

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Über einen Zeitraum von neun Monaten (November 1998 bis Juli 1999) wurden 120 Jungmasthühner (Broiler) untersucht, die im Rahmen der amtlichen Geflügelfleischuntersuchung aufgrund der Diagnose „Aszites“, „Hepatitis“ bzw. „Tiefe Dermatitis“ beanstandet worden waren (**Tabelle 6**). Zusätzlich wurden 40 nicht beanstandete Broiler als Kontrollgruppe ausgewählt.

Tab. 6: Anzahl und Art des Probenmaterials

	Anzahl untersuchter Tierkörper	bakteriologisch untersuchte Proben
Aszites	40	Bauchhöhlenflüssigkeit, Leber, Brustmuskulatur
Hepatitis	40	Leber, Brustmuskulatur
Hepatitis-Kontrolltier	20	Leber, Brustmuskulatur
Tiefe Dermatitis	40	Haut, Brustmuskulatur
Tiefe Dermatitis-Kontrolltier	20	Haut, Brustmuskulatur

Das Untersuchungsmaterial stammte aus einem Frischgeflügelschlachtbetrieb, den mehrere Mästern beliefern. Die Broiler wurden in einem Zwei-Kammern-Yakuzzi-Brüher bei 51-52°C ca. 2½ min lang gebrüht. Die Eviszeration und die Separation der Organe vom Tierkörper erfolgten automatisch. Die Organe verblieben bis nach der amtlichen Untersuchung in separaten Organschalen in räumlicher Nähe zum Tierkörper. Die Schlachtkapazität lag zum Zeitpunkt der Untersuchung bei ca. 8000 Tieren pro Stunde. Das Alter des Schlachtgeflügels lag zwischen 35 und 38 Tagen.

3.1.2 Nährmedien und Reagenzien

Die Kultivierung und Isolierung der verschiedenen Bakterienarten erfolgte mittels Selektivnährmedien. Im Folgenden werden die jeweils verwendeten Nährmedien mit Angabe des in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG empfohlenen Herstellungsverfahrens und des Bezugsnachweises vorgestellt.

3.1.2.1 Aerobe mesophile Keimzahl

- 0,1% Natriumchlorid-Peptonwasser
L 06.00-16, Merck, Art.-Nr.: 1.07213
- 0,1% Natriumchlorid-Peptonwasser mit Agar
L 06.00-19, Merck, Art.-Nr.: 1.07213, Oxoid, Art.-Nr.: L11
- Plate Count (PC)-Agar = Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agar
L 06.00-18, Oxoid, Art.-Nr.: CM 325

3.1.2.2 *Campylobacter* spp.

- Preston-Selektivanreicherungsbouillon mit 5% defibriniertem Pferdeblut
Oxoid, Art.-Nr.: CM 67, SR 117
- Preston-Agar mit 5% defibriniertem Pferdeblut
Oxoid, Art.-Nr.: CM 689, SR 117
- Mueller-Hinton (MH)-Agar mit 5% defibriniertem Schafblut
Oxoid, CM 337

3.1.2.3 *Clostridium perfringens*

- 0,1% Natriumchlorid-Peptonwasser
L 06.00-16, Merck, Art.-Nr.: 1.07213
- 0,1% Natriumchlorid-Peptonwasser mit Agar
L 06.00-19, Merck, Art.-Nr.: 1.07213, Oxoid, Art.-Nr.: L11
- Tryptose-Sulfit-Cycloserin (TSC)-Agar
Oxoid, Art.-Nr.: CM 587, SR 88
- Diagnostischer Sensibilitätstest (DST)-Agar mit 7% defibriniertem Schafblut
L 06.00-39, Oxoid, Art.-Nr.: CM 261

3.1.2.4 Enterobakteriaseen

- 0,1% Natriumchlorid-Peptonwasser
L 06.00-16, Merck, Art.-Nr.: 1.07213
- 0,1% Natriumchlorid-Peptonwasser mit Agar
L 06.00-19, Merck, Art.-Nr.: 1.07213, Oxoid, Art.-Nr.: L11
- Violet-red Bile Dextrose (VRBD)-Agar
L 06.00-25, Merck, Art.-Nr.: 1.10275

3.1.2.5 *Escherichia coli*

- 0,1% Natriumchlorid-Peptonwasser
L 06.00-16, Merck, Art.-Nr.:1.07213
- 0,1% Natriumchlorid-Peptonwasser mit Agar
L 06.00-19, Merck, Art.-Nr.: 1.07213, Oxoid, Art.-Nr.: L11
- Fluorocult® Escherichia-Coli-Direkt (ECD)-Agar
L 06.00-36, Merck, Art.-Nr.: 1.04038
- Tryptophan-Bouillon
L 06.00-36, Merck, Art.-Nr.: 1.10694
- Kovács-Indolreagenz
Merck, Art.-Nr.: 1.09293

3.1.2.6 Koagulase-positive Staphylokokken

- 0,1% Natriumchlorid-Peptonwasser
L 06.00-16, Merck, Art.-Nr.:1.07213
- 0,1% Natriumchlorid-Peptonwasser mit Agar
L 06.00-19, Merck, Art.-Nr.: 1.07213, Oxoid, Art.-Nr.: L11
- Baird-Parker (BP)-Agar
L 06.00-21, Oxoid, Art.-Nr.: CM 275, SR 54
- Bacto Coagulase Plasma
DIFCO, Art.-Nr.: 0286-46-1
- Brain-Heart-Infusion (BHI)
L 06.00-21, Oxoid, Art.-Nr.: CM 225

3.1.2.7 Salmonellen

- gepuffertes 1% Peptonwasser
L 00.00-20, Oxoid, Art.-Nr.: CM 509
- Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung
L 00.00-20, Oxoid, Art.-Nr.: CM 669
- Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar
Merck, Art.-Nr.: 1.05287
- modif. Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose (BPLS)-Agar
L 00.00-20, Merck, Art.-Nr.: 1.10747
- Rambach®-Agar
Merck, Art.-Nr.: 1.07500
- Wasserblau-Metachromgelb-Lactose-Agar nach Gassner
Merck, Art.-Nr.: 1.01282
- Omnivalentes Testreagens "Anti-Salmonella A-67"
Sifin, Art.-Nr.: TR 1105
- Polyspezifisches Testserum "Anti-Salmonella"
Sifin, Art.-Nr.: TS 1115

3.1.2.7 Gramfärbung

- Grams Kristallviolettlösung, Merck, Art.-Nr.: 1.09218
- Lugols Lösung, Merck, Art.-Nr.: 1.09261
- Ziehl-Neelsens Karbofuchsinlösung, Merck, Art.-Nr.: 1.09215
- 96%iger Alkohol, vergällt

3.1.3 Bakterienstämme

Als Kontrollstämme wurden folgende Bakterienstämme eingesetzt:

- *Escherichia coli*: BfR-interne Stammsammlung
- *Campylobacter jejuni*: BfR-interne Stammsammlung
- *Clostridium perfringens*: BfR-interne Stammsammlung
- *Staphylococcus aureus*: aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ), Stamm-Nr. 1104
- *Streptococcus agalactiae*: aus der American Type Culture Collection (ATCC), Stamm-Nr. 27956

- Salmonella Typhimurium: BfR-interne Stammsammlung

3.1.4 Geräte und Materialien

- BBL® GasPak® Anaerobiertopf (Becton Dickinson)
- BBL® GasPak® Anaerobic System Envelopes (Becton Dickinson, 43 70304)
- BBL® GasPak® Microaerophilic System Envelopes (Becton Dickinson, 43 71034)
- Bunsenbrenner
- Brutschränke (Heraeus, Hasse, Ehret)
- Einwegplastikspritzen à 5 ml (Pharma-Plast)
- Fireboy (Tecnorama)
- Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (Brand, 74 93 21)
- Mikroskop (Zeiss)
- Mikrowelle, 1400 Watt (Panasonic)
- Reagenzglaschüttler (Heidolph)
- Stomacher 400 (Seward)
- Stomacher® 400 Bags (Seward)
- Waage (Sartorius)
- Wasserbad (Memmert)
- UV-Lampe (Desaga)

sowie laborübliche:

- Einmalhandschuhe, isolierte Transportboxen, Glasgeräte, Kühlakkus, Objektträger, Petrischalen, Pinzetten, Pipetten, Scheren

3.2 Methoden

3.2.1 Zeitliche Organisation der Probenahme und Probenaufarbeitung

In einem Zeitraum von neun Monaten wurden 21 Probenahmen auf dem Schlachthof durchgeführt. Je Probenahme wurden in der Regel ein bis vier Broiler mit Aszites, zwei Broiler mit Hepatitis, zwei bis vier Broiler mit Tiefer Dermatitis sowie zwei bis drei unbeanstandete Kontrolltiere untersucht.

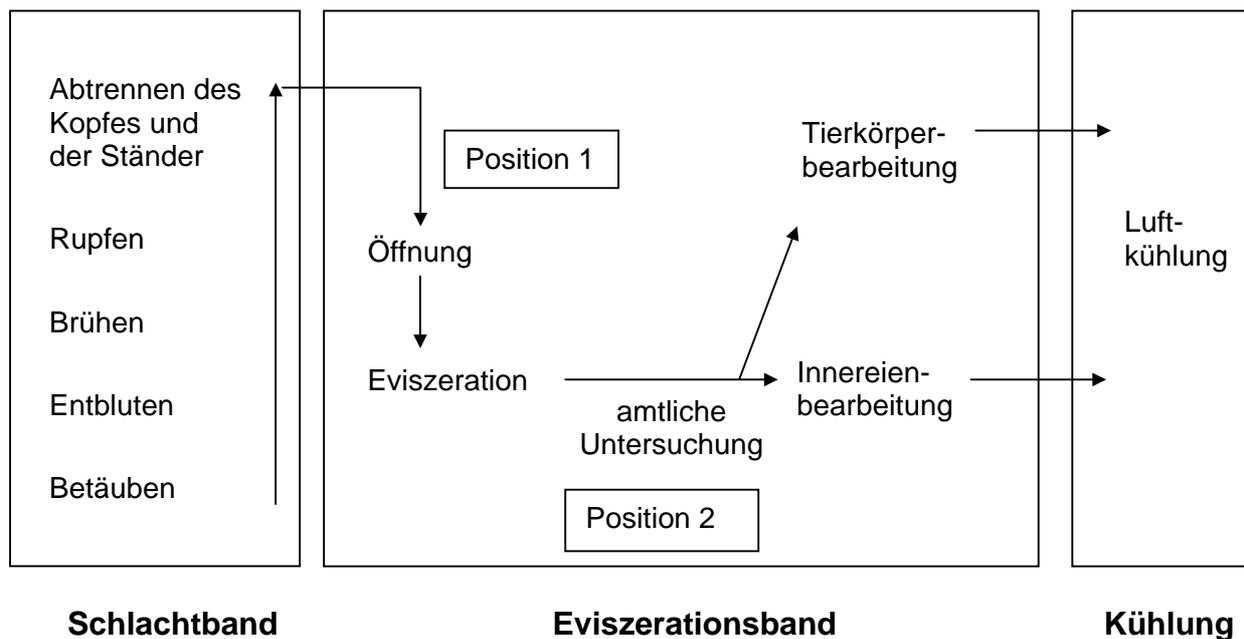
Die Probenahme auf dem Schlachthof erfolgte immer montagmorgens. Noch am selben Tag wurde mit der bakteriologischen Untersuchung der Broiler mit Aszites und Hepatitis begonnen. Dabei wurde bei den Tieren mit Aszites die Bauchhöhlenflüssigkeit und die Leber, bei den Tieren mit Hepatitis und den Kontrolltieren nur die Leber aufbereitet. Am darauffolgenden Tag wurden die Brustmuskulaturproben aller Tierkörper, die Hautproben von Broilern mit Tiefer Dermatitis sowie die Hautproben von den zugehörigen Kontrolltieren bearbeitet.

3.2.2 Probenahme

3.2.2.1 Probenahme im Schlachtbetrieb

Einen Überblick über den Schlachtprozess und die Probenahmepositionen gibt **Abbildung 2**. Die Tierkörper mit Aszites und Tiefer Dermatitis wurden dem Schlachtband vor der Eviszeration an der Position 1, die Tierkörper mit Hepatitis im Rahmen der amtlichen Geflügelfleischuntersuchung an der Position 2 entnommen. Die Tierkörper wurden in handelssterile Plastiktüten verpackt, wobei der Tierkörper, die Leber und das restliche Organpaket von Broilern mit Hepatitis bzw. von den zugehörigen Kontrolltieren separat verpackt wurden. Die Entnahme der Kontrolltiere erfolgte möglichst unmittelbar nach den beanstandeten Tierkörpern. Die eingetüteten Proben wurden in einer Euro-Norm-Kiste für ca. ein bis zwei Stunden in den Kühl-tunnel gestellt und heruntergekühlt. Anschließend wurden die Proben in mit Kühlakkus ausgestatteten Kühltaschen ins Labor befördert, wobei die Fahrtzeit ca. eine Stunde betrug. Im Labor wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei +4°C gelagert.

Abb. 2: Probenahmepositionen im Schlachtprozess



3.2.2.2 Probenentnahme im Labor

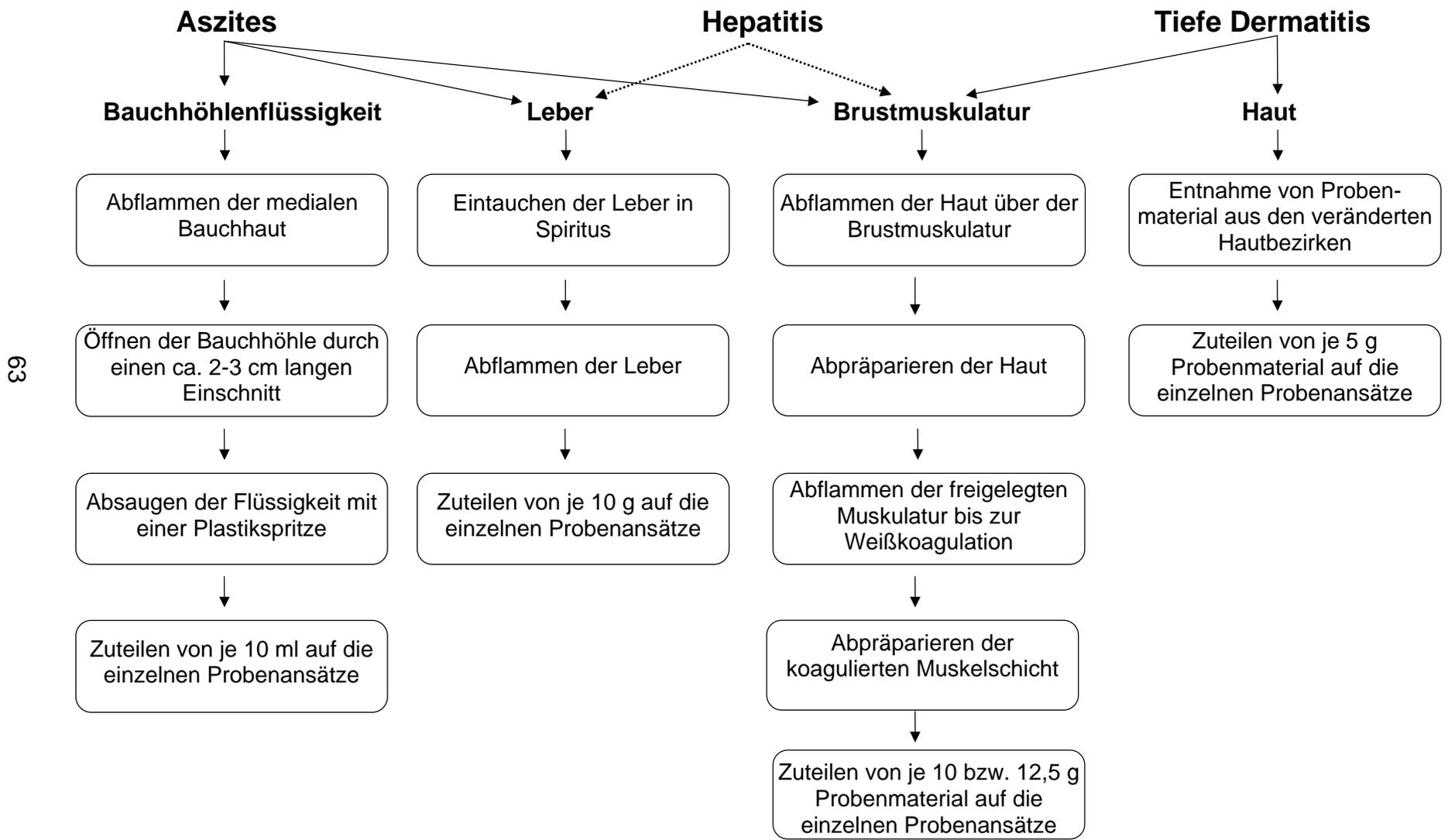
Einen Überblick über die Probenentnahme für die bakteriologischen Untersuchungen gibt **Abbildung 3**.

3.2.2.2.1 Broiler mit Aszites

Nach dem Wiegen des Tierkörpers wurde die Bauchseite des Broilers median mit einem Bunsenbrenner abgeflammt und die Bauchhöhle (Leberbauchfellsäcke) mit einer sterilen Schere ca. 2-3 cm weit eröffnet. Die Bauchhöhlenflüssigkeit wurde mit dem Konus einer 5 ml-Einwegplastikspritze wiederholt aufgesaugt, in sterile Glaskolben verbracht und bis zur weiteren Bearbeitung bei +6°C aufbewahrt. Anschließend wurde die Bauchhöhle vollständig eröffnet, die Organe entnommen, gewogen und auf pathologische Veränderungen untersucht. Aus der Leber wurde mittels einer sterilen Schere eine ca. 1,5 cm³ große Probe für die histologische Untersuchung entnommen und in 10%iges Formalin verbracht. Danach wurde die Leber kurz in ein Glas Spiritus getaucht, ca. sieben Sekunden lang mit dem Bunsenbrenner abgeflammt und auf die einzelnen Probenansätze verteilt. Der ausgenommene Tierkörper wurde in einen Plastikbeutel verpackt und bei +4°C gelagert.

Am nächsten Tag erfolgte die Probenahme aus der Brustmuskulatur. Die Haut über der Brustmuskulatur wurde mit einem Bunsenbrenner abgeflammt und mit Hilfe einer Pinzette und einer Schere abpräpariert. Die freigelegte Brustmuskulatur wurde mit dem Bunsenbrenner bis zur Weißkoagulation erhitzt und die erhitzte Muskelschicht mit einem neuen Besteck abpräpariert. Nach einem erneuten Wechsel des Besteckes wurden aus der Tiefe der Muskulatur die erforderlichen Probenmengen für die verschiedenen bakteriologischen Probenansätze entnommen. Diese wurden in sterile Stomacher-Beutel verpackt und bis zur weiteren Bearbeitung bei +6°C gelagert.

Abb. 3: Probenentnahme für die bakteriologischen Untersuchungen



3.2.2.2.2 Broiler mit Hepatitis

Die auf dem Schlachthof bereits vom Organpaket abgetrennte und separat verpackte Leber wurde gewogen, die pathologischen Veränderungen notiert und ein ca. 1,5 cm³ großes Teilstück für die histologische Untersuchung entnommen. Danach wurde sie in Spiritus getaucht, abgeflammt (s.o.) und auf die einzelnen Probenansätze verteilt. Anschließend wurden die restlichen Organe gewogen und einer sorgfältigen visuellen Untersuchung unterzogen. Schließlich wurde der ausgekommene Tierkörper in einen Plastikbeutel verpackt und bei +4°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte analog zu der unter 3.2.2.2.1 beschriebenen Vorgehensweise die Probenentnahme aus der Brustmuskulatur.

3.2.2.2.3 Broiler mit Tiefer Dermatitis

Die Tierkörper wurden gewogen und bis zum nächsten Tag bei +4°C gelagert. Aus den veränderten Hautbezirken wurde eine definierte Menge an Haut und darunterliegendem Gewebe für die bakteriologische sowie histologische Untersuchung entnommen.

Die Entnahme von Probenmaterial aus der Brustmuskulatur erfolgte nach dem unter 3.2.2.2.1 skizzierten Schema. Anschließend wurde die Leibeshöhle des Tierkörpers geöffnet, die Organe gewogen und auf pathologische Veränderungen untersucht. Aus der Leber wurde eine ca. 1,5 cm³ große Probe für die histologische Untersuchung entnommen.

3.2.2.2.4 Kontrolltiere

Die Probenentnahme für die bakteriologischen Untersuchungen erfolgte analog zu den beanstandeten Tierkörpern.

3.2.2.3 Besonderheiten der Probenentnahme für die bakteriologischen Untersuchungen

3.2.2.3.1 Dekontamination der Arbeitswerkzeuge

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass ein Eintauchen von mit Probenmaterialresten behafteten Scheren und Pinzetten in Spiritus mit anschließendem Entzünden desselben keine Keimfreiheit des Bestecks garantiert. Deshalb wurde mit mehreren

Probenahmebestecken gearbeitet. Gebrauchte Arbeitswerkzeuge wurden mehrere Minuten in Spiritus gelagert und anschließend mittels eines Bunsenbrenners ca. ein bis zwei Minuten lang erhitzt. Nach jedem Probenahmetag wurde das Besteck im Heißluftsterilisator sterilisiert. Um die Gefahr einer Kontamination des Probenmaterials durch das Untersuchungsbesteck zu minimieren, wurden für die vorgenommenen Hautschnitte vorzugsweise in Spiritus gelagerte und erhitzte Bestecke und für die Entnahme der Brustmuskulatur- und Leberproben sterile oder ebenfalls in Spiritus gelagerte und erhitzte Bestecke, mit denen ausschließlich Brustmuskulatur- bzw. Leberproben entnommen worden waren, verwendet.

3.2.2.3.2 Lagerung der entnommenen Probenmaterialien

Die Brustmuskulatur- und Hautproben wurden nach der Entnahme in sterile Stomacher-Beutel verbracht und bis zur weiteren Bearbeitung bei +6°C gelagert. Die Zugabe der Nährmedien für die verschiedenen Probenansätze erfolgte kurz vor der Durchmischung des Probenmaterials im Stomacher. Die entnommenen Leberproben wurden dagegen direkt in mit Nährmedium gefüllte Stomacher-Beutel gegeben und bis zur weiteren Bearbeitung bei +6°C gelagert, um ein eventuelles Nachwirken des Spiritus oder der beim Abflammen entstandenen Wärme zu unterbinden.

3.2.3 Pathologische Untersuchungen

Die pathologische Untersuchung umfasste die Dokumentation visuell erkennbarer Veränderungen sowie die Ermittlung der Tierkörper- und Organmassen.

Die Broiler mit Hepatitis wurden in Abhängigkeit vom Leberbefund und die Broiler mit Aszites in Abhängigkeit vom Herz- und Leberbefund in verschiedene Klassen eingruppiert. Dabei wurde bei den Herzen als entscheidendes Kriterium das Vor- bzw. Nichtvorkommen eines Herzbeutelergusses mit Rechtsherzhypertrophie und -dilatation ausgewählt und die Leber entsprechend der Ausprägung ihrer Größe, Farbe, Oberfläche, Ränder, Konsistenz sowie Kapsel- und Gewebestruktur beurteilt. Die Klassifizierung der Broiler mit Tiefer Dermatitis richtete sich nach dem Manifestationsort der Erkrankung.

3.2.4 Histologische Untersuchungen

Die Aufarbeitung sowie Auswertung der histologischen Proben wurde im Fachgebiet "Pathologie" des Bundesinstituts für Risikobewertung durchgeführt.

3.2.4.1 Aufarbeitung der histologischen Proben

Die in 10%igem Formalin fixierten Probenmaterialien wurden mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom auf eine Dicke von 3 µm geschnitten. Nach dem Aufziehen auf Objektträger wurden sie durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und mit Hämatoxylin und Eosin und/oder Giemsa-Lösung gefärbt.

3.2.4.2 Auswertung der histologischen Schnittpräparate

Die Auswertung der histologischen Schnittbilder beschränkte sich überwiegend auf die Beschreibung zellulärer Strukturen. Nachfolgend werden die im Ergebnisteil verwendeten Formulierungen kurz erläutert:

Heterophile Granulozyten

Die pseudoeosinophilen Granulozyten beim Huhn werden auch als heterophile Granulozyten bezeichnet und stellen das Pendant zu den neutrophilen Granulozyten der Säugetiere dar (WEISS 1990a). Neben einem dichten, segmentierten Kern weisen sie zahlreiche längliche eosinophile Granula auf (**Abbildung 4**).

Unreife heterophile Granulozyten (Myelozyten)

Neben ausdifferenzierten heterophilen Granulozyten wurden in vielen Leberpräparaten Ansammlungen von unreifen Vorläuferzellen gefunden (**Abbildung 5**). Diese Zellen wiesen einen großen, runden oder ovalen, zumeist unsegmentierten Kern mit lockerer Chromatinstruktur und variablen Kernkörperchen sowie zahlreiche eosinophile Granula auf (**Abbildung 6**).

Aufgrund der vorliegenden Morphologie scheinen die beschriebenen Zellen verschiedene Reifestadien von Myelozyten zu repräsentieren. In den vorliegenden Untersuchungen werden sie nachfolgend unter dem Begriff „Myelozyten“ subsumiert.

Granulom

Die heterophilen Granulozyten des Huhnes enthalten im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten der Säugetiere einen geringeren Gehalt an proteolytischen Enzymen (WEISS 1990b). Anstelle von Abszessen mit flüssigem Eiter werden beim Huhn deshalb überwiegend granulomatöse Entzündungsherde gefunden. Das mikroskopische Bild eines Granuloms ist charakterisiert durch eine zentrale Nekrose, die je nach Alter und Ursache der Gewebsschädigung von unterschiedlichen Entzündungszellen (i.d.R. überwiegend heterophile Granulozyten und mehrkernige Riesenzellen) sowie einer Bindegewebsschicht abgegrenzt wird (**Abbildung 7**).

Nekrosen

Bei den im Leberparenchym von Broilern mit Aszites bzw. Hepatitis beobachteten Nekroseherden handelte es sich überwiegend um Koagulationsnekrosen, die von heterophilen Granulozyten infiltriert waren und bereits Reparationsprozesse in Form von Bindegewebszubildungen aufwiesen (**Abbildung 8**).

Klein-/großtropfige Verfettung

Die lichtmikroskopisch erkennbare Ansammlung von Lipidtropfen in Leberzellen gilt im Allgemeinen als Zeichen für Störungen im Lipidstoffwechsel der Zelle (DÄMMRICH und LOPPNOW 1990a). Je nach Ursache der Störung unterscheidet man eine alimentäre, metabolische, hypoxische bzw. toxische Leberverfettung. Häufig stellt die kleintropfige Verfettung die Vorstufe der großtropfigen Verfettung dar. Bei toxischer Leberverfettung ist allerdings eine massive kleintropfige Verfettung charakteristisch.

In den vorliegenden histologischen Schnittbildern waren aufgrund der gewählten Aufarbeitungs- und Färbetechnik verfettete Leberzellen anhand der optisch leeren Zytoplasmavakuolen zu erkennen (**Abbildung 9**)

Perihepatitis

In den untersuchten Leberpräparaten wurden überwiegend fibrosierende Entzündungserscheinungen der Leberkapsel beobachtet (**Abbildung 10**).

Abb. 4: Heterophile Granulozyten im Hautgewebe eines Broilers mit Tiefer Dermatitis (HE-Färbung)

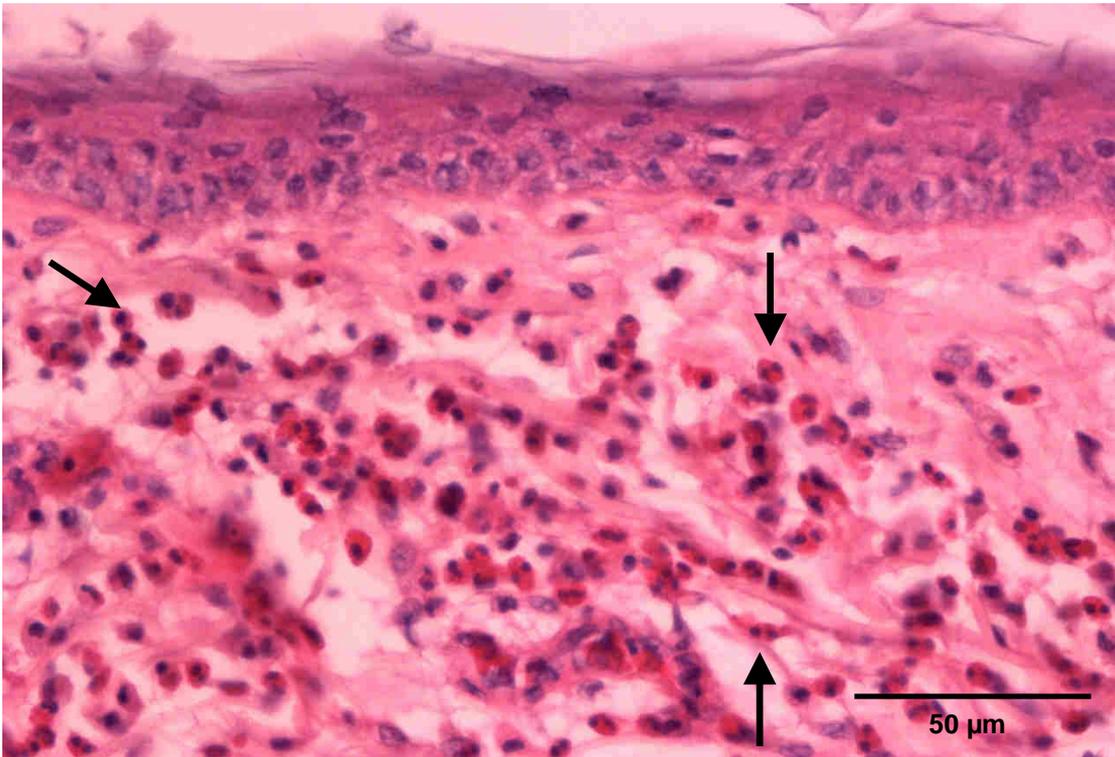


Abb. 5: Ansammlungen von Myelozyten im Leberparenchym eines Broilers mit Hepatitis (Übersichtsaufnahme, Giemsa-Hämatoxylin-Färbung)

Myelozyten-Bezirke sind an der dunkelroten Färbung zu erkennen.

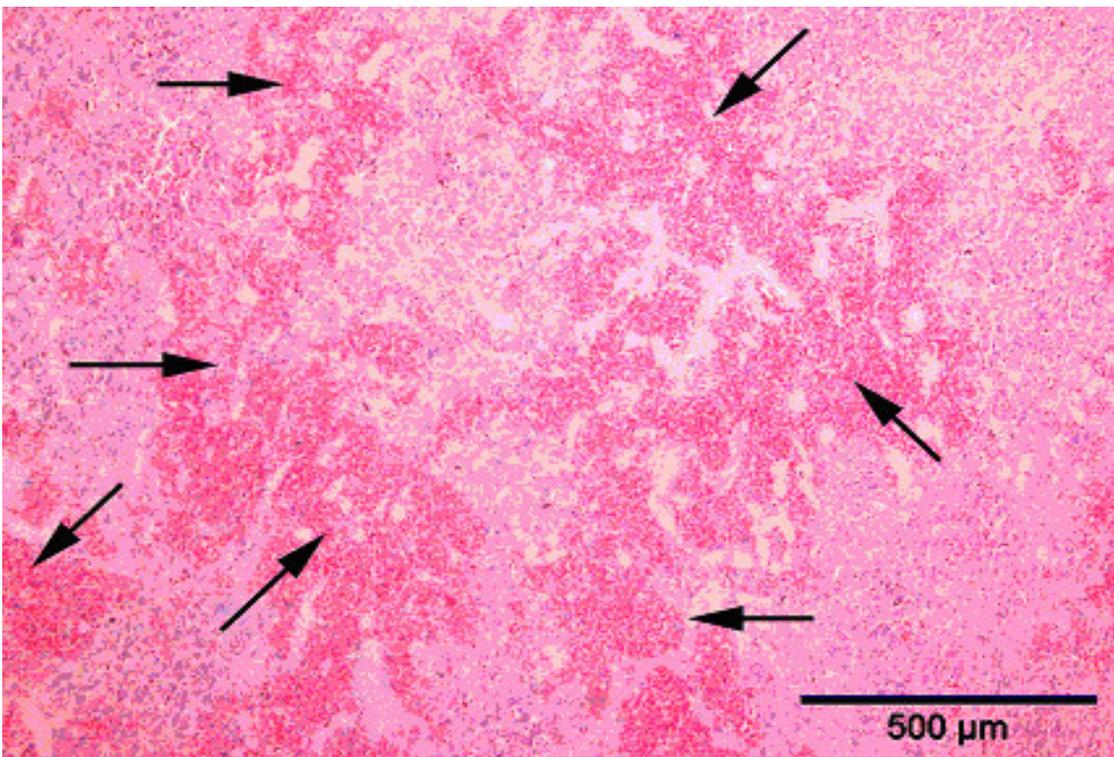


Abb. 6: Myelozyten im Leberparenchym eines Broilers mit Hepatitis
(Detailansicht, HE-Färbung)

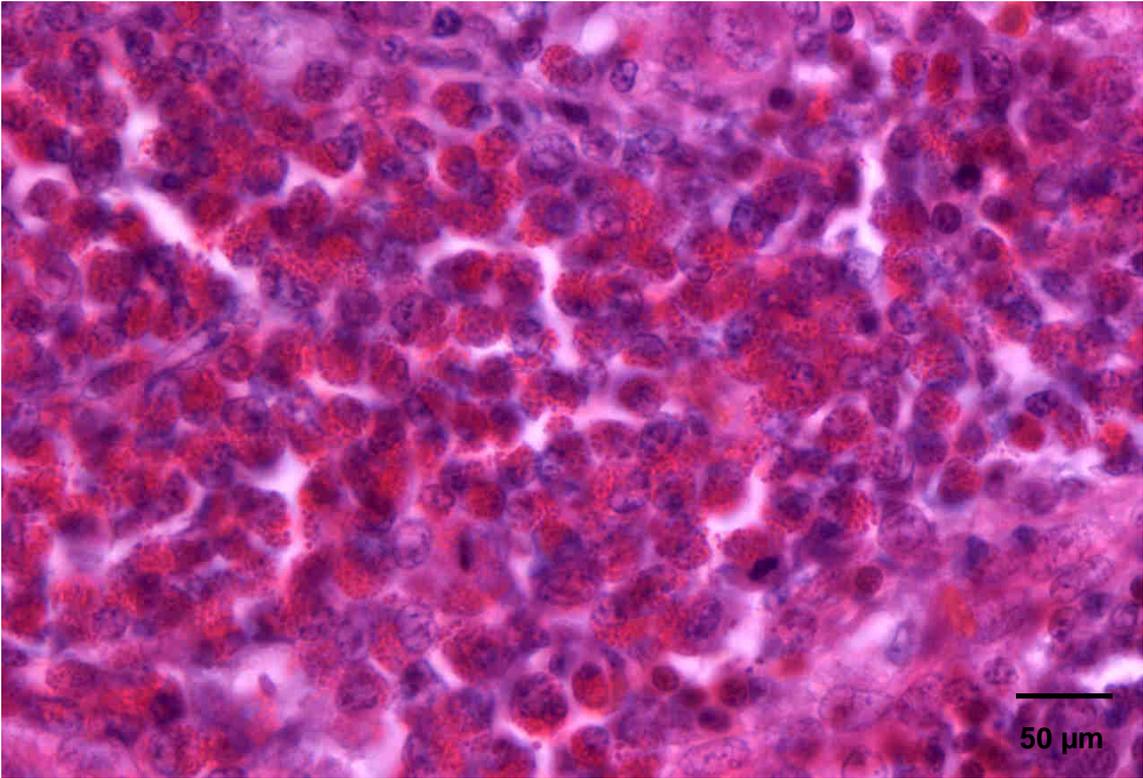


Abb. 7: Granulom im Leberparenchym eines Broilers mit Aszites
(HE-Färbung)

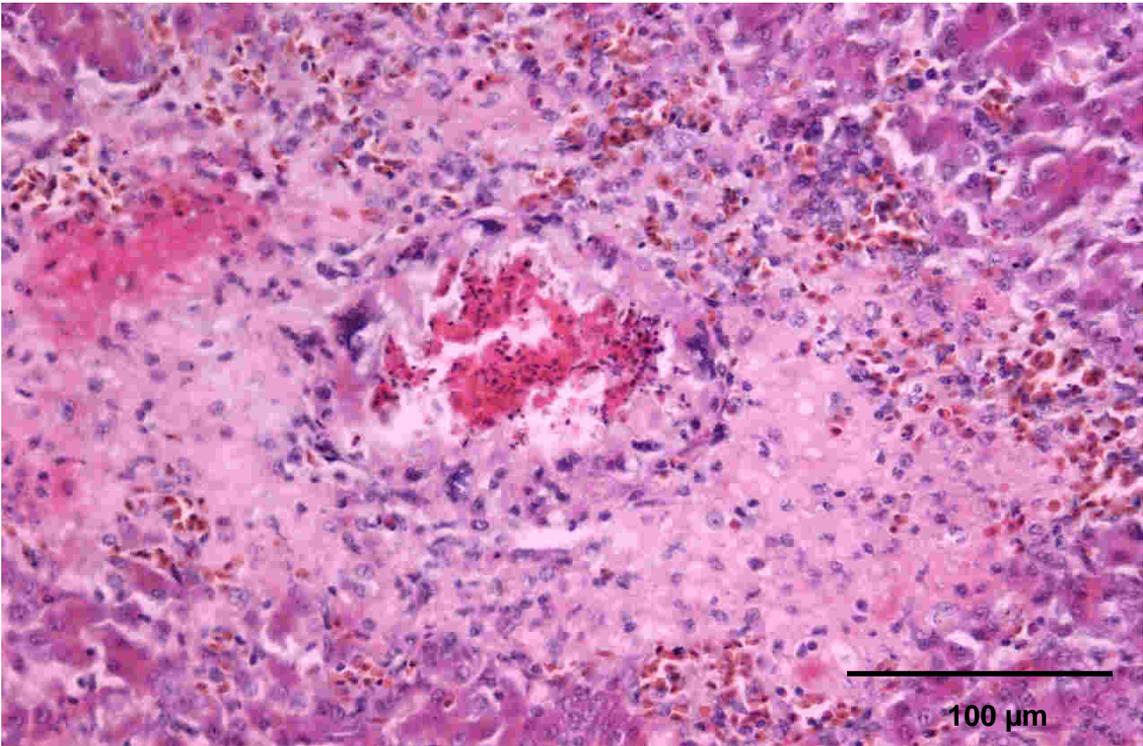


Abb. 8: Mit heterophilen Granulozyten infiltrierte Nekroseherde im Leberparenchym eines Broilers mit Hepatitis (HE-Färbung)

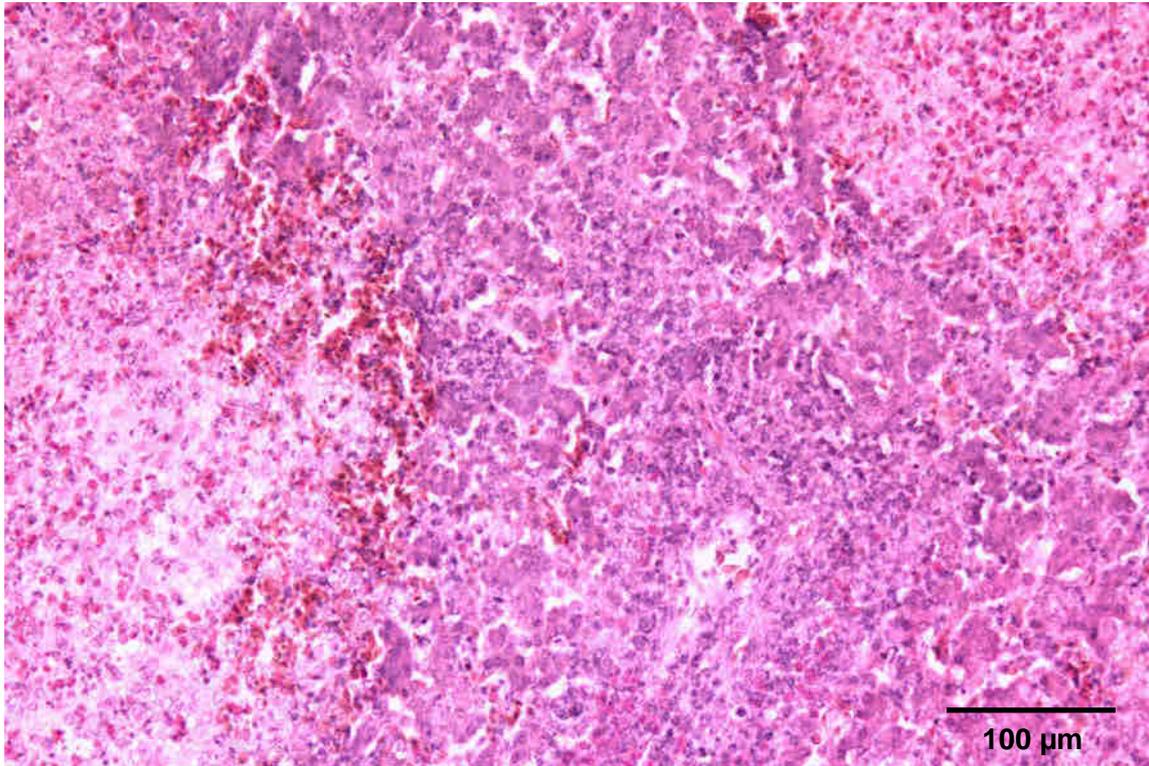


Abb. 9: Klein- bis großtropfige Leberzellverfettung bei einem Broiler mit Tiefer Dermatitis (HE-Färbung)

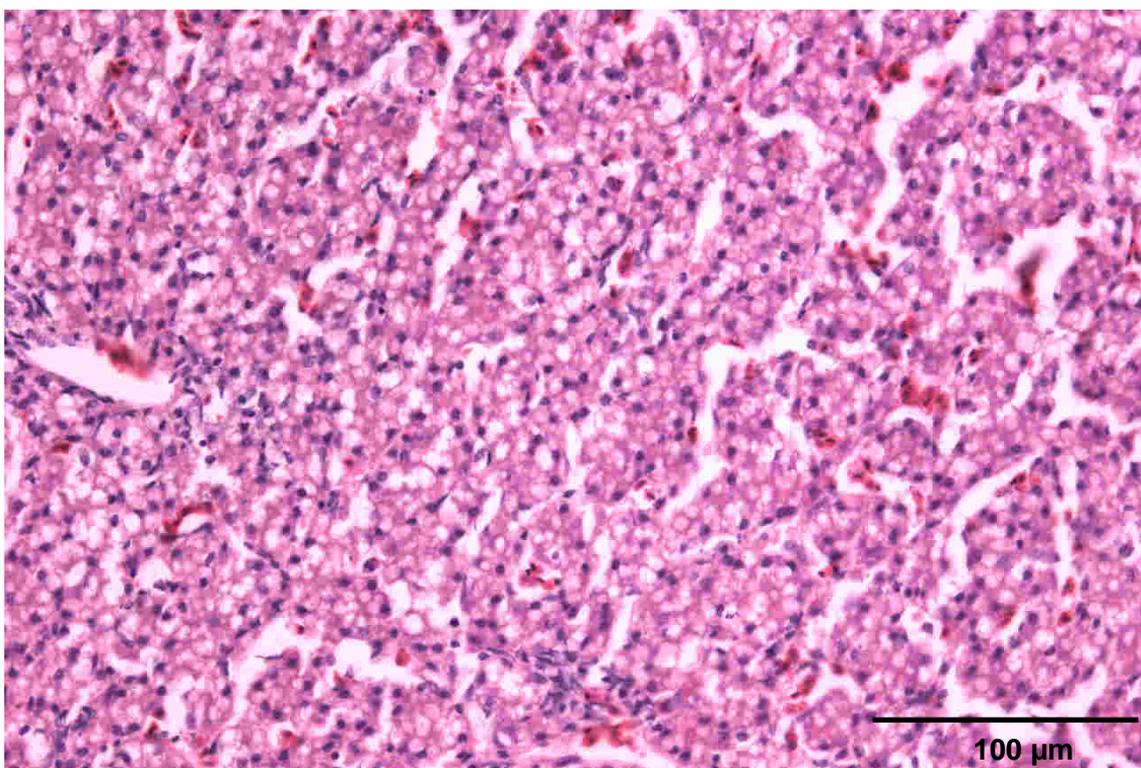
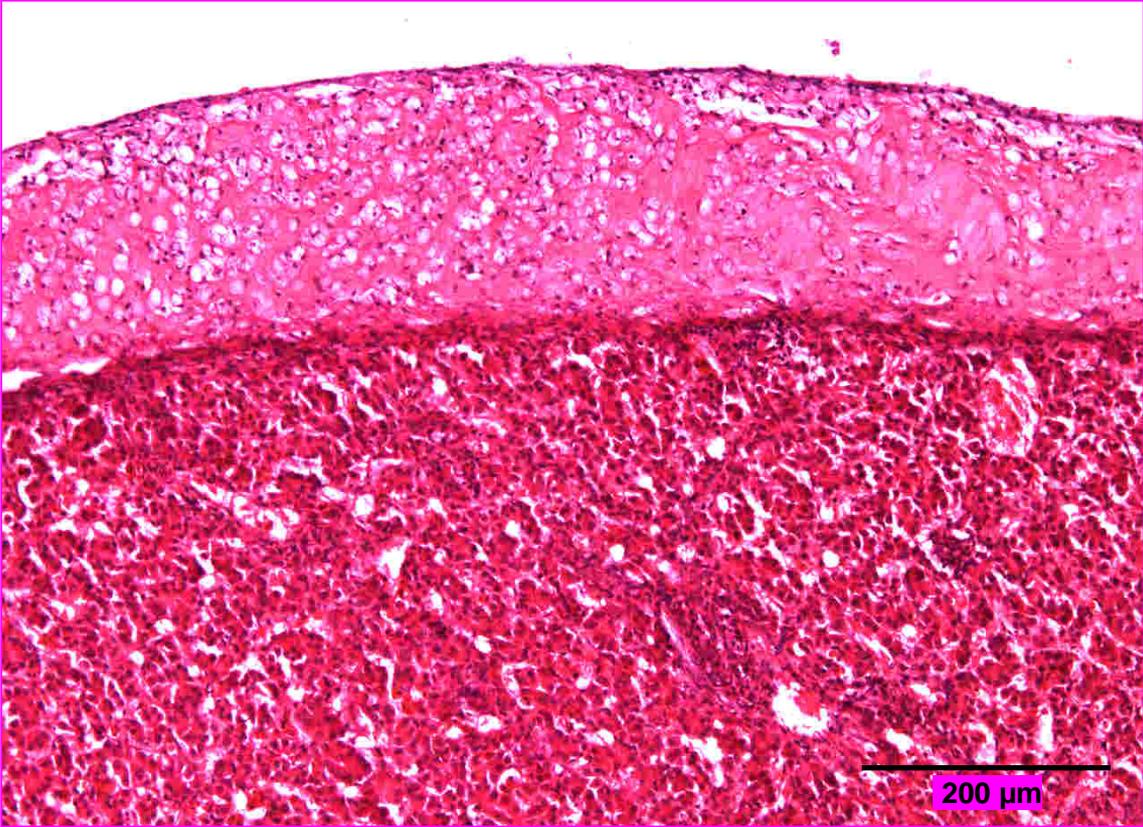


Abb. 10: Fibrosierende Perihepatitis bei einem Broiler mit Aszites (HE-Färbung)



3.2.5 Bakteriologische Untersuchungen

3.2.5.1 Aufarbeitung der Proben

Einen Überblick über die Aufarbeitung der Proben gibt **Abbildung 11**. Aus den unterschiedlichen Probenmaterialien wurden jeweils drei Probenansätze hergestellt. Der

- Probenansatz A wurde für die Ermittlung der aeroben mesophilen Keimzahl und für den Nachweis von Enterobakteriaceen, *Escherichia (E.) coli*, Koagulase-positive Staphylokokken und *Clostridium perfringens*, der
- Probenansatz B für den Nachweis von Salmonellen und der
- Probenansatz C für die Isolierung von *Campylobacter* spp. verwendet.

a) Herstellung des Probenansatzes A:

Die entnommene Bauchhöhlenflüssigkeit (10 ml) wurde 1:10 mit (90 ml) 0,1%igem Natriumchlorid-Peptonwasser verdünnt. Der entnommenen Leberprobe (10 g) wurde 90 ml, der Brustmuskulaturprobe (10 g) ebenfalls 90 ml und der Hautprobe (5 g) 45 ml 0,1%iges Natriumchlorid-Peptonwasser hinzugefügt. Anschließend wurde das Probenmaterial jeweils für eine Minute im Stomacher (Stufe normal) homogenisiert und in sterile Glaskolben überführt. Aus dieser Erstverdünnung wurde dann eine dezimale Verdünnungsreihe bis 10^{-4} bzw. 10^{-6} (Hautproben) unter Verwendung von mit Agar versetztem 0,1%igem Natriumchlorid-Peptonwasser erstellt.

b) Herstellung des Probenansatzes B:

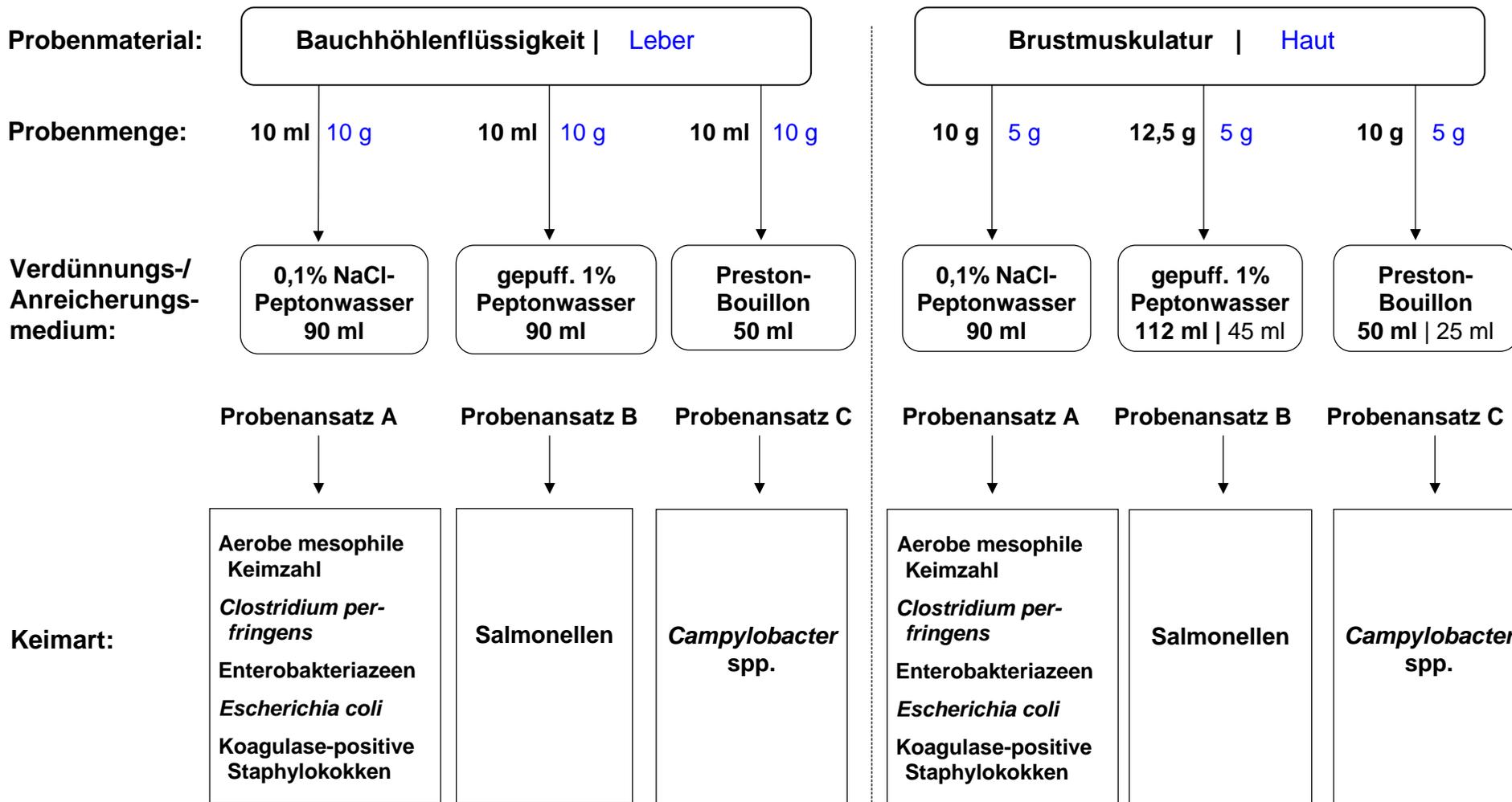
Die entnommene Bauchhöhlenflüssigkeit (10 ml) wurde 1:10 mit (90 ml) gepuffertem 1%igem Peptonwasser verdünnt. Der entnommenen Leberprobe (10 g) wurde 90 ml, der Brustmuskulaturprobe (12,5 g) 112 ml und der Hautprobe (5 g) 45 ml gepuffertes 0,1%iges Peptonwasser hinzugefügt. Anschließend wurde das Probenmaterial jeweils für eine Minute im Stomacher (Stufe normal) homogenisiert und in sterile Glaskolben überführt.

c) Herstellung des Probenansatzes C:

Der entnommenen Bauchhöhlenflüssigkeit (10 ml), der Leberprobe (10 g) und der Brustmuskulaturprobe (10 g) wurden jeweils 50 ml, der Hautprobe (5 g) 25 ml

Preston-Anreicherungsbouillon hinzugesetzt. Anschließend wurde das Probenmaterial jeweils ca. 20 Sekunden lang von Hand im Stomacherbeutel zerkleinert und der gesamte Inhalt des Beutels in einen sterilen Glaskolben verbracht.

Abb. 11: Zusammensetzung der Probenansätze A-C



3.2.5.2 Isolierung und Differenzierung der einzelnen Keimarten

3.2.5.2.1 Aerobe mesophile Keimzahl

Die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 06.00-19, welches in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG aufgeführt ist.

Es wurden jeweils im Doppelansatz Plate Count (PC)-Agarplatten in vier bzw. sechs (Hautproben) Sektoren aufgeteilt und mit jeweils 0,05 ml des Probenansatzes A und seiner weiteren Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 30°C aerob bebrütet. Nach 72 ± 4 Stunden wurden die sichtbaren Kolonien ausgezählt und die aerobe mesophile Keimzahl pro g bzw. ml der untersuchten Probe berechnet.

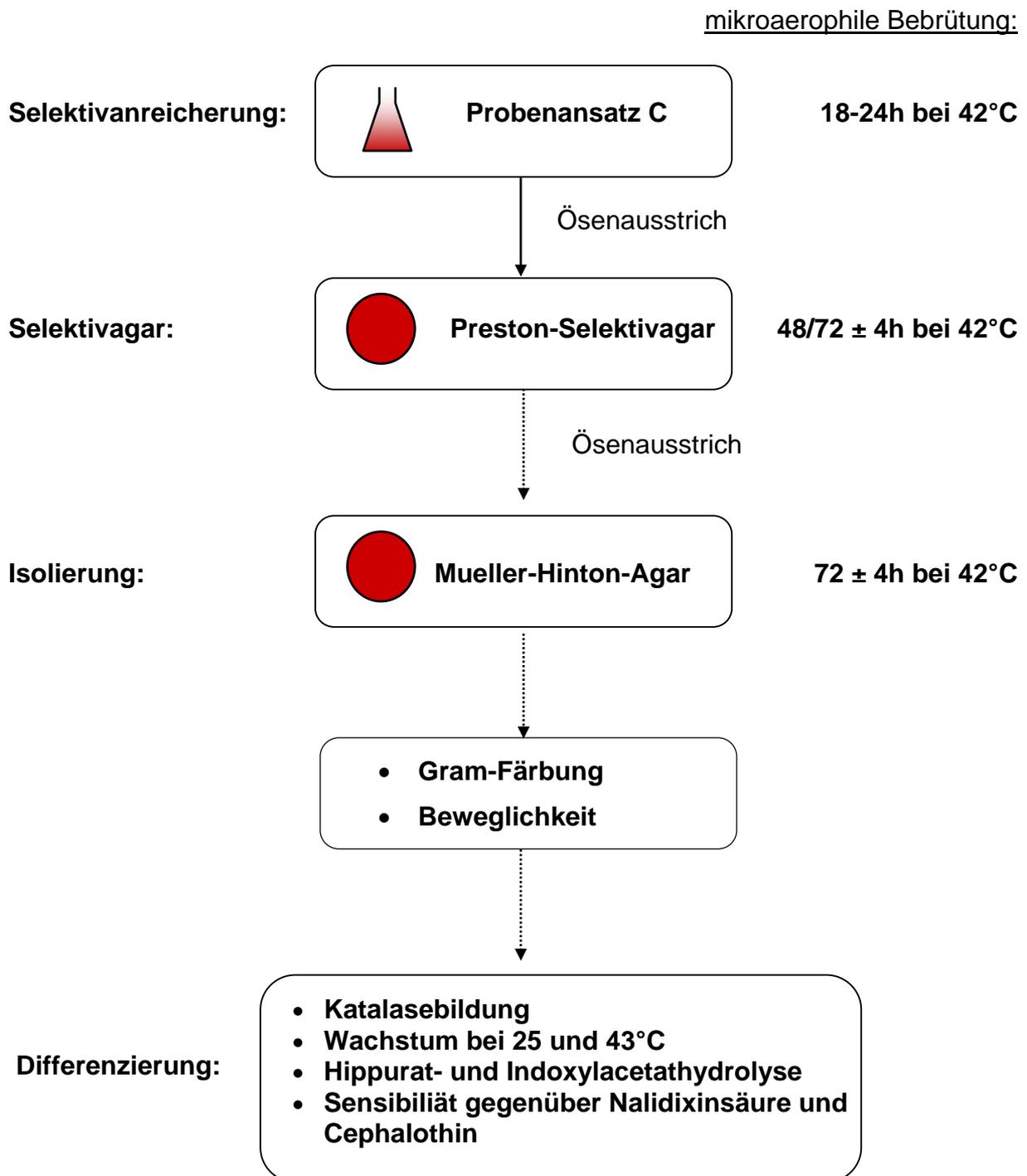
3.2.5.2.2 *Campylobacter* spp. (Abbildung 12)

Die Glaskolben mit dem Probenansatz C wurden locker mit Aluminiumfolie abgedeckt und bei 42°C unter mikroaerophilen Bedingungen bebrütet. Nach 18-24 Stunden wurde eine Impföse des Ansatzes auf Preston-Agar ausgestrichen und bei 42°C mikroaerophil bebrütet. Die Bauchhöhlenflüssigkeit- und Leberproben aus dem "Montag"-Ansatz wurden 72 ± 4 Stunden und die Haut- und Brustmuskulaturproben aus dem "Dienstag"-Ansatz 48 ± 4 Stunden lang bebrütet. Verdächtige Kolonien wurden auf Mueller-Hinton-Schafblut-Agar überimpft und für 72 ± 4 Stunden bei 42°C mikroaerophil kultiviert. Typisch aussehende Kolonien wurden unter dem Lichtmikroskop im hängenden Tropfen auf ihre Beweglichkeit untersucht. Zusätzlich wurde ein Grampräparat angefertigt. Dazu wurde Koloniematerial auf einem Objektträger in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung verrieben, an der Luft getrocknet und anschließend durch mehrmaliges Schwenken über einer Bunsenbrennerflamme hitzefixiert. Nach dem Abkühlen wurde der Objektträger mit Kristallviolettlösung überschichtet. Nach eineinhalb Minuten wurde Lugolsche Lösung hinzugegeben, nach weiteren eineinhalb Minuten abgegossen und der Objektträger mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Präparat mit Spiritus für eine Minute überschichtet, bis sich kein Farbstoff mehr löste. Nach einer erneuten Spülung mit Wasser wurde der Objektträger für 45 Sekunden mit Karbolfuchsinlösung bedeckt, danach mit Wasser gewaschen und getrocknet. Typische Keime stellten sich unter

dem Lichtmikroskop als gramnegative, schlanke, spiralige Stäbchen dar, wobei auch kürzere, kommaförmige Morphologien beobachtet werden konnten.

Die biochemische Differenzierung der isolierten Stämme erfolgte im Fachgebiet „Mikrobiologie und Hygiene“ des Bundesinstituts für Risikobewertung. Dabei wurden folgende Eigenschaften überprüft: Katalasebildung, Hippurathydrolyse, Indoxylacetat-hydrolyse, Wachstum bei 25°C und 43°C, Empfindlichkeit gegenüber Nalidixinsäure und Cephalothin. Stämme, die Katalase bildeten, Hippurat- und Indoxylacetat hydrolysierten, kein Wachstum bei 25°C, aber bei 43°C zeigten und gegenüber Cephalothin resistent reagierten, wurden als *Campylobacter jejuni* identifiziert. Stämme, die das oben beschriebene Reaktionsmuster mit Ausnahme der Hippurat-hydrolyse aufwiesen, wurden als *Campylobacter coli* angesehen. Die Empfindlichkeit gegenüber Nalidixinsäure gestaltete sich variabel.

Abb. 12: Fließschema zur Isolierung von *Campylobacter* spp.



3.2.5.2.3 *Clostridium perfringens* (Abbildung 13)

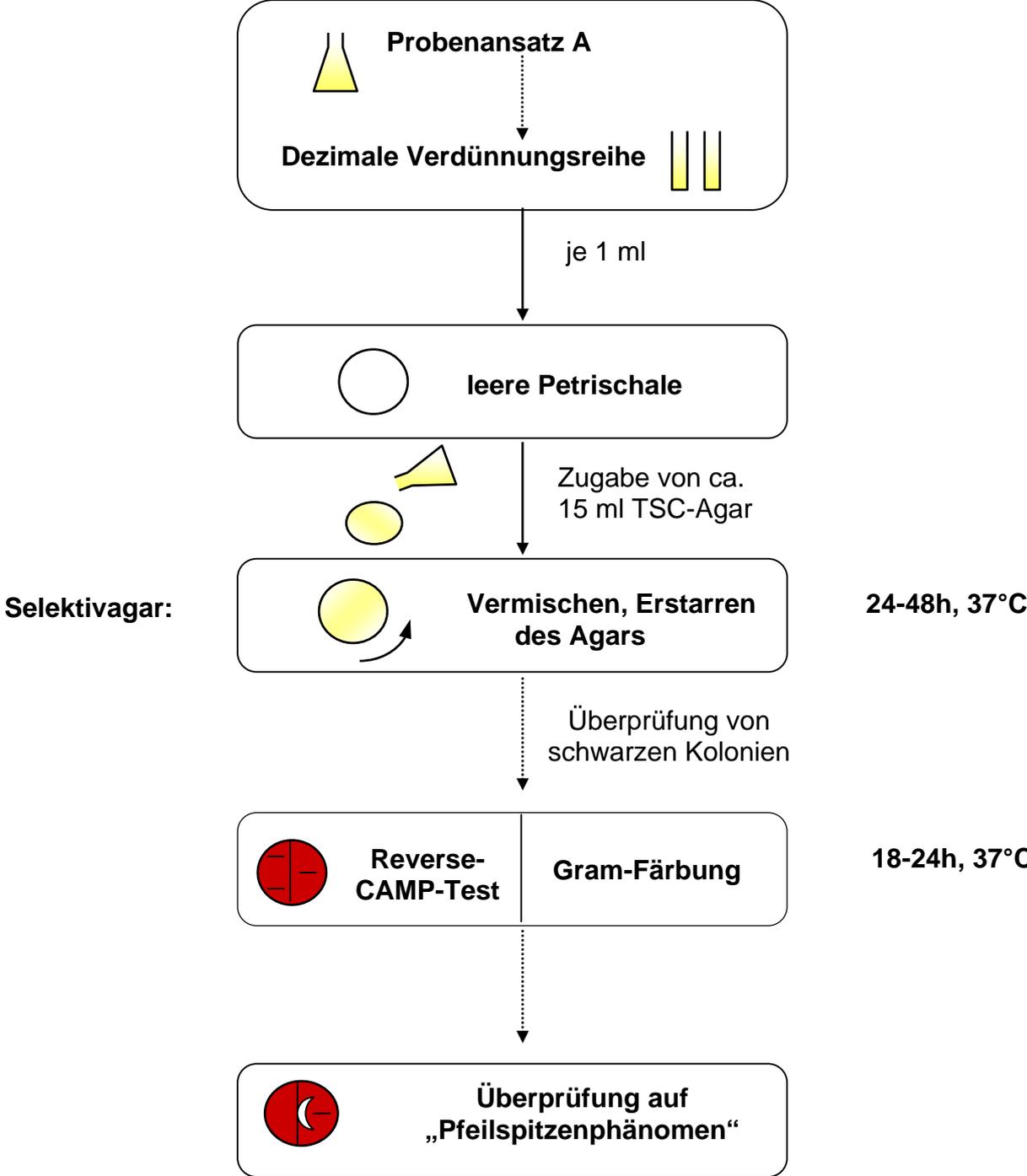
Die Untersuchung erfolgte in Anlehnung an das amtliche Untersuchungsverfahren L 06.00-39 nach § 35 LMBG.

Jeweils 1 ml des Probenansatzes A und bei Leber- und Hautproben auch der weiteren Verdünnungsstufen wurden im Doppelansatz in leere Petrischalen überführt und mit ca. 15 ml des auf rund 42°C temperierten flüssigen Tryptose-Sulfit-Cycloserin (TSC)-Agars vermischt. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Platten anaerob bei 37°C bebrütet. Nach 18-24 Stunden wurden die Platten kontrolliert und bei schwachem Bewuchs weitere 24 Stunden bebrütet.

Alle schwarzen Kolonien wurden gezählt und ausgewählte Kolonien auf einem Objektträger in physiologischer Kochsalzlösung verrieben. Diese Keimsuspension stellte die Grundlage für die Durchführung des umgekehrten (Reverse-) CAMP-Tests dar und wurde anschließend nach Gram (s.o.) gefärbt. Für den Reverse-CAMP-Test wurde auf Diagnostischem Sensibilitätstest (DST)-Agar in der Mitte des Nährbodens der Indikatorstamm *Streptococcus agalactiae* als Impfstrich aufgetragen. Im Abstand von 1 mm zu diesem Impfstrich wurden dann beidseitig im rechten Winkel parallele Impfstriche der zu prüfenden Keimsuspensionen gezogen. Die Agarplatten wurden 18-24 Stunden anaerob bebrütet und auf pfeilspitzenartige Aufhellungen im Bereich der Impfstriche (sogenanntes „Pfeilspitzenphänomen“) untersucht. Bei positivem Befund des CAMP-Tests und der Gramfärbung (grampositive, rechteckige Stäbchen mit oder ohne Sporen) wurden die Kolonien als *Clostridium perfringens* angesehen und aus dem Anteil der bestätigten Kolonien die Anzahl *Clostridium perfringens* pro g bzw. ml Probenmaterial berechnet.

Abb. 13: Fließschema zur Isolierung von *Clostridium perfringens*

anaerobe Bebrütung:



3.2.5.2.4 Enterobakteriaceen

Die Untersuchung erfolgte gemäß dem amtlichen Untersuchungsverfahren L 06.00-25 nach § 35 LMBG.

Es wurden jeweils im Doppelansatz Violet-red Bile Dextrose (VRBD)-Agarplatten in vier bzw. sechs (Hautproben) Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes A und seiner weiteren Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 37°C anaerob bebrütet. Nach 48 Stunden wurden alle pink-lilafarbenen Kolonien ausgezählt und die Anzahl der Enterobakteriaceen pro g bzw. ml der untersuchten Probe berechnet.

3.2.5.2.5 *Escherichia coli*

Die Untersuchung erfolgte in Anlehnung an das amtliche Untersuchungsverfahren L 06.00-36 nach § 35 LMBG.

Auf den Wiederbelebungs-schritt wurde verzichtet und direkt Fluorocult® Escherichia-Coli-Direkt (ECD)-Agarplatten im Doppelansatz mit 0,1 ml des Probenansatzes A beimpft (Spatelverfahren). Zusätzlich wurde bei Leber- und Hautproben und bei Brustmuskulaturproben von Tieren mit Tiefer Dermatitis das Tropfplattenverfahren angewendet.

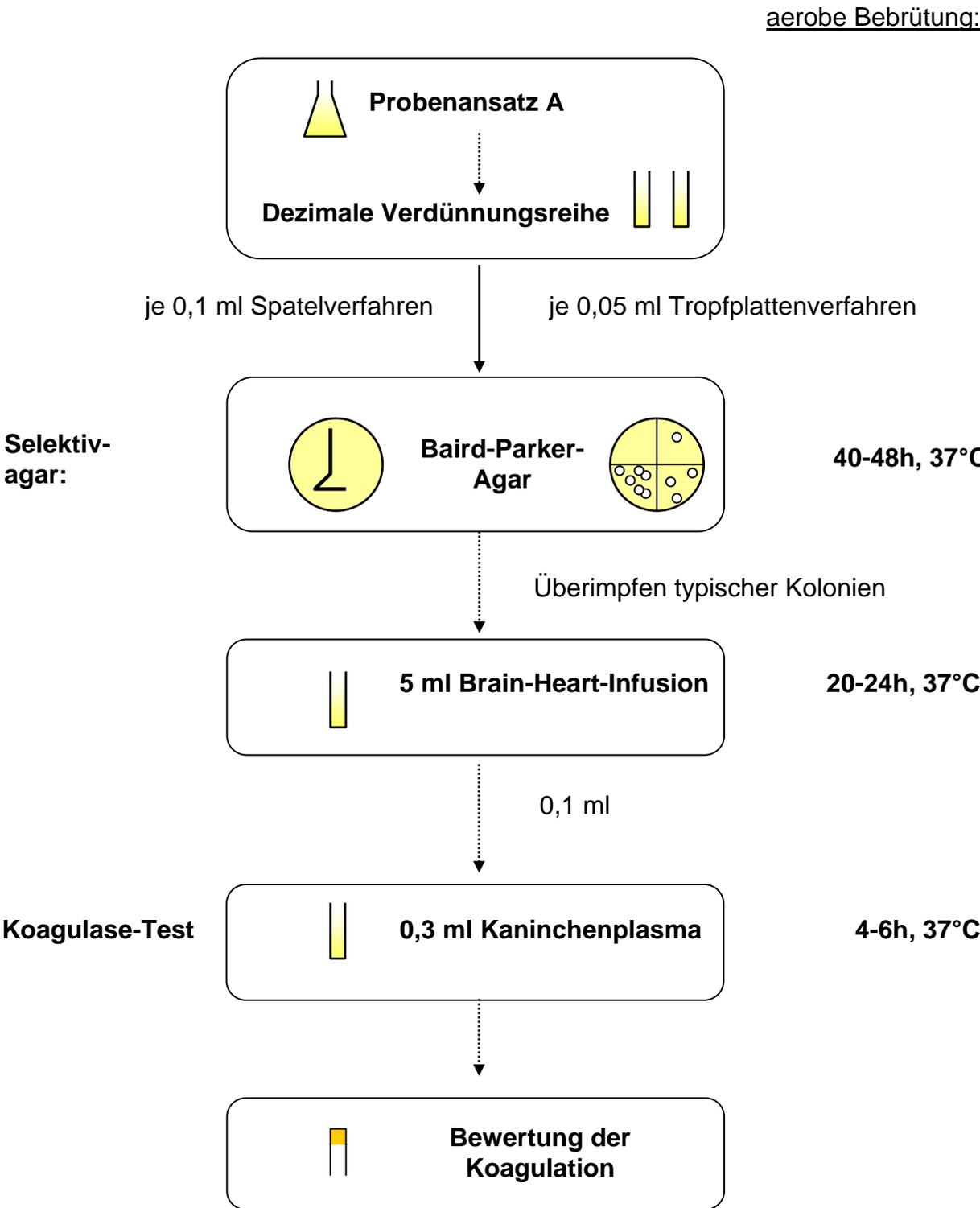
Die Agarplatten wurden 18-24 Stunden lang bei 44°C aerob bebrütet und unter einer UV-Lichtquelle mit einer Wellenlänge von 360 nm auf Fluoreszenz überprüft. Alle blau-fluoreszierenden Kolonien wurden stichprobenweise auf Indol-Bildung untersucht. Dazu wurden mit Tryptophan-Bouillon gefüllte Hämatokrit-Kapillarröhrchen mit ausgewählten Kolonien beimpft und bei 37°C aerob bebrütet. Nach vier Stunden wurden die Röhrchen kurz in Kovács-Reagenz getaucht. Eine rote Verfärbung wurde als positives Testergebnis notiert. Anschließend wurde aus dem Anteil der bestätigten Kolonien die Anzahl *E. coli* pro g bzw. ml Probenmenge errechnet.

3.2.5.2.6 Koagulase-positive Staphylokokken (Abbildung 14)

Die Untersuchung erfolgte in Anlehnung an das amtliche Untersuchungsverfahren L 06.00-21 bzw. -22 nach § 35 LMBG.

Es wurden jeweils im Doppelansatz 0,1 ml des Probenansatzes A auf Baird-Parker (BP)-Agarplatten verbracht und ausgespatelt. Zusätzlich wurde bei Leber- und bei Hautproben das Tropfplattenverfahren (s.o.) angewendet. Die Agarplatten wurden unter aeroben Bedingungen bei 37°C bebrütet. Nach 40-48 Stunden wurden die typischen Kolonien (grau-schwarz, mittelgroß, meist gezackter Rand, meist umgeben von einem schmalen, undurchsichtigen Rand, an den sich eine durchsichtige Aufhellungszone anschließt) ausgezählt. Anschließend wurde eine Stichprobe dieser und anderer verdächtiger Kolonien auf Koagulase-Bildung überprüft. Dazu wurden die ausgewählten Kolonien in mit 5 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) gefüllte Reagenzröhrchen überimpft und bei 37°C aerob bebrütet. Nach 20-24 Stunden wurden 0,1 ml dieser Kultur in ein steriles kurzes Reagenzröhrchen verbracht, 0,3 ml Kaninchenplasma zugegeben, vermischt und bei 37°C aerob bebrütet. Nach vier bis sechs Stunden wurde der Röhrcheninhalt auf Koagulation überprüft und aus dem Anteil bestätigter Kolonien die Anzahl Koagulase-positiver Staphylokokken pro g bzw. ml Probenmaterial berechnet.

Abb. 14: Fließschema zur Isolierung von Koagulase-positiven Staphylokokken

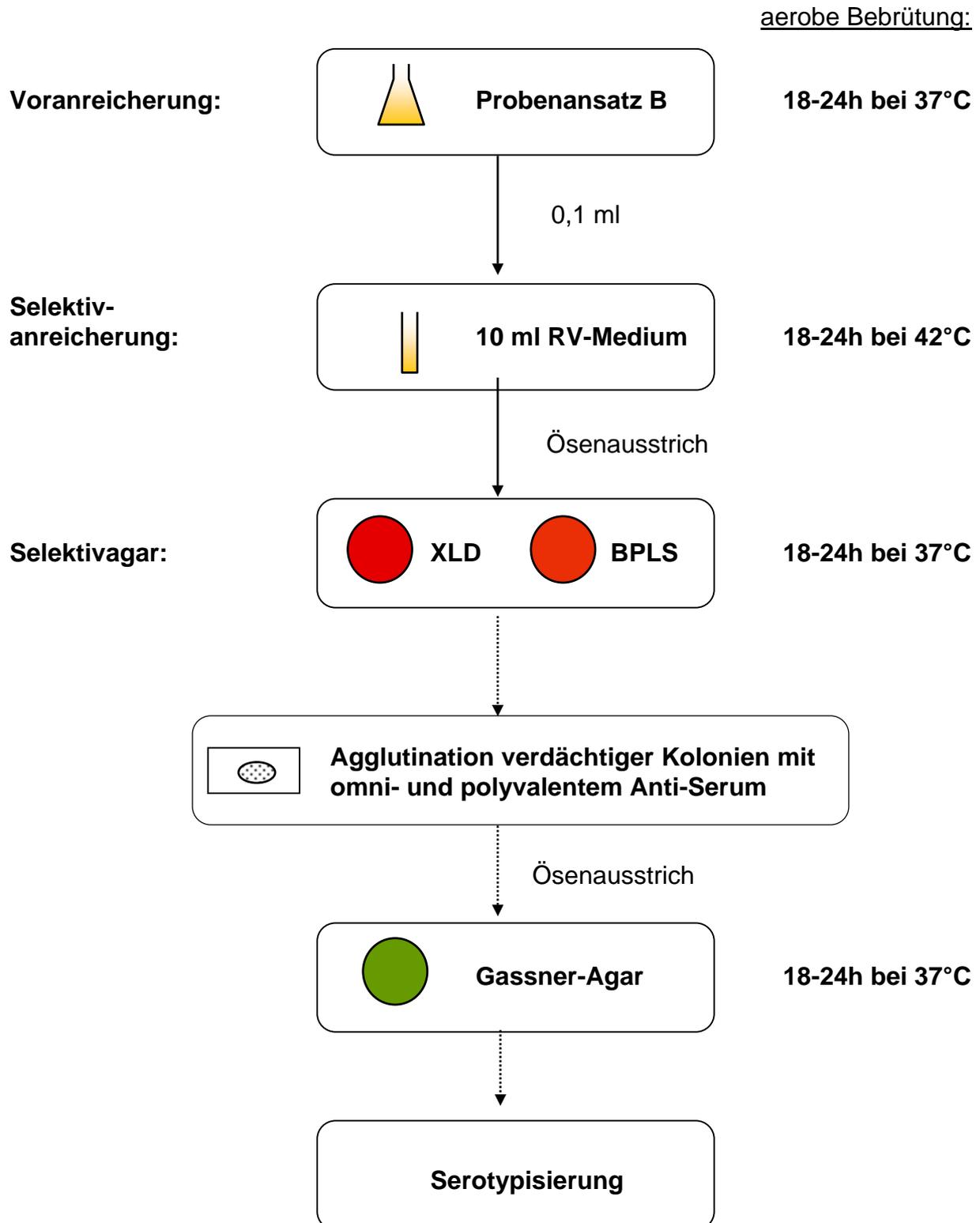


3.2.5.2.7 Salmonellen (Abbildung 15)

Die Untersuchung erfolgte in Anlehnung an das amtliche Untersuchungsverfahren L 00.00-20 nach § 35 LMBG.

Die Glaskolben mit dem Probenansatz B wurden unter aeroben Bedingungen 18-24 Stunden lang bei 37°C bebrütet. Aus der bebrüteten Anreicherungsbouillon wurden 0,1 ml entnommen, zu 10 ml Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung hinzugefügt, mit Hilfe eines Reagenzglasschüttlers kurz durchmischt und aerob bei 42°C bebrütet. Nach 18-24 Stunden wurden die Reagenzgläser kurz aufgeschüttelt und eine Öse mit der Selektivanreicherungsflüssigkeit auf Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar und modifiziertem Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose (BPLS)-Agar ausgestrichen. Die beimpften Agarplatten wurden aerob bei 37°C bebrütet. Nach 18-24 Stunden wurden die Platten auf salmonellenverdächtige (BPLS: rosa Kolonien mit rotem Hof, XLD: rötliche Kolonien mit schwarzem Zentrum) Kolonien überprüft. Verdächtige Kolonien wurden auf einem Objektträger mit omni- und polyvalenten Antiseren vermischt. Bei einer typischen Agglutination wurde Probenmaterial aus dem Agglutinat sowie Koloniereste vom Selektivagar auf Gassner-Agar verbracht und 18-24 Stunden lang bei 37°C bebrütet. Salmonellenverdächtige hellgrüne Kolonien wurden dem Nationalen Veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen im Bundesinstitut für Risikobewertung zur Serotypisierung übergeben.

Abb. 15: Fließschema zur Isolierung von Salmonellen



3.2.6 Statistische Auswertungen

3.2.6.1 Mikrobiologische Daten

3.2.6.1.1 Transformation der Daten, Prüfung auf Normalverteilung

Wie **Tabelle 7** verdeutlicht, standen zur statistischen Auswertung sowohl quantitative als auch rein qualitative Daten zur Verfügung. Aufgrund der verschiedenen Nachweisverfahren (Anreicherungs-, Plattenguss-, Tropfplatten- oder Spatelverfahren) ergaben sich für die einzelnen Keimarten unterschiedliche Nachweisgrenzen. Um statistische Berechnungen durchführen zu können, wurde Keimzahlen, die unterhalb der Nachweisgrenze (NG) lagen, ein konstanter Wert (= ½ NG) zugeordnet. Dieser Wert wurde dem Nullwert vorgezogen, da dieser in vielen Fällen eine Keimfreiheit der Probe vortäuschen würde, die in Wirklichkeit nicht gegeben war. So waren bei einem Großteil der Proben auf dem Plate-Count-Agar keine Kolonien zu sehen, dafür aber (nach Anreicherung) auf den Salmonellen-Selektivböden. Zudem wurde bei der Auswertung des Doppelansatzes nach dem Tropfplatten- bzw. Spatelverfahren eine einzelne Kolonie, die bei der geringsten Verdünnungsstufe nur auf einer der beiden Agarböden des Doppelansatzes vorkam, nicht in die Berechnung der Keimzahl miteinbezogen (Beurteilung: <NG).

Tab. 7: Untersuchtes Keimspektrum

Keimart	Nachweis mittels	Nachweisgrenze
aerobe mesophile Keimzahl	Tropfplattenverfahren	200 KbE/g
<i>Escherichia coli</i>	Spatelverfahren	100 KbE/g
Enterobakteriazeen	Tropfplattenverfahren	200 KbE/g
<i>Clostridium perfringens</i>	Plattengussverfahren	10 KbE/g
Koagulase-positive Staphylokokken	Spatelverfahren	100 KbE/g
<i>Campylobacter</i> spp.	Anreicherungsverfahren	rein qualitativ
<i>Salmonella</i> spp.	Anreicherungsverfahren	rein qualitativ

KbE= Koloniebildende Einheiten

Da die ermittelten Daten, nicht zuletzt aufgrund der Nachweisgrenze, stark linkssteil verteilt sind, wurden sie zur Basis 10 logarithmiert. Anschließend wurden sie unter Anwendung des Kolmogoroff-Smirnoff-Tests (mit Signifikanzniveau nach Liliefors) auf Normalverteilung überprüft. Dabei wurden folgende Hypothesen definiert:

Hypothese 0 = die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung

Hypothese 1 = die zu testende Verteilung ist keine Normalverteilung

Der Wert p bezeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit, mit der man die Hypothese 0 zugunsten der Hypothese 1 verwirft, obwohl erstere richtig war. Als Toleranzgrenze für p wurde der Wert 0,05 (=5%) gewählt.

Wie aus der **Tabelle 8** ersichtlich ist, scheint nach logarithmischer Transformation die ermittelte aerobe mesophile Keimzahl bei Hepatitis- und Kontrolllebern sowie die aerobe mesophile Keimzahl, *E. coli*- und Enterobakteriazeen-Keimzahlen der Haut von Broilern mit Tiefer Dermatitis und den zugehörigen Kontrolltieren einer Normalverteilung zu folgen. Da statistische Tests immer nur die Nullhypothese zugunsten der Alternativhypothese ablehnen, aber nicht die Nullhypothese beweisen können, "scheinen" die oben genannten Werte normalverteilt zu sein. Besonders unter Berücksichtigung der geringen Stichprobenzahl darf diese Aussage aber nur unter Vorbehalt getroffen werden.

Tab. 8: Ergebnis der Überprüfung der ermittelten Keimzahlen auf Normalverteilung

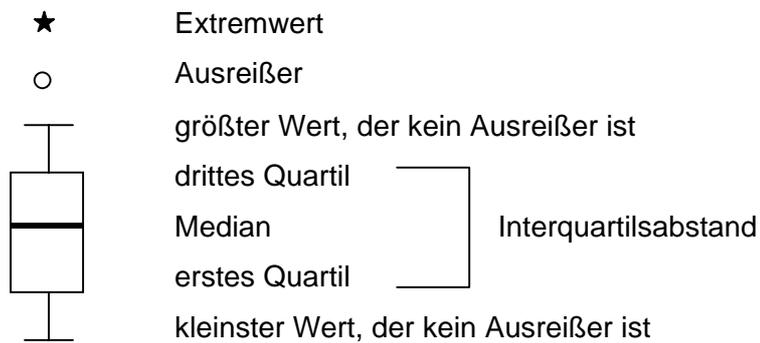
	Probenart	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)				
		aerobe mesoph. Keimz.	<i>E. coli</i>	Enterobakt.	<i>Clostr. perfr.</i>	Koag.-pos. Staph.
Aszites	Leber	0,000	0,000	0,000	0,000	n.b.
Hepatitis	Leber	0,428	0,018	0,005	0,000	0,000
Hepatitis-Kontrolltier	Leber	0,950	0,007	0,002	0,000	0,000
Tiefe Dermatitis	Haut	0,577	0,631	0,702	0,000	0,002
Tiefe Dermatitis-Kontrolltier	Haut	0,917	0,496	0,486	0,000	0,090

n.b. = nicht berechenbar, da konstanter Wert, Keimz.= Keimzahl

hervorgehobene Schrift = die Messwerte sind nicht normalverteilt

3.2.6.1.2 Graphische Darstellung der Daten (fallunabhängig)

Die quantitativen Daten werden graphisch mit Hilfe von Boxplots dargestellt:



In diesem System sind "Extremwerte" definiert als Werte, die vom oberen Quartil mehr als 3 Interquartilsabstände entfernt sind. Als "Ausreißer" werden hingegen solche Werte bezeichnet, die vom oberen Quartil mehr als 1,5 und weniger als 3 Interquartilsabstände entfernt sind.

Die Datenauswertung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 9.0 für Windows durchgeführt. Als Besonderheit stellt SPSS im Boxplot nicht das 25., 50. und 75. Perzentil als gewichtetes Mittel dar, sondern greift auf die Tukeyschen Angelpunkte zurück. Da nur in wenigen Fällen die so berechneten Werte in der 2. Nachkommastelle von den gemittelten Perzentilen abweichen, werden in den Tabellen unter den Boxplots nicht die Tukeyschen Angelpunkte, sondern die im Rahmen der explorativen Datenanalyse ermittelten Perzentile (gewichtetes Mittel) beschrieben.

3.2.6.1.3 Graphische Darstellung der Daten (fallspezifisch)

Für die graphische Gegenüberstellung der Keimzahlen von beanstandeten Tieren und Kontrolltieren wurde ein sogenanntes Sonnenblumen-Streudiagramm verwendet. Im Gegensatz zum üblichen Scatterplot kann man hier die Anzahl der Fälle (Punkte), die übereinander liegen, erfassen, muss jedoch eine gewisse Ungenauigkeit durch eine Rasterung des Diagrammfeldes in Kauf nehmen. Ein "Blütenblatt" wurde als ein Fall definiert.

3.2.6.1.4 Deskriptive Statistik (fallunabhängig)

Aufgrund der oben geschilderten Schiefe der Verteilungen wird der Keimstatus von Lebern und Brustmuskulatur durch folgende Lage- und Streuungsmaße beschrieben:

- min = kleinster Wert
- max = größter Wert
- 25., 50., 75. und 90. Perzentil

Beim Vergleich des Keimstatus der Haut wurden zusätzlich

- \bar{x} = arithmetischer Mittelwert
- s = Standardabweichung
- VK = Variationskoeffizient (in %) = $\left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \times 100$

der logarithmierten Werte berechnet.

3.2.6.1.5 t-Test und nichtparametrische Testverfahren (fallunabhängig)

Aufgrund der verhältnismäßig homogenen Ausprägung der pathologischen und bakteriologischen Hautbefunde bei Broilern mit Tiefer Dermatitis wurden die ermittelten Daten (aerobe mesophile Keimzahl, *E. coli*, Enterobakteriazeen) von Broilern mit Tiefer Dermatitis in ihrer Gesamtheit mit den Werten der beprobten Kontrolltiere unter Anwendung des t-Tests verglichen. Dabei wurde dem t-Test der Levene-Test auf Varianzgleichheit vorgeschaltet. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurde zusätzlich als nichtparametrisches Verfahren der Mann-Whitney-Test angewendet.

3.2.6.1.6 t-Test und nichtparametrische Testverfahren (fallspezifisch)

Um ein genaueres Bild der unterschiedlichen Keimbelastung von Broilern mit Hepatitis bzw. Tiefer Dermatitis und von den Kontrolltieren zu erhalten, wurde bei jedem beanstandeten Tier die Differenz zum zugehörigen Kontrolltier bestimmt. Dabei wurde die logarithmierte Keimzahl des Kontrolltieres von der logarithmierten Keimzahl des zugehörigen beanstandeten Tieres subtrahiert. Anschließend wurden die ermittelten Differenzen auf Normalverteilung überprüft. Wie aus **Tabelle 9** ersichtlich ist, sind nicht alle Differenzen normalverteilt. Deshalb wurde in diesen Fällen die Keimzahlen der beanstandeten Broiler mit denen der Kontrolltiere mit Hilfe

des Wilcoxon-Test verglichen. Ansonsten wurde zusätzlich der t-Test für gepaarte Stichproben angewendet.

Tab. 9: Ergebnis der Überprüfung der ermittelten Keimzahldifferenzen (beanstandetes Tier - Kontrolltier) auf Normalverteilung

Beanstandungsgrund	Probenart	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)		
		aerobe mesophile Keimzahl	<i>E. coli</i>	Enterobakteriazeen
Hepatitis	Leber	0,648	0,110	0,025
Tiefe Dermatitis	Brustmuskulatur	0,000	0,000	0,000
Tiefe Dermatitis	Haut	0,854	0,668	0,820

hervorgehobene Schrift = die Messwerte sind nicht normalverteilt

3.2.6.1.7 Chi-Quadrat-Test, Exakter Test nach Fisher

Zur Bestimmung von Unterschieden bei rein qualitativen Merkmalen (z. B. *Campylobacter*-positiv/negativ) wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson bzw. bei 2 x 2 Tabellen mit geringen Stichprobenzahlen (Häufigkeiten) der Exakte Test nach Fisher verwendet.

3.2.6.2 Tierkörper- und Organmassen

Im Rahmen der pathologischen Untersuchungen wurden die Tierkörper- und Organmassen erfasst. Aufgrund der geringen Größenordnung der ermittelten Massen wird im Ergebnisteil der Beschreibung der absoluten Organmassen der Vorzug gegeben, während die relativen Organmassen nur im Anhang aufgelistet werden.

Als Tierkörpermasse (TKM) wird nachfolgend die Masse des Broilers nach Entfernung des Federkleides, des Kopfes und der Ständer bezeichnet. Bei Broilern mit Hepatitis wurde zusätzlich die Masse der ausgeweideten Tierkörper bestimmt. Bei Broilern mit Aszites wurde von der ermittelten Tierkörpermasse die Masse der Bauchhöhlenflüssigkeit abgezogen. Aus organisatorischen Gründen liegen nicht von allen 120 Broilern vollständige Datensätze vor.

3.2.6.2.1 Prüfung auf Normalverteilung

Analog zu den Ausführungen unter 3.2.6.1 wurden die ermittelten absoluten Daten unter Anwendung des Kolmogoroff-Smirnoff-Tests (mit Signifikanzniveau nach Liliefors) auf Normalverteilung überprüft (**Tabelle 10**). Dabei zeigten die Lebermassen von Tieren mit Aszites eine abweichende Verteilungsform.

Tab. 10: Ergebnis der Überprüfung der ermittelten Tierkörper- und Organmassen auf Normalverteilung

Beanstandungsgrund	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)			
	Tierkörper	Herz	Milz	Leber
Aszites	0,716	0,836	0,118	0,017
Hepatitis	0,500	0,228	0,600	0,948
Kontrolltier	0,652	0,718	0,993	0,550
Tiefe Dermatitis	0,960	0,245	0,757	0,611
Kontrolltier	0,889	1,000	0,831	0,947

hervorgehobene Schrift = die Messwerte sind nicht normalverteilt

3.2.6.2.2 Graphische Darstellung, deskriptive Statistik (fallunabhängig)

Zur graphischen Darstellung der Daten wurden Boxplots verwendet, die durch Tabellen mit folgenden Lage- und Streuungsmaßen ergänzt wurden:

- min, max, 25., 50., 75. Perzentil, \bar{x} , s und VK.

3.2.6.2.3 Graphische Darstellung (fallspezifisch)

Für die graphische Darstellung der Tierkörper- und Organmassen in Abhängigkeit von der pathologisch-anatomischen Klassifizierung wurden Sonnenblumen-Streudiagramme verwendet.

3.2.6.2.4 t-Test und nichtparametrische Testverfahren (fallunabhängig)

Die ermittelten Daten von beanstandeten Broilern wurden mit den Daten der nicht beanstandeten Kontrolltiere unter Anwendung des t-Tests verglichen. Dabei wurde dem t-Test der Levene-Test auf Varianzgleichheit vorgeschaltet. Zur Beurteilung der Lebermassen der Aszites-Tiere wurde als nichtparametrisches Testverfahren der

Mann-Whitney-Test verwendet. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurde er zudem bei allen Massedaten zusätzlich zum t-Test durchgeführt.

3.2.6.2.5 t-Test bei gepaarten Stichproben (fallspezifisch)

Bei Broilern mit Hepatitis bzw. Tiefer Dermatitis wurden zusätzlich die Organ- und Tierkörpermassen jedes einzelnen Tieres mit den ermittelten Daten des zugehörigen Kontrolltieres verglichen. Dazu wurden die Messwerte des Kontrolltieres von denen des zugehörigen beanstandeten Tieres subtrahiert. Anschließend wurden die ermittelten Differenzen auf Normalverteilung überprüft. Wie aus **Tabelle 11** ersichtlich ist, scheinen alle Differenzen normalverteilt zu sein. Deshalb wurden die Massedaten unter Anwendung des t-Tests für gepaarte Stichproben miteinander verglichen.

Tab. 11: Ergebnis der Überprüfung der ermittelten Massedifferenzen (beanstandetes Tier-Kontrolltier) auf Normalverteilung

Beanstandungs- grund	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)			
	Tierkörper	Tierkörper ohne Organe	Milz	Leber
Hepatitis	0,618	0,914	0,764	0,695
Tiefe Dermatitis	0,995	--	0,893	0,580