-Tenhagen, C., Johnen, D., Le Danvic, C., Gatién, J., Salvetti, P., Tenhagen, B. A., & Heuwieser, W. (2015). Validation of Bovine Oestrous-Specific Synthetic Molecules with Trained Scent Dogs; Similarities Between Natural and Synthetic Oestrous Smell. *Reproduction in domestic animals*, 50(1), 7-12.

<https://doi.org/10.1111/rda.12440>

PUBLIKATION 4

Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2015). How to train a dog to detect cows in heat—training and success. *Applied animal behaviour science*, 171, 39-46.

<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.019>

PUBLIKATION 3

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

<https://doi.org/10.3168/jds.2012-5683>

Publikation 2

Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2013). Canine scent detection—Fact or fiction?. *Applied Animal Behaviour Science*, 148(3-4), 201-208.

<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.09.002>

PUBLIKATION 1

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

<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.01.006>

Liste der wissenschaftlichen Publikationen und Auswahl einiger
Kongressbeiträge.

Zeitschriftenbeiträge

Fischer-Tenhagen, C., Heuwieser, W., Ladwig-Wiegard, M., & Heuwieser W. (2018):
SHORT COMMUNICATION: Is hair cortisol a potential indicator for stress caused by
chronic lameness in dairy cows? *Journal of Dairy Science.*

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

Fischer-Tenhagen, C., Johnen, D., Nehls, I., & Becker, R. (2018):
A proof of concept: Are detection dogs a useful tool to verify potential biomarkers for lung cancer?
***Frontiers in Veterinary Science*, 5, 52.**

Lange, K., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2018):
Effect of denaverine hydrochloride in heifers on the APGAR score and lactate concentration in calves.
Tierärztliche Praxis, Ausgabe G, Großtiere, Nutztiere

Fischer-Tenhagen, C., D. Johnen, R. Becker, & I. Nehls. (2017):
Odor Perception by Dogs: Evaluating Two Training Approaches for Odor Learning of Sniffer Dogs."
***Chemical Senses* 42 (5): 435-441.**

Fischer-Tenhagen, & W. Heuwieser (2017):
Geburtsmanagement bei Rindern – aktuelle Ergebnisse aus der Wissenschaft". *Der Praktische Tierarzt* 98, (4), 350–356

Fischer-Tenhagen, C., Schueller, L., & Heuwieser, W. (2017):
Improving VET SKILLS: construction of a simulator for training caesarian section in bovines. *Reproduction in*
***Domestic Animals* 52, 86-86**

Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2017):
An approach to identify bias in scent detection dog testing. *Applied Animal Behaviour Science*, 189, 1-12.

Lange, K., C. Fischer-Tenhagen, and W. Heuwieser (2017):
Predicting stage 2 of calving in Holstein-Friesian heifers." *Journal of Dairy Science* 100 (6): 4847-4856.

Rees, A., Fischer-Tenhagen, C., & Heuwieser, W. (2017):
Udder firmness as a possible indicator for clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 100 (3), 2170-2183.

Fischer-Tenhagen, Carola, Wolfgang Heuwieser, & Sebastian Arlt (2016):
Creative Learning Methods and Open Choice of Topics Facilitate Self-Directed Learning and
Motivation of Veterinary Students. *Creative Education* 7.14 : 1906

Rees, A., C. Fischer-Tenhagen, and W. Heuwieser (2016):
Effect of Heat Stress on Concentrations of Faecal Cortisol Metabolites in Dairy Cows." *Reproduction in Domestic*
***Animals* 51 (3): 392-399.**

.Johnen, D., Heuwieser,W., Fischer-Tenhagen, C. (2015):
How to train a dog to detect cows in heat: Training and success, *Applied Animal Behaviour Science* 171, 39–46

Fischer-Tenhagen, C., Johnen, D., Le Danvic, C., Gatien, J., Salvetti, P., Tenhagen, B.-
A., & Heuwieser, W. (2015):
Validation of Bovine Oestrous-Specific Synthetic

Molecules with Trained Scent Dogs; Similarities Between Natural and Synthetic Oestrous Smell. *Reproduction in Domestic Animals*, 50 (1), 7-12.

Rees, A.; Fischer-Tenhagen, C.; Heuwieser, W. (2014): Evaluation of udder firmness by palpation and a dynamometer. *Journal of Dairy Science* 97 (6), 3488–3497

Pilz, M.; Fischer-Tenhagen, C.; Grau, M.; Heuwieser, W. (2014): Behavioural and physiological assessment of stress reactions during vaginal examination in dairy cows. *Tierärztliche Praxis / Ausgabe G, Großtiere, Nutztiere*; 42 (2), 88–94

Pilz, M.; Bertulat, S.; Thiele, G.; Fischer-Tenhagen, C. (2014): Genauigkeit der rektalen Palpation zur Trächtigkeitsdiagnostik bei pathologisch veränderter Gebärmutter bei Milchkühen: ein Fallbericht. *Der Praktische Tierarzt*; 95 (5), 462–469

Johnen, D, Heuwieser W, und Fischer-Tenhagen C. (2013): Canine scent detection—Fact or fiction? *Applied Animal Behaviour Science* 148 (3): 201-208.

Pilz M, Fischer-Tenhagen C., Thiele G, Schröder S, Heuwieser W (2012): Maintenance of pregnancy in a Holstein Frisian dairy cow with an abscess of the uterine wall. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 Suppl 2, 41-42

Bertulat S, Fischer-Tenhagen C., Suthar V, Möstl E, Heuwieser W (2012): Effect of drying-off on fecal cortisol metabolites in cows with different milk yield. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 Suppl 2, 14

Bertulat S., C. Fischer-Tenhagen, V. Suthar, E. Möstl, N. Isaka, W. Heuwieser (2013): Measurement of fecal glucocorticoid metabolites and evaluation of udder characteristics to estimate stress after sudden dry-off in dairy cows with different milk yields *Journal of Dairy Science*, 96 (6), 3774-3787

Bertulat S., C. Fischer-Tenhagen, A. Werner, W. Heuwieser (2012): Technical note: Validating a dynamometer for non-invasive measuring of udder firmness. *Journal of Dairy Science*, 95, 11, 6550-6556

Pilz, M., C. Fischer-Tenhagen, G. Thiele, H. Tinge, F. Lotz, W. Heuwieser (2012): Behavioural reaction before and during vaginal examinations in dairy cows. *Applied Animal Behavior Science*, 138, 1–2, 18-27

Pilz, M., C. Fischer-Tenhagen, X. von Krueger, W. Heuwieser. Wirksamkeit einer vaginalen Progesteronsponge zur Verringerung embryonaler Verluste in der Frühträchtigkeit bei Milchkühen (2012). *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere*, 40, 1, 7-13

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

Fischer-Tenhagen C., X. von Krueger, W. Heuwieser (2012): Evaluation of vaginal discharge following treatment with a progesteron insert. *Journal of Dairy Science*, 95, 4447-4451.

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

Arlt S, Reinecke A, Drillich M, Fischer-Tenhagen C, Heuwieser W (2011): Lactatio falsa bei der Ziege - Fallsammlung und Erfahrungen mit der Amputation des Gesäuges. *Tierärztliche Praxis: Ausgabe G, Großtiere, Nutztiere*, 39, 27-32

Fischer-Tenhagen C, Thiele G, Heuwieser W, Tenhagen B-A (2010): Efficacy of a Treatment with hCG 4 days After AI to Reduce Pregnancy Losses in Lactating Dairy Cows After Synchronized Ovulation. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 468-472

Fischer, C., C. Hamblin, S. Quandt, K. Froelich (2000): Serosurvey for selected infectious disease agents in free-ranging black and white rhinoceros in Africa. *Journal of wildlife diseases* 36 (2). 316 -323

Vorträge (Auszug)

Fischer-Tenhagen, C. (2018): Können Hunde helfen die Substanzen eines krebsspezifischen Geruches zu identifizieren? 4. Symposium für Odorologie, Hochschule Rhein-Sieg 4.-6.09. 2018.

Fischer-Tenhagen, C. (2017): Wann kalbt die Kuh – Geburtserkennung. BPT- Kongress 2017, München -19.-21.10.2017.

Fischer-Tenhagen, C (2016): Follow your nose...dogs as a diagnostic tool. 8th National Reproduction and Artificial Insemination Scientific Congress, Conference Hotel of Ankara University, in Antalya, Turkey. 5-9 10. 2016. Invited speaker.

Fischer-Tenhagen, C.; Theby, V.; Heuwieser, W.; Krömker, V. (2016): Discriminating Staphylococcus aureus isolates from other common mastitis pathogens in dairy cows with scent dogs. 29th World Buatric Congress Dublin, Ireland – 03.07.-08.07.2016. In: The 29th World Buiatrics Congress, Dublin 2016 - 22 S. 243–244 ISBN: 978-1-5262-0432-5

Fischer-Tenhagen, C. (2016): Gibt es Neues rund um die Geburt? Update Fortpflanzung beim Rind, Berlin – 27.05.-28.05.2016.

Fischer-Tenhagen, C.; Johnen, D.; Heuwieser, W. (2015): Training Dogs to Detect Bovine Ovulation. Inaugural International Conference on Medical Bio-Detection Cambridge – 15.09.-16.09.2015.

Rees, A.; Fischer-Tenhagen, C.; Heuwieser, W. (2015): Euterfestigkeitsmessung als diagnostisches Mittel bei an Mastitis erkrankten Kühen. DVG-Fachgruppe "Milchhygiene" - Sachverständigenausschuss Subklinische Mastitis Hannover – 12.03.-13.03.2015.

Fischer-Tenhagen, C., Pilz M., Heuwieser, Assessment of stress responses and heart rate during vaginal examination in dairy cows. Dairy cattle welfare conference. University of Guelph, Canada, 24.-26.10 2012

Fischer-Tenhagen C, Bertulat S, Grau M, Heuwieser W: Usage of milking gloves and teat sealer on German dairy farms. Udder Health and Communication. Utrecht, Niederlande, 25.-27.10.2011 Proceedings of the international conference : Wageningen Academic Publishers, 2011. - S. 157-162 ISBN:978-90-8686-185-9

Fischer-Tenhagen C, Heuwieser W: Kuhbeobachtung mit Fokus auf Fruchtbarkeit. 4. Tierärztetagung - Tierärztliche Bestandsbetreuung-die Zukunft. Raumberg-Gumpenstein, 26.-28.05.2011 Vortragsband S. 35-36 ISBN:978-3-902559-58-6

Dissertation

Fischer, Carola. Seroepizootiologische Untersuchung von Infektionskrankheiten bei freilebenden Nashörnern in Afrika. Freie Universität Berlin, Mai 1996.