

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Geschäftsführender Vorstand:
Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. W. A. Rambeck

**Wirkung von Lactoferrin auf den Organismus
neonataler Hundewelpen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Petra Franziska Laur
aus Friedberg/Bayern

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Prof. Dr. W. Rambeck

Korreferent: Prof. Dr. J. Braun

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung und Aufgabenstellung	1
B	Literaturübersicht	3
1	Der Begriff Probiotikum	3
1.1	Geschichtliche Entwicklung	3
1.2	Heute gültige Definition	4
1.3	Die probiotische Grundidee	5
2	Prebiotika	6
3	Wirkung der Probiotika	7
4	Einsatzgebiete der Probiotika	9
4.1	Einsatz in der Humanmedizin	9
4.2	Einsatz bei landwirtschaftlichen Nutztieren	10
4.2.1	Ferkel und Mastschweine	11
4.2.2	Kälber, Kühe und Mastbullen	14
4.3	Einsatz bei Hund und Katze	15
5	Lactoferrin als prebiotische Substanz	16
5.1	Vorkommen	16
5.2	Struktur des Lactoferrins	17
5.3	Lactoferrin-Rezeptorverteilung	18
5.4	Lactoferricin	19
5.5	Wirkungen von Lactoferrin	20
5.5.1	Beeinflussung des Eisenhaushalts	20
5.5.2	Antibakterielle Eigenschaften	21

5.5.3	Modulation des Entzündungsprozesses	23
5.5.4	Antivirale Effekte	25
5.5.5	Antimykotische Wirkungen	26
5.5.6	Antiprotozoische Wirkung	26
5.5.7	Immunmodulatorische Eigenschaften	27
5.5.8	Auswirkungen auf das Blutbild	28
5.5.9	Lactoferrin und Tumorgenese	29
5.5.10	Antiallergene und proliferative Eigenschaften des Lactoferrins	30
6	Welpensterben	30
6.1	Immunabwehr bei Welpen	30
6.2	Eubiosis und Dysbiosis des Gastrointestinaltrakts	33
7	Klinische und physiologische Untersuchungsparameter der Welpen bzw. deren Beeinflussbarkeit durch Probiotikafütterung	34
7.1	Milchaufnahme und Gewichtsentwicklung neugeborener Hundewelpen in den ersten 4 Wochen p.p.	34
7.2	Physiologische Blutwerte von Beagle-Welpen unterschiedlichen Alters im Vergleich zu adulten Tieren	35
7.3	Einfluss von Probiotika auf die Faeces	37
7.3.1	Bakterielle Zusammensetzung der Hunde-Faeces	37
7.3.2	pH-Wert in Kot und Chymus	39
7.3.3	L-Lactatgehalt	39
7.3.4	TS-Gehalt de Kotes	40

C	Material und Methoden	41
1	Versuchsaufbau	41
2	Versuchsanordnung und Parameter	43
2.1	Rahmenbedingungen	43
2.1.1	Versuchstiere	43
2.1.2	Gruppeneinteilung	44
2.1.3	Fütterung der Versuchstiere	44
2.1.3.1	Futterzusammensetzung	44
2.1.3.2	Fütterungszeiten	47
2.1.3.3	Fütterungstechnik	48
2.1.4	Kot- und Harnabsatz	48
2.1.5	Unterbringung	48
2.1.6	Entwurmungen	49
2.2	Untersuchungsparameter und Analyseverfahren	49
2.2.1	Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung und Futtermittelverwertung	49
2.2.2	Bestimmung des roten und weißen Blutbildes	49
2.2.3	Untersuchungen des Plasmas	50
2.2.3.1	Parameter	50
2.2.3.2	Blutentnahmezeitpunkte	50
2.2.3.3	Entnahme	51
2.2.3.4	Bestimmung des antioxidativen Status	51
2.2.3.5	Bestimmung der Immunglobuline	52
2.2.4	Untersuchungen in den Faeces	52
2.2.4.1	Untersuchungszeitpunkte	52
2.2.4.2	Mikrobiologische Untersuchungen	53
2.2.4.3	pH-Messung	58
2.2.4.4	Bestimmung des L-Lactatgehaltes	58
2.2.4.5	Messung des Ammoniakgehaltes	62
2.2.4.6	TS-Bestimmung	63
3	Statistische Auswertungen	64

D	Ergebnisse	65
1	Gewichtsentwicklung	65
2	Futteraufnahme	70
3	Futterverwertung	72
4	Kotparameter	73
4.1	Mikrobiologische Untersuchung des Kotes	73
4.1.1	Aerobe Gesamtkeimzahlen	74
4.1.2	E. coli	75
4.1.2.1	Absolute Zahlen	75
4.1.2.2	Prozentanteil der E. colis an der Gesamtkeimzahl	76
4.1.3	Enterococcen	76
4.1.4	Cl. perfringens	78
4.1.5	Lactobacillen/Leuconostoc	79
4.2	Lactat	81
4.3	Ammoniak	82
4.4	pH des Kotes	83
4.5	Trockensubstanzgehalt des Kotes	84
5	Blutwerte	85
5.1	Erythrozyten	86
5.2	Hämoglobin	87
5.3	Hämatokrit	87
5.4	Leukozyten	88
5.5	Neutrophile Granulozyten	89
5.5.1	Absolute Zahlen	89
5.5.2	Relative Zahlen	90

5.6	Lymphozyten	91
5.6.1	Absolute Zahlen	91
5.6.2	Relative Zahlen	92
E	Diskussion	93
1	Aufbau und Ziel der Fütterungsstudie	93
2	Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung und Futterverwertung	94
3	Mikrobiologie des Kotes	96
4	Einfluss des Lactoferrins auf die Kotparameter Ammoniak, L-Lactat, pH und die Kot-Trockensubstanz	101
5	Einfluss des Lactoferrins auf das rote und weiße Blutbild	105
F	Zusammenfassung	111
G	Summary	113
H	Literaturverzeichnis	115
I	Danksagung	139
K	Lebenslauf	140

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Lactoferrin, dreidimensional dargestellt (aus Baker et al. 2002)	17
Abbildung 2:	Modulation des Entzündungsprozesses durch Lactoferrin (abgeändert nach Kruzel 2000)	24
Abbildung 3:	Immunglobulinverlauf der Jungtiere (aus Tizard 2000)	32
Abbildung 4:	Hämoglobin- und Hämatokritverlauf neonataler Beagle-Welpen (aus Kienzle et al. 1985)	37
Abbildung 5:	Versuchsablauf und Entnahmezeitpunkte der Blutproben	42
Abbildung 6:	Mittlere Gewichtsentwicklung der Welpen der verschiedenen Versuchsgruppen	94
Abbildung 7:	Ammoniakkonzentrationen der Versuchsgruppen zu den 4 Probeentnahmezeitpunkten unter Berücksichtigung der Standardabweichung in mg/kg Kot	103
Abbildung 8:	Mittlere Leukozytenzahlen der Versuchsgruppen (*10e9/l) während des Versuchs unter Berücksichtigung der Standardabweichung	107
Abbildung 9:	Mittlere Anzahl Lymphozyten der Versuchsgruppen (*10e9/l) während des Versuchs unter Berücksichtigung der Standardabweichung	109
Abbildung 10:	Mittlere Anzahl neutrophiler Granulozyten der Versuchsgruppen in % während des Versuchs unter Berücksichtigung der Standardabweichung	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufig als Probiotika verwendete mikrobielle Spezies	5
Tabelle 2: Einfluss verschiedener Probiotika auf die Leistung einiger landwirtschaftlicher Nutztiere (abgeändert nach Busch et al. 1999)	11
Tabelle 3: Nutritive Effekte einiger Probiotika in der Ferkelaufzucht (abgeändert nach Eidelsburger 1991)	12
Tabelle 4: Nutritive Effekte einiger Probiotika bei Absatzferkeln (abgeändert nach Molitor 1998)	13
Tabelle 5: Nutritive Effekte bei Mastschweinen (abgeändert nach Molitor 1998)	13
Tabelle 6: Weitere Beispiele der Effekte bei Kälbern	15
Tabelle 7: Beispiele der Effekte bei Mastbullen	15
Tabelle 8: Zellen und Gewebe, auf denen Lactoferrinrezeptoren nachgewiesen wurden	19
Tabelle 9: Tägliche Milchmengenaufnahme der Saugwelpen (im Mittel, absolut in g und relativ in % KGW) (abgeändert nach Kienzle et al. 1985)	35
Tabelle 10: Tägliche Gewichtszunahme im Mittel bei mittelgroßen Hunden (in g bzw. % KGW) (abgeändert nach Kienzle et al. 1985)	35
Tabelle 11: Mittlere Blutwerte gesunder Beagle-Welpen unterschiedlichen Alters (abgeändert nach Hoskins 1990)	36
Tabelle 12: Durchschnittliche Bakteriengehalte in Hundefaeces (abgeändert nach Zentek 1993)	38
Tabelle 13: Die Versuchstiere nach Gruppen sortiert, deren Geschlecht und Gewicht bei Versuchsantritt (3. Lebenstag)	43
Tabelle 14: Anzahl der Tiere in den unterschiedlichen Versuchsgruppen	44
Tabelle 15: Zusammensetzung der Inhaltsstoffe des Milchaustauschers (Meyer et al. 1986) (in g/100 g Milchaustauscher)	45
Tabelle 16: Aminosäuregehalte des Milchaustauschers (in g/100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)	46
Tabelle 17: Mineralstoff- und Spurenelementgehalt des Milchaustauschers (in 100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)	46

Tabelle 18: Vitamingehalt des Milchaustauschers (in 100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)	46
Tabelle 19: Zusammensetzung des Trockenfutters (Weender Analyse)	47
Tabelle 20: Mineralstoff- und Spurenelementgehalt des Trockenfutters (in der TS)	47
Tabelle 21: Einteilung der Tiere in die Versuchsgruppen	65
Tabelle 22: Durchschnittliche Anfangs- und Endgewichte der Welpen jeder Gruppe in g (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s)	65
Tabelle 23: Durchschnittsgewichte der Hunde der einzelnen Versuchsgruppen am Ende jeder Lebenswoche in g/Hund (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s)	67
Tabelle 24: Durchschnittliche wöchentliche Gewichtszunahmen in g je Hund und Gruppe (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s)	69
Tabelle 25: Wöchentliche durchschnittliche Futteraufnahme in g je Gruppe und Tier (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s)	70
Tabelle 26: Wöchentliche durchschnittliche Futterverwertung der verschiedenen Gruppen	72
Tabelle 27: Mittlere Futterverwertung der einzelnen Gruppen im Gesamtversuch (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s)	72
Tabelle 28: Durchschnittliche aerobe Gesamtkeimzahlen je Welpen und Gruppe in KbE (Mrd.) (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) in einem g Kot an den 4 Probeentnahmezeitpunkten	74
Tabelle 29: Durchschnittliche Anzahl der E. coli-Bakterien (Mio.) (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) je Welpen und Gruppe in einem g Kot an den 4 Probeentnahmezeitpunkten	75
Tabelle 30: Durchschnittlicher Prozentanteil der E. colis an der Gesamtkeimzahl (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) je Welpen und Gruppe zu den 4 Probeentnahmezeitpunkten	76
Tabelle 31: Durchschnittliche Anzahl Enterococci in einem g Kot (Mio.) (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) je Welpen und Versuchsgruppe	77
Tabelle 32: Durchschnittliche Menge der aufgeführten Enterococcenspezies je Versuchsgruppe und Tier in einem g Kot in Mio. zu den 4 Entnahmezeitpunkten	77
Tabelle 33: Durchschnittliche Anzahl der Cl. perfringens je Gruppe und Hund in einem g Kot (Mio.) zu den 4 Entnahmezeitpunkten	79

Tabelle 34: Durchschnittliche Anzahl Lactobacillen/Leuconosoc in einem g Kot (Mio.) (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) je Hund und Versuchsgruppe	79
Tabelle 35: Durchschnittliche Menge der aufgeführten milchsäurebildenden Keime je Versuchsgruppe und Tier in einem g Kot in Mio. zu den 4 Entnahmezeitpunkten	80
Tabelle 36: Durchschnittliche Lactat-Werte (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 4 Probeentnahmezeitpunkten in mg/kg Kot	81
Tabelle 37: Durchschnittliche Ammoniak-Werte (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 4 Probeentnahmezeitpunkten in mg/kg Kot	82
Tabelle 38: Durchschnittliche pH-Werte (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 4 Probeentnahmezeitpunkten	83
Tabelle 39: Durchschnittliche TS-Werte (%) der einzelnen Gruppen zu allen Probeentnahmezeitpunkten	84
Tabelle 40: Durchschnittliche Erythrozytengehalte des Blutes (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten in $10^6/12/l$	86
Tabelle 41: Durchschnittliche Hämoglobingehalte des Blutes der einzelnen Gruppen in mmol/l (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) an den 5 Probeentnahmezeitpunkten	87
Tabelle 42: Durchschnittliche Hämatokritgehalte des Blutes (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten in %	87
Tabelle 43: Durchschnittliche Leukozytengehalte des Blutes (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten in tausend	88
Tabelle 44: Durchschnittliche Gehalte an neutrophilen Granulozyten des Blutes (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten in tausend	89
Tabelle 45: Durchschnittliche relative Anteile an neutrophilen Granulozyten des Blutes (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten in %	90
Tabelle 46: Durchschnittliche Gehalte an Lymphozyten (Mittelwert $x \pm$ Standardabweichung s) im Blut der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten in tausend	91

Tabelle 47: Durchschnittliche Gehalte an Lymphozyten im Blut (Mittelwert $\bar{x} \pm$ Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten in %	92
--	----

Abkürzungen

A.oryzae	Aspergillus oryzae
Arg	Arginin
B.	Bifidobakterium
BE	Bruttoenergie
B. subtilis	Bacillus subtilis
Ca	Calcium
C.	Clostridium
CK	Creatinkinase
Cu	Kupfer
Cys	Cystin
E. coli	Escherichia coli
E. faecium	Enterococcus faecium
Fe	Eisen
FV	Futtermittelverwertung
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
His	Histidin
HKT	Hämatokrit
Ig	Immunglobulin
Ile	Isoleucin
IL	Interleukin
J	Jod
GALT	Gut associated lymphatic tissue
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-colony-stimulating factor
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HCL	Salzsäure
K	Kalium
KbE	Kolonie-bildende-Einheiten
kDA	Kilodalton
KGW	Kilogramm Körpergewicht
L.	Lactobacillus
Leu	Leucin
L. lactis	Lactococcus lactis
L-LDH	L-Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MAT	Milchaustauscher
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	mean corpuscular volume
Mg	Magnesium
Met	Methionin
Mio.	Millionen
Mn	Mangan
Mrd.	Milliarden
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid

Na	Natrium
Nfe	Stickstoff freie Extraktstoffe
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
P	Phosphat
PB	Probiotikum
Phe	Phenylalanin
PMN	Polymorphonucleäre Zellen
p.p.	post partum
Rfa	Rohfaser
Rfe	Rohfett
RP	Rohprotein
S.	Saccharomyces
S. bovis	Streptococcus bovis
SPF	spezifisch keimfrei
Spp.	Subspezies
tägl.	tägliche
Th1-Zellen	T-Helferzellen 1
Thr	Threonin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Trp	Tryptophan
TS	Trockensubstanz
TZ	tägliche Zunahmen
U	Units
u.a.	unter anderem
uS	ursprüngliche Substanz
VA	Varianzanalyse
v.a.	vor allem
Val	Valin

A Einleitung und Aufgabenstellung

Die Ursprünge der Verwendung von Probiotika liegen im Griechenland der Antike. Metchnikoff (1907) war in der Neuzeit der erste, der die positiven Wirkungen der milchsäurebildenden Bakterien entdeckte.

Heute versteht man unter Probiotika – der Begriff stammt von Parker 1974 - lebende Mikroorganismen, die für den Wirt von Nutzen sind, indem sie das intestinale Gleichgewicht verbessern. Bei den Prebiotika handelt es sich dagegen um Nahrungsbestandteile, die dem Wirt nützen, indem sie selektiv das Wachstum oder die Aktivität einer oder mehrerer Bakterienarten im Colon stimulieren (Gibson und Roberfroid, 1995). Pro- und Prebiotika können einzeln oder in Kombination über das Futter zugesetzt werden, um beim Tier durch die Modifikation der Darmflora eine Verbesserung der Gesundheit, und damit auch der Leistung zu erzielen. Bei landwirtschaftlichen Nutztieren stehen überwiegend Effekte wie Gewichtszunahme und Futterverwertung im Vordergrund. Bei Hund und Katze versucht man dagegen neben der positiven Beeinflussung der Darmflora darüber hinaus weitere extraintestinale Wirkungen zu erzielen.

Bei dem von uns zu untersuchenden Lactoferrin, einem prebiotisch wirksamen Glycoprotein, handelt es sich um eine Substanz, deren Anwendung noch nicht verbreitet ist. Es existieren jedoch umfangreiche in vitro-, und auch einige in vivo-Untersuchungen, die eine offenbar äußerst potente Wirkung von Lactoferrin auf den Organismus in Bezug auf ein antimikrobielles, antivirales, antimykotisches, antioxidatives und antientzündliches Spektrum vermuten lassen.

Mögliche gesundheitsfördernde Wirkungen von Lactoferrin sollen in der vorliegenden Arbeit am Modell der mutterlosen Aufzucht von neonatalen Beagle-Welpen geprüft werden.

Mit Hilfe dieses Modells kann eine Standardisierung der Versuchsbedingungen gewährleistet werden, ohne dass Variabilitäten bezüglich Wurfgröße, Milchleistung des Muttertieres oder ungleichmäßige Milchaufnahme der Welpen die Auswertung beeinflussen können.

Ziel des Versuches war es herauszufinden, ob und - wenn ja - in welchem Umfang Lactoferrin intestinale und/oder extraintestinale Wirkungen bei Welpen entfaltet.

Zur Beantwortung der genannten Frage, sollte in bestimmten Abständen die Futtermittelaufnahme, Gewichtsentwicklung und Futterverwertung, die mikrobielle Zusammensetzung der Faeces, deren Lactat- und Ammoniakgehalt, sowie der Kot-pH und die Trockensubstanz bestimmt werden. In der 4., 8., 10., 12. und 14. Woche sollte zudem das rote und weiße Blutbild der Welpen untersucht werden.

B Literaturübersicht

1 Der Begriff Probiotikum

1.1 Geschichtliche Entwicklung

Der Begriff Probiotikum, abgeleitet von der griechischen Bezeichnung "für das Leben", wurde erst in neuerer Zeit für Mikroorganismen geprägt, die mit der Intention über das Futter verabreicht werden, im Verdauungstrakt von Mensch und Tier gesundheitsfördernde Wirkungen zu erzielen.

Der russische Wissenschaftler und Nobelpreisträger Metchnikoff führte bereits 1907 die durchschnittlich sehr lange Lebensdauer der bulgarischen Bevölkerung auf deren häufigen Verzehr fermentierter Milchprodukte zurück. Nach Untersuchungen am Pasteur-Institut in Paris, bei denen er die Bakterien isolierte und deren Wirksamkeit in in vivo-Experimenten untersuchte, schrieb er in seinem Buch "Die Verlängerung des Lebens" milchsäurebildenden Mikroorganismen die Fähigkeit zu, die toxischen Produkte der Mikroflora im Colon zu reduzieren, „abträgliche Keime“ im Darm zurückzudrängen und die Belastung des Organismus durch deren schädliche Stoffwechselprodukte zu vermindern. Damit schaffte er die Basis des heutigen Einsatzes der Probiotika. Metchnikoff selbst verwendete ein grampositives Bakterium, das er *Bacillus bulgaricus* nannte, welches wahrscheinlich dem heutigen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* entspricht. Ironischerweise gilt gerade dieses Bakterium heute nicht mehr als Probiotikum, da es im Dünndarm bereits größtenteils verdaut wird.

1974 definierte Parker erstmals die Bezeichnung „probiotics“. Für ihn waren Probiotika lebende Mikroorganismen oder Substanzen, die eine den Antibiotika gegensätzliche Wirkung haben und damit das intestinale mikrobielle Gleichgewicht fördern. Damit war ein großer Schritt in Hinblick auf ein besseres Verständnis des Zusammenspiels zwischen Bakterien und Wirt getan. Parker erreichte es, dass Mikroorganismen nicht mehr ausschließlich als Krankheitserreger angesehen wurden.

Seitdem wurde die Definition mehrmals modifiziert. Fuller sah es 1989 als angebracht an, den Begriff "Substanzen" aus der damals existierenden Definition

herauszunehmen, da er in Hinblick auf die Verwendung der Antibiotika als missverständlich gelten könnte. Der Begriff Probiotikum wurde von ihm auf lebende Mikroorganismen, die das mikrobielle Gleichgewicht im Darm des Wirtes verbessern und damit dem Wirt von Nutzen sind, eingeschränkt. 1992 definierten Havenaar und Huis in't Veld Probiotika als lebende Mikroorganismen (einzelne Stämme oder Mischkulturen), die für ihren Wirt nützlich sind, indem sie einen förderlichen Effekt auf Verhütung und Behandlung spezifisch pathogener Konditionen haben. Außerdem sollten sie die gesundheitlichen Eigenschaften der unverdaulichen Mikroflora verbessern. Guarner und Schaafsman ergänzten 1998 diese Definition um die Kriterien, dass die Mikroorganismen in ausreichender Menge verzehrt werden und gesundheitsfördernde Wirkungen entfalten, die über die der Grundnahrungsmittel hinausgehen.

1.2 Heute gültige Definition

Hauptsächlich basierend auf der Definition von Fuller (1989), versteht man heute unter einem Probiotikum lebende Mikroorganismen, die, in ausreichender Menge aufgenommen, einen positiven Effekt auf das Gleichgewicht der intestinalen Mikroflora ausüben. Eine sehr aktuelle Definition stammt von Salminen (1998), welche v.a. in Hinblick auf die menschliche Ernährung etabliert wurde. Danach ist ein Probiotikum ein lebender mikrobieller Nahrungsbestandteil, der die Gesundheit fördert. Demnach verlangt diese Definition nachweisbare gesundheitliche Vorteile durch die Aufnahme der Mikroorganismen, eine Forderung, deren Nachweis natürlich nicht einfach zu erbringen ist.

Das Probiotikum muss darüber hinaus weitere Kriterien erfüllen.

Es darf weder im Magen noch im Dünndarm absorbiert oder hydrolysiert werden.

Es muss das Wachstum nützlicher Bakterien fördern.

Es soll die Mikroflora in einer Weise verändern, so dass eine gesündere Zusammensetzung derselben resultiert.

In erster Linie handelt es sich um milchsäurebildende Bakterien, v.a. Lactobacillen und Bifidobakterien. Aber auch bei Enterococcen, Streptococcen, Bacillen, Propionibakterien, Bacteroides spp., bei vielen Pilzen und Hefen können probiotische Wirkungen nachweisbar sein. Das Probiotikum kann aus einem oder

mehreren Mikroorganismen-Stämmen zusammengesetzt sein. Die folgende Tabelle zeigt eine Auswahl häufig verwendeter probiotischer Mikroorganismen.

Tabelle 1: Häufig als Probiotika verwendete mikrobielle Spezies

Lactobacillen	Bifidobakterien	Enterococcen	Saccharomyceten	Lactococcen
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. boulardi</i>	<i>L. lactis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>E. faecium</i>		
<i>L. reuteri</i>	<i>B. breve</i>			
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>			
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>			
<i>L. plantarum</i>	<i>B. thermophilum</i>			
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. animalis</i>			

Es gibt viele Kriterien für die Effizienz probiotischer Produkte. Beispielsweise sollten sie dem Konsumenten nutzen, weder pathogene noch toxische Wirkungen ausüben und eine große Anzahl lebender Zellen beinhalten, die weder durch die Lagerung noch den Gebrauch signifikant dezimiert werden können.

1.3 Die probiotische Grundidee

Die probiotische Grundidee beruht auf wichtigen Grunderkenntnissen.

Collins und Carter bewiesen 1978 in ihren Studien, dass pathogenfreie Tiere zwar lebensfähig, jedoch sehr viel stärker anfällig für Infektionen sind. Das Immunsystem dieser Tiere befindet sich in einem schlechteren Zustand da die kompetitive Kolonisation der Magen-Darm-Flora, die eine effektive Barriere gegen Infektionen darstellt, fehlt. Gerät die gesunde Flora aus dem Gleichgewicht, können die schädlichen Mikroben und deren Metabolite zu Leberschäden, genotoxischen, mutagenen oder karzinogenen Aktivitäten führen. Darmwirksame Antibiotika, die die gesunde Darmflora zerstören, erhöhen die Wahrscheinlichkeit dieser Entwicklung (Freter 1955). Die orale Zuführung von Faeces ermöglicht es, den antibiotikainduzierten Durchfall zu reduzieren bzw. die Gefahr einer Infektion des Körpers mit pathogenen Keimen zu verringern, da durch Verabreichung förderlicher Bakterien das gesunde Gleichgewicht wiederhergestellt werden kann. (Swass et al. 1984).

Die probiotische Idee entwickelte sich aus der Erkenntnis der Effekte der kolonialisierenden Mikroben im Körper, sowie dem Bestreben, deren positive Aktivitäten zu unterstützen und gleichzeitig die negativen zu verhindern.

Dieses probiotische Konzept wird durch die vielen positiven Resultate von klinischen human- und tiermedizinischen Studien bekräftigt.

2 Prebiotika

Der Begriff Prebiotikum wurde erstmals 1995 von Gibson und Roberfroid geprägt. Man versteht darunter einen Nahrungsbestandteil, der für den Wirt in der Weise von Nutzen ist, indem er selektiv das Wachstum oder die Aktivität einer oder mehrerer Bakterien im Colon stimuliert. Durch Metabolisierung des Prebiotikums wird die Anzahl der erwünschten Bakterien im Darm erhöht. Häufig werden unter Prebiotika nur bestimmte Kohlenhydrate, wie Oligosaccharide, Fructooligosaccharide, lange Polysaccharide und kleine Zuckeralkohole verstanden.

Entscheidend sind jedoch die folgenden Kriterien, wodurch weitere Substanzen in den Begriff eingeschlossen werden.

Eine prebiotische Substanz darf im Magen oder Dünndarm weder absorbiert noch hydrolysiert werden, muss selektiv Bakterien fördern, die für den Wirt von Nutzen sind, muss die Mikroflora positiv verändern und wird durch die Darmbakterien metabolisiert (Roberfroid 1998).

Vorteile bei der Anwendung von Prebiotika liegen u.a. darin, dass es sich bei diesen nicht um lebende Organismen handelt, die unter Lagerung und Transport leiden könnten. Außerdem wird die Herstellung prebiotischer Produkte, die unverändert den Gastrointestinaltrakt passieren, erleichtert. Die bei Probiotika unerlässliche tägliche Zufuhr, um tatsächliche Wirkungen zu entfalten, ist bei Prebiotika nicht in gleichem Maße nötig. Der Nachteil liegt darin, dass eine entsprechend nützliche Flora im Intestinum zumindest in Ansätzen bereits vorhanden sein muss.

Eine interessante Möglichkeit besteht in der Kombination von Pro- und Prebiotikum, man spricht von einem Symbiotikum. Ein Symbiotikum ist dem Wirt von Nutzen, indem es das Überleben und die Implantation lebender mikrobieller Nahrungsbestandteile im Gastrointestinaltrakt fördert.

3 Wirkung der Probiotika

Guillot erklärte 1990 die positiven Wirkungen der Probiotika mit einer Steigerung der Resistenz gegen die Besiedlung des Verdauungstraktes mit pathogenen Keimen („Barriereeffekt“), vermindertem Eindringen der krankmachenden Keime in die darmassoziierten Lymphknoten und damit einer Stimulation der lokalen Darmimmunität. Er registrierte die Verringerung des pH-Wertes im Darm, die Eindämmung der Produktion schädlicher Metaboliten, die Bildung von Enzymen, Wasserstoffperoxyd und sogar nativen Antibiotika (Bakteriozine) als weitere positive Effekte der Probiotika. In der Tiermedizin spielen bei der Besiedelung des Darmes mit pathogenen Keimen besonders die Enterobacteriaceen eine große Rolle. Einigen Autoren zufolge sollen Probiotika um bakterielle Adhäsionsstellen konkurrieren und zusätzlich Toxinrezeptoren der intestinalen Mukosa zerstören, wodurch die schädlichen Wirkungen bakterieller Toxine reduziert werden (Conway et al. 1997, Goldin et al. 1992). Viele Pathogene sind äußerst empfindlich gegenüber den mit Hilfe der Probiotika gebildeten flüchtigen Fettsäuren. Letztere entlasten den Organismus, da bei einer geringeren Anzahl pathogener Keime im Darm auch weniger schädliche Stoffwechselprodukte wie Ammoniak und biogene Amine anfallen, die ins Blut übertreten und von der Leber entgiftet werden müssen (Gedek 1993).

In vitro hemmen milchsäureproduzierende Bakterien viele unterschiedliche Bakterien, darunter *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* und *Clostridium difficile* (Filho-Lima et al. 2000, Silva et al. 1999). Eine verkürzte Durchfalldauer unter Probiotika-Therapie wurde nicht nur bei den oben genannten Rotavirus-Durchfällen, sondern u.a. auch bei den durch Clostridien induzierten Durchfällen beobachtet.

Eine Wirkung auf den Gesamtorganismus wurde zuerst von Simoes-Nunes (1994), sowie Nousiainen und Suomi (1991) postuliert. Eine Lactobacillenfütterung soll die Immunglobulin-G-Synthese steigern und zu einer Leukozytenvermehrung führen. Durch orale Verabreichung von Lactobacillen ließ sich bei durch Rotavirus hervorgerufenem Durchfall eine Verbesserung der spezifischen und unspezifischen Immunantwort und damit eine Verkürzung der Durchfallperiode nachweisen. Aus diesem Grund gibt es mehrere Veröffentlichungen, die den Effekt unterschiedlicher Probiotika (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Peptostreptococcus*,

Bifidobacterium bifidus) auf die IgA-Synthese in Menschen und Ratten beschreiben. Obwohl die einzelnen Resultate variieren, wurde generell eine erhöhte IgA-Produktion während der Behandlung festgestellt. Beispielsweise erhöhten *L. casei* und *L. acidophilus* dosisabhängig die Anzahl der IgA-produzierenden Plasmazellen. In einer anderen Studie erhöhte *L. casei* deutlich die IgA-Antwort nach Inokulation von *Salmonella typhimurium*, wobei diese erhöhte Sekretion dann ausreichte, um die Infektion zu verhindern (Perdington et al. 1991).

Es ist bisher nur wenig über den Effekt der Probiotika auf das zelluläre Immunsystem bekannt. In einer Studie wurde Mäusen milchsäurebildende Bakterien und Stimulantien für B- und T-Zellen der Milz verabreicht. Die Proliferation der Immunzellen der Probiotikumsgruppe war deutlich erhöht (De Simone et al. 1993). Weitere Auswirkungen der Probiotika auf die zelluläre Immunantwort wurden auch im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen beobachtet.

Die Verabreichung von Probiotika verändert bei Mensch und Tier die Zytokinproduktion der Immunzellen (Ha et al. 1999, Miettinen et al. 1998, Nicaise et al. 1993, Tejada-Simon et al. 1999a und 1999b). Beispielsweise wurden die Effekte vier kommerziell erhältlicher Stämme von *Streptococcus thermophilus* (im Yoghurt) auf die Zytokinproduktion einer Makrophagenzelllinie und einer T-Helferzelllinie mit den aktiven Stämmen von *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium adolescentis* und *B. bifidum* verglichen (Marin et al. 1998). Durch die aktiven Stämme wurde die Produktion verschiedener Interleukine und TNF-alpha induziert.

Auch die unspezifische Immunität kann durch Probiotikagabe positiv beeinflusst werden. Dabei spielt in erster Linie die erhöhte Phagozytenaktivität und die verbesserte Zytokinproduktion eine Rolle. In den meisten Studien wurden dafür die Phagozyten aus den behandelten Tieren isoliert. In einer von Neumann et al. 1998 durchgeführten Untersuchung wurde jedoch ein Stamm *L. acidophilus* aus einem Neugeborenen gewonnen und in pathogenfreie Mäuse überführt, die eine Woche später intravenös mit *E. coli* infiziert wurden. Die durch die Phagozyten erreichte *E. coli*-Clearance war bei den behandelten Mäusen deutlich verbessert.

Im Tiermodell konnten auch antikarzinogene und antimutagene Aktivitäten verschiedener Probiotika festgestellt werden. Insbesondere wurde bislang die Wirkung von Probiotika in Bezug auf Colonkrebs untersucht. Es wurde ein Hemmeffekt sowohl von Pro- als auch Prebiotika auf die Bildung von aberranten Krypten (präkarzinösen Läsionen) und Tumoren festgestellt (Brady et al. 2000).

Die Vorteile in der Probiotikatherapie liegen bei den geringen Kosten, den vielen unterschiedlichen Wirkmechanismen und der Möglichkeit, Antibiotikaresistenzen zu verhindern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Pro- und Prebiotika eingesetzt werden können, um lokale immunologische Dysfunktionen im Darm auszugleichen, die Barrierefunktion der Mukosa zu stabilisieren, Infektionen durch pathogene Keime zu verhindern und den intestinalen Metabolismus positiv zu beeinflussen.

4 Einsatzgebiete der Probiotika

Probiotika werden sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch, einzeln oder in Kombination eingesetzt. In der Humanmedizin und im Kleintiersektor stehen gesundheitliche Aspekte im Vordergrund, im Nutztiersektor insbesondere die Verbesserung der Gewichtszunahmen und die Optimierung der Futterverwertung.

4.1 Einsatz in der Humanmedizin

Der Einsatz von Probiotika in der Humanmedizin erfolgt in der Regel dann, wenn bestimmte Faktoren die normale Gastrointestinalflora derart schädigen, dass der Patient eine erhöhte Krankheitsanfälligkeit aufweist. Dies ist u.a. bei Antibiotikagabe, bei verschiedenen Medikationen und chirurgischen Eingriffen der Fall. Außerdem stellen Probiotika eine wirkungsvolle begleitende Therapie unterschiedlicher Durchfallerkrankungen dar, hervorgerufen z.B. durch Rotavirus, Clostridium difficile, E. coli, Shigella, Salmonella, Vibrio cholerae oder bacterial overgrowth des Dünndarms, HIV, sowie der Saccharose und Maltose-Intoleranz. Ziel der Therapie ist die Erhöhung an Zahl und Aktivität derjenigen Mikroorganismen des Darms, die gesundheitsfördernde Eigenschaften besitzen, bis die normale Darmflora wiederhergestellt ist. Daneben gibt es auch Krankheitskomplexe, wie z.B. die Helicobacter pylori-Gastritis, bei denen sich die Probiotika-Therapie als wirkungsvoll herausgestellt hat, wobei der Wirkmechanismus jedoch noch nicht völlig klar ist.

Ein relativ neues Gebiet stellt die Prophylaxe der Colon-Karzinome dar. Es zeigt sich zunehmend, dass die intestinale Flora Enzyme bilden kann, die die Umwandlung

eines Präkarzinogens in aktive Karzinogene bewirken. Bestimmte Mikroorganismen können den Wirt vor der karzinogenen Aktivität schützen, wobei dabei die folgenden Mechanismen postuliert werden. Probiotika könnten die für die Umwandlung verantwortlichen Bakterien oder die Tumorzellformation direkt hemmen bzw. direkt an die Karzinogene binden und sie damit inaktivieren (Goldin et al. 1980, Goldin 1990).

Neben dem klinisch-therapeutischen Einsatz werden Probiotika jedoch in Japan und in Europa aus prophylaktischen Gründen bereits vielen Produkten im Nahrungsmittelbereich zugesetzt. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Milchprodukte und deren Derivate.

4.2 Einsatz bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Bereits in den 60er Jahren kam es zur kommerziellen Nutzung der Pro- und Prebiotika bei lebensmittelliefernden Tieren. 1968 erreichte King eine signifikante Wachstumsstimulation bei Schweinen, indem er ihr Futter mit *Lactobacillus acidophilus* versetzte. Später wurde die Anwendung der Probiotika bei landwirtschaftlichen Nutztieren häufiger empfohlen, um den Gebrauch der Antibiotika zurückzudrängen.

Die Hauptziele des Einsatzes der Probiotika bei landwirtschaftlichen Nutztieren sind neben der Verbesserung der Zunahmen und der Optimierung der Futterverwertung die Reduzierung der Jungtierverluste durch Durchfallerkrankungen und die Verbesserung der Schlachtkörperqualität. Die in der Tierernährung eingesetzten Probiotika müssen laut Richtlinie 70/524/EWG über Zusatzstoffe in der Tierernährung und Richtlinie 87/153/EWG zur Festlegung von Leitlinien zur Beurteilung von Zusatzstoffen EG-einheitlich als mikrobielle Futterzusatzstoffe zugelassen sein.

Die Mehrheit der wissenschaftlichen Untersuchungen und Praxisstudien belegt den positiven Einfluss der Probiotika. Aus der Tabelle 2 wird aber ebenfalls ersichtlich, dass in einigen Versuchen durch die Verwendung von Probiotika keine zusätzlichen Wirkungen erzielt wurden. Außerdem wurden in verschiedenen Arbeiten selbst bei Applikation des gleichen Probiotikums zum Teil gegensätzliche Effekte erzielt.

Tabelle 2: Einfluss verschiedener Probiotika auf die Leistung einiger landwirtschaftlicher Nutztiere (abgeändert nach Busch et al. 1999)

Produktionszweig	Tägliche Zunahme (% zur Kontrolle)	Futtermittelverbrauch (% zur Kontrolle)
Ferkelaufzucht	+ 4,8 (-8,1 bis +24,3)	- 1,5 (+3,1 bis -9,3)
Kälberaufzucht	+ 5,4 (-5,3 bis +21,7)	- 2,5 (+3,6 bis -7,9)
Schweinemast	+ 3,7 (-0,3 bis +6,7)	- 5,1 (-1,4 bis -7,1)
Rindermast	+ 3,4 (- 4,3 bis + 7,2)	- 2,7 (+ 7,6 bis - 4,7)

4.2.1 Ferkel und Mastschweine

Bei den Mastschweinen und Ferkeln traten in einigen Fällen, beispielsweise bei der Gabe von *L. reuteri*, sogar abträgliche Effekte wie verringerte Gewichtszunahmen durch schlechtere Futtermittelverwertung auf. Kluber verzeichnete außerdem 1985 bei Applikation des M 74 Stammes von *Enterococcus faecium* eine erhöhte Ferkelsterblichkeit, die mit einer Überdosierung des Probiotikums erklärt werden könnte, wobei schon 1957 von Gordon et al. berichtet wurde, dass eine Überdosierung bei Menschen laxierende Wirkung habe. Im Gegensatz zu der Kluber-Studie gab es jedoch mindestens 6 Studien, die bei Gabe des M 74 Stammes von *Enterococcus faecium* positive Wirkungen erzielten (Moen 1982). Durch Zufütterung des *Enterococcus faecium*-Stammes C 68 erreichten Krarup (1987) und Maeng et al. (1989) u.a. einen Rückgang der Krankheitshäufigkeit. Kimura et al. erzielten 1983 in ihrer Untersuchung durch die Applikation von 1 g lebendem *B. pseudolongum* einen Rückgang der Durchfallhäufigkeit und einen generell verbesserten Gesundheitsstatus. Diese Effekte waren jedoch in den Untersuchungen von Kornegay und Thomas 1973 nicht aufgetreten. Ebenso kontrovers verliefen die Untersuchungen mit *L. acidophilus*. Mehrere Autoren berichteten von positiven Wirkungen, Kornegay jedoch nicht.

Diese Diskrepanzen könnten auf unterschiedliche Faktoren zurückzuführen sein, insbesondere Rationsgestaltung, Hygienebedingungen und Leistungsniveau, Alter der Tiere, sowie dem Ausgangsstatus der mikrobiellen Besiedelung und Variationen

des verwendeten Stammes. Eine genaue Vorhersage der zu erwartenden Probiotika-Effekte ist daher nicht möglich. Erschwerend kommt hinzu, dass nur wenige Autoren statistische Auswertungen vorgenommen haben.

Ähnlich wie bei der Anwendung von Antibiotika scheinen schlechte Hygieneverhältnisse und Stress den probiotischen Einfluss zu verstärken. Jørgensen fand 1988 heraus, dass *E. faecium* das Wachstum von Schweinen nur dann stimulierte, wenn diese suboptimalen Umweltverhältnissen ausgesetzt waren.

Im folgenden einige Beispiele für Einzeluntersuchungen.

Tabelle 3: Nutritive Effekte einiger Probiotika in der Ferkelaufzucht
(abgeändert nach Eidelsburger 1991)

Handelsname	Keimart	Dosierung	Wirkung	Autor
	<i>L. acidophilus</i> und <i>L. faecium</i>	je 6 x 10 ⁹ KbE/Tier/d	tägl. Zunahmen gesteigert, keine statistischen Angaben	Tournut (1989)
	<i>B. subtilis</i>	70 und 140 ppm	+2 bis 4% FV -8 bis -11% TZ	Pollmann et al. (1984)
	<i>B. subtilis</i>	70 ppm	+2% FV +0% TZ	Peo (1987)
Toyocerin	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>	25, 50 und 100 ppm	-2 bis -4% FV +3 bis 10% TZ	Roth und Kirchgessner (1988a)
Toyocerin	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>	50 ppm	-6 bis 0% FV -2 bis -8% TZ	Eidelsburger (1991)

FV: Futtermittelverwertung
TZ: tägliche Zunahme

Tabelle 4: Nutritive Effekte einiger Probiotika bei Absatzferkeln
(abgeändert nach Molitor 1998)

Handelsname	Keimart	Dosierung	Wirkung	Autor
	<i>L. acidophilus</i>	5×10^6	positiv	Risley et al. (1991)
Microferm	<i>Enterococcus faecium</i> (Stamm M 74)	$0,5/1,0/2,0 \times 10^6$ KbE/g Futter	positiv bei $0,5 \times 10^6$ +/- bei höheren Dosierungen	Roth und Kirchgessner (1986)
Yea-sacc Lacto-saxx	<i>S. cerevisiae</i> <i>L. acidophilus</i> <i>E. faecium</i> <i>Bacillus subtilis</i>		positiv	Jöst und Bracher (1992)
Toyocerin	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>	$0,5 \times 10^6$ KbE/g Futter	geringere Zunahmen, geringere Endgewichte	Eidelsburger et al. (1992)
	1) <i>E. faecium</i> und <i>Lactobacillus fermentum</i> 2) <i>Lactobacillus acidophilus</i> und <i>L. fermentum</i> 3) <i>Lactobacillus acidophilus</i> und <i>L. fermentum</i>	Je 10^9 KbE/Tier/Tag 10^8 und 10^9 KbE/Tier/Tag 10^9 und 10^7 KbE/Tier/Tag	Zunahmen tendenziell erhöht	Nousiainen und Suomi (1991)

Tabelle 5: Nutritive Effekte bei Mastschweinen
(abgeändert nach Molitor 1998)

Handelsname	Keimart	Dosierung	Wirkung	Autor
Toyocerin	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>	$0,5 \times 10^9$ KbE/kg (Vormast); $0,2 \times 10^9$ KbE (Endmast)	tägliche Zunahmen gesteigert, bes. deutlich in der Vormast	Hartjen (1994)

4.2.2 Kälber, Kühe und Mastbullen

Über die Anwendung milchsäurebildender Bakterien bei Rindern liegen nur relativ wenige Studien mit zudem sehr unterschiedlichen Ergebnissen vor.

Einige Autoren berichten dabei von positiven Auswirkungen auf Milchproduktion, Kälber- und Bullenwachstum, sowie die Futtermittelverwertung. Slyter (1976) hält es jedoch für schwierig, diese Effekte bei Milchkühen zu erklären, da Lactobacillen Lactat bilden, welches im Pansen eine Azidose hervorrufen könnte. Dennoch könnten auch bei Kühen abträgliche Keime durch Lactobacillen gehemmt werden.

Dagegen wurde der Einsatz von Hefen bei laktierenden Kühen bereits 1925 erprobt.

In den 50er Jahren etablierte sich die Beigabe lebender Hefe zum Kraftfutter der Kühe. Grundlage hierfür waren die Studien von Renz, Beeson und Perry, die durch den Zusatz von Hefe eine Milchproduktionssteigerung von 1,1 kg pro Tag und einen Gewichtszuwachs der Mastbullen von 6% voraussagten (Renz 1954, Beeson und Perry 1952). Viele Studien berichten jedoch nur über einen viel geringeren oder gar keinen Zuwachs. In neuerer Zeit gab es eine Reihe von ebenfalls kontroversen Veröffentlichungen über *Aspergillus oryzae* (Harris et al. 1983, van Horn et al. 1994, Newbold 1990). Newbold fasste 1990 acht der Untersuchungen zusammen und ermittelte eine im Durchschnitt um 4,3% höhere Milchproduktion, die sich in erster Linie in der frühen Laktation bemerkbar macht. Im Gegensatz dazu wurden von Wallace und Newbold 1993 18 Laktationsstudien überarbeitet, die eine Milchmengensteigerung zwischen 6,8 und 17,4% verzeichnen.

In Hinblick auf Mastbullen erzielten die Studien sehr kontroverse Ergebnisse, die sich als stark abhängig von der verwendeten Hefe, dem Futter und den Lebensumständen der Tiere erwiesen.

Bei Kälbern wurde die reine Gabe von *Bacillus subtilis* mit einem Kombinationspräparat aus *Bacillus subtilis* und Lactobacillen (*lactis* und *acidophilus*) verglichen. Das Kombinationspräparat wies keine Vorteile auf, jedoch führte das reine *Bacillus subtilis*-Präparat zu einer erhöhten Wachstumsrate (Jennie et al. 1991). Die statistischen Auswertungen von Roth und Kirchgessner ermöglichten es 1988 für *Bacillus cereus* eine notwendige Menge von 10^8 KbE/g Futter für optimale Zunahmen der Kälber festzulegen. Auch bei Kälbern sind die Umweltbedingungen von großer Wichtigkeit. Unten sind tabellarisch weitere Effekte bei Kälbern und Mastbullen zusammengefasst.

Tabelle 6: Weitere Beispiele der Effekte bei Kälbern

Handelsname	Keimart	Dosierung	Wirkung	Autor
	L. acidophilus und L. lactis		keine Wirkung	Morrill (1977)
	L. acidophilus	5,5 x 10 ⁶ KbE/g x 2,2 g/kg Futter	schnellere Gewichtszunahmen	Morrill (1977)
Toyocerin	Bacillus cereus var. toyoi	1,0 x 10 ⁹ KbE/g Futter	gesteigerte tägl. Zunahmen	Hartjen (1994)

Tabelle 7: Beispiele der Effekte bei Mastbullen

Handelsname	Keimart	Dosierung	Wirkung	Autor
Toxocerin	Bacillus cereus var. toyoi	1,2 x 10 ⁹ KbE/Tier/Tag	erhöhte tägl. Zunahmen	Daenicke und Lebzien (1994)

4.3 Einsatz bei Hund und Katze

In der Kleintierpraxis stehen – wie bereits erwähnt - die gesundheitlichen Aspekte der Probiotika im Vordergrund.

Ein beschleunigtes Wachstum ist bei Kleintieren absolut unerwünscht, es birgt die Gefahr einer Beeinträchtigung der Skelettgesundheit. Das Knochenwachstum kann mit der Körpermasseentwicklung nicht schritthalten, Knochen und Gelenke werden überbelastet und geschädigt. Außerdem beinhalten erhöhte Gewichtszunahmen in jedem Fall die Gefahr der Adipositas. Aus den oben genannten Gründen kann auch eine verbesserte Futtermittelverwertung beim Kleintier nicht als wünschenswert erachtet werden. Analog zur Humanmedizin bzw. Humanernährung stehen bei Hund und Katze mögliche Wirkungen auf die Darmflora im Sinne einer Stabilisierung im Vordergrund, mit dem Ziel die Eubiosis entweder wiederherzustellen oder zu erhalten. Aus diesem Grund liegt hier der Hauptakzent auf dem prophylaktischen und/oder therapeutischen Einsatz v.a. begleitend zur Antibiotikatherapie und bei Durchfallerkrankungen. In letzter Zeit erfolgt die Gabe auch häufiger aufgrund erhoffter systemischer gesundheitlicher Wirkungen, insbesondere der Verbesserung des Immunsystems und damit der Reduzierung der Krankheitshäufigkeit.

Ziel der Verabreichung der meisten Pro- sowie Prebiotika liegt in der Förderung einer entsprechenden Lactoflora, allerdings steht bei carnivoren Spezies im adulten Organismus im Gegensatz zu den oben angesprochenen Nutztieren nur wenig Substrat für eine Lactoflora zur Verfügung. Bei Saugwelpen ist jedoch eine Lactoflora anzutreffen, da die Muttermilch Lactose als Substrat für diese Flora enthält.

Daher können mögliche positive Effekte entsprechender Pro- und Prebiotika am besten in dieser Altersgruppe erreicht werden.

5 Lactoferrin als prebiotische Substanz

5.1 Vorkommen

Entdeckt wurde Lactoferrin 1939 von Sorensen und Sorensen, 1960 wurde es von Groves und Johansson als wichtiger Bestandteil boviner und humaner Milch isoliert.

Lactoferrin ist ein eisenbindendes, aus 692 Aminosäuren bestehendes Glycoprotein der Transferrinfamilie, das von Epithelien und im Blut von neutrophilen Granulozyten gebildet wird. Es befindet sich in unterschiedlichen Konzentrationen in fast allen Körpersekreten und auf Schleimhäuten (Speichel, Tränenflüssigkeit, Galle, Samenflüssigkeit, Schleimhautexkreten, Bronchialdrüsen, Pulmonalsekret (0,5 mg/ml) Endometrialdrüsen, Magen-Darmdrüsen, Parotisflüssigkeit (14 mg/ml)), hauptsächlich jedoch in der Milch, in der es, insbesondere im Kolostrum, Konzentrationen bis 7 mg/ml (human) aufweist. Kürzlich wurde eine Lactoferrinsynthese auch in menschlichem Nierengewebe nachgewiesen (Abrink et al. 2000). In erster Linie dient Lactoferrin der allgemeinen Immunabwehr. Bei bakteriellen Infektionen wird Lactoferrin durch Zytokinstimulation freigesetzt. Dabei wird nicht die Biosynthese von Lactoferrin stimuliert, sondern die Degranulation der neutrophilen Granulozyten (Rado et al. 1987). So kann während einer akuten Sepsis die Plasmakonzentration auf 0,2 mg/ml steigen, in gesunden Lebewesen liegt sie jedoch meist unter 1 µg/ml (Birgens 1985).

Demnach gibt es für Lactoferrin das stationäre Depot an der Schleimhautoberfläche, und das zirkuläre in den neutrophilen Granulozyten (Baggiolini et al. 1970, Bennett und Kokocinski 1978). Die Metabolisierung erfolgt in Leber und Milz.

5.2 Struktur des Lactoferrins

Alle Transferrine weisen eine ähnliche Struktur auf, die 1987 und 1989 erstmalig von Anderson et al. beschrieben wurde und, wie die Abbildung zeigt, mittels radiologischer Krystallographie dreidimensional dargestellt werden kann.

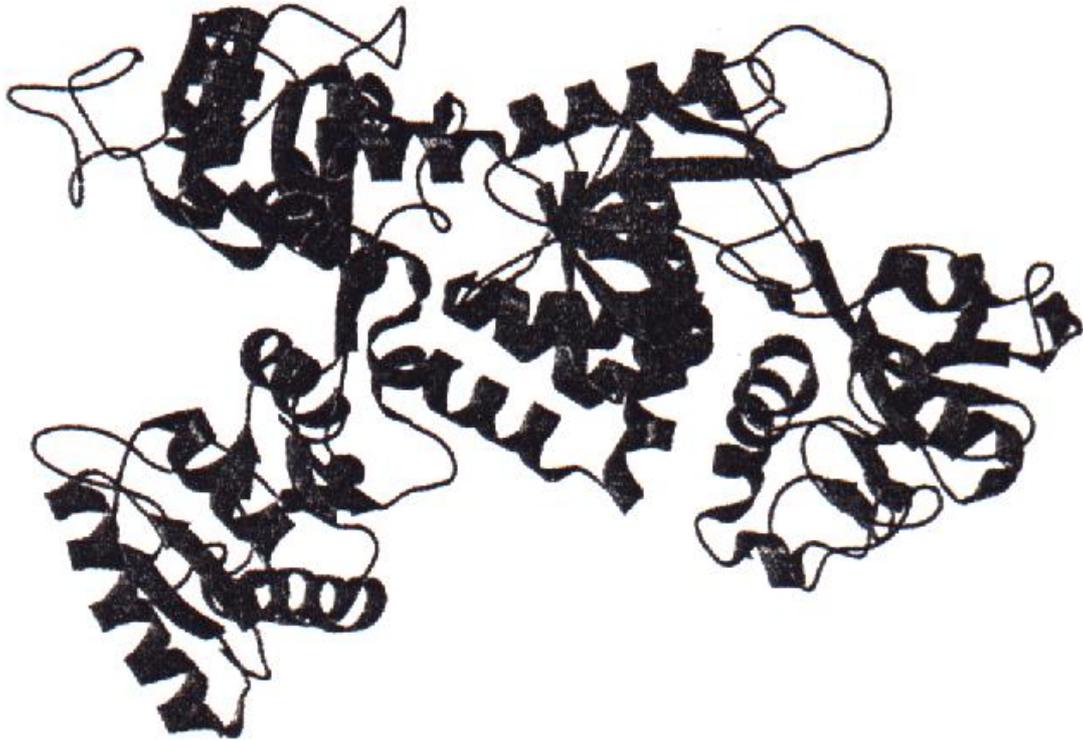


Abbildung 1: Lactoferrin, dreidimensional dargestellt
(aus Baker et al. 2002)

Es handelt sich um ein Glycoprotein mit 2, durch N-glycosidische Bindungen mit diesem verbundene Glycane, welches eine symmetrische Struktur mit 2 Lappen besitzt (Spik et al. 1982). Jeder der Lappen, die durch eine alpha-Helix miteinander verbunden sind, hat die Fähigkeit, mit Hilfe von einem Aspartat-, einem Histidin- und zwei Tyrosinresten ein 3-wertiges Eisenion zu binden. Demnach existieren eine eisenfreie apo-Form, eine monoferrische und die holo- oder diferrische Form. Die Bindungsstelle befindet sich in der Spalte zwischen 2 Domänen, aus denen jeder Lappen aufgebaut ist (Anderson et al. 1987). Natürlicherweise ist Lactoferrin zu 15 bis 20% mit Eisen gesättigt. Die Lappen besitzen untereinander eine

Sequenzhomologie von 40%. Zur Bindung ist jeweils ein Bicarbonat- oder Carbonation nötig (Harris 1986). Trägt Lactoferrin Eisenionen, so weist es eine geschlossene Form auf, im apo-Zustand jedoch meist eine offene. Bei dieser Konformationsänderung rotiert eine Domäne des N-Lappen um 54°. Eine Freisetzung des gebundenen Eisens findet bei einem ausreichend starken pH-Abfall, oder bei Reduktion des 3-wertigen zum 2-wertigen Eisenion statt.

Lactoferrin ähnelt strukturell dem Transferrin (Ainscough et al. 1980), die Sequenzhomologie beträgt ca. 60% (Baker 1994). Im Unterschied zum Transferrin besitzt es jedoch eine höhere Eisenaffinität, so dass eine Eisenbindung auch bei niedrigen pH-Werten möglich ist. Transferrin verliert sein gebundenes Eisen bereits bei einem pH von 6, Lactoferrin erst ab pH 3,5 (Peterson et al. 2000). Der Grund hierfür liegt in der Interaktion des N- mit dem C-Lappen, wodurch eine erhöhte Stabilität des N-Lappen erreicht wird. Das Molekulargewicht beträgt ca. 80 kDA.

Der pI liegt aufgrund einer basischen Region (positiv geladen) am N-terminalen Ende des Moleküls (Sequenz GRRRRS in humanem Lactoferrin) und der stark basischen interlobären Helix bei 8-9. Aus diesem Grund hat Lactoferrin die Fähigkeit, sich auf „pseudospezifische“ Art und Weise an viele saure (negativ geladene) Moleküle, darunter Heparin (Van Berkel et al. 1997) und Glucosaminoglycane (Mann et al. 1994) zu binden. Lactoferrine unterschiedlicher Spezies unterscheiden sich zu etwa 30 % in ihrer Aminosäuresequenz (Baker 1994), das bovine Lactoferrin ist dem humanen jedoch sehr ähnlich (Norris et al. 1986). Lactoferrin der unterschiedlichen menschlichen Organe ist antigenetisch gleich (Spik et al. 1982).

5.3 Lactoferrin-Rezeptorverteilung

Lactoferrinrezeptoren wurden bisher auf den unten aufgeführten Zellen und Gewebe nachgewiesen. Die Annahme, dass Lactoferrin über die Rezeptoren auch auf immunologische Faktoren Einfluss nimmt, erscheint berechtigt, wenn auch die genauen Mechanismen und Aufgaben der Rezeptoren noch ungeklärt sind.

Tabelle 8: Zellen und Gewebe, auf denen Lactoferrinrezeptoren nachgewiesen wurden

LF-Rezeptoren auf	Literatur
Bakterien	Bennett und Davis 1981
Intestinalem Gewebe	Iyer und Lønnerdal 1993
Monozyten/Makrophagen-System	Birgens et al. 1983 und 1984
Neutrophilen Granulozyten	Eda et al. 1997
Lymphozyten	Birgens et al. 1984
Thrombozyten	

Das in der Milch enthaltene Lactoferrin wird im Verdauungstrakt des Neugeborenen in bisher unbekanntem Ausmaß katabolisiert, wobei biologisch aktive Peptide (Lactoferricine) entstehen. Wahrscheinlich variiert der Umfang des Abbaus mit Spezies und Alter.

5.4 Lactoferricin

Lactoferrin besitzt an seinem N-Terminus eine antimikrobielle Sequenz, das Lactoferricin. Je nach Spezies enthält diese sehr basische Sequenz (viele Argininreste) zwischen 25 (bovin) und 47 (human) Aminosäuren (Tomita et al. 1998), die sich durch eine Disulfidbrückenbindung zwischen zwei Cystinresten zu einer Schleife formen (Bellamy et al. 1992). Im humanen Lactoferricin existieren zwei sehr stark basische Anteile, zum einen eine Folge von 4 Argininresten ganz am Anfang des Polypepids (Aminosäure 1-5) (Nibbering et al. 2001), zum anderen einen zur Schleife gehörigen Bereich (Vorland et al. 1998). Nach Untersuchungen von Naidu und Arnold 1994 scheint diese Sequenz eine 8mal stärkere antimikrobielle Aktivität als Lactoferrin zu besitzen und ist, im Gegensatz zu Lactoferrin, dessen antimikrobielle Aktivität durch Eisenzugabe getrübt wird, auch nach Eisenzugabe noch aktiv. Durch Zugabe von Pepsin oder sauren Proteasen wird Lactoferrin hydrolysiert und Lactoferricin frei. Bei oraler Applikation von Lactoferrin erreicht nur ein Teil des Lactoferrins unversehrt den Darm, während der andere durch Enzyme zu der Aminosäuresequenz Lactoferricin hydrolysiert wird.

Die antimikrobielle Wirkung des Lactoferricin liegt in erster Linie in seiner Bakterizidität begründet. In analoger Weise ist auch die bakterizide Wirkung von Lactoferrin auf die Aktivität dieser Sequenz zurückzuführen (s.u.). Bei in vitro-Untersuchungen konnte die Sequenz alle Testbakterien, sowohl grampositive, als auch gramnegative hemmen. In erster Linie wurden *E. coli*, *St. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus spp.* geschädigt (Bullen 1981). Zusammen mit Antibiotika, v.a. Rifampicin, Cefodoxime (Chimura et al. 1993), Erythromycin, Ampicillin und Chloramphenicol entwickelt Lactoferricin synergistische Effekte (Naidu und Arnold 1994). Darüber hinaus besitzt Lactoferricin auch Wirkungen gegenüber Pilzen und Protozoen.

5.5 Wirkungen von Lactoferrin

5.5.1 Beeinflussung des Eisenhaushalts

Die strukturelle wie auch biochemische Ähnlichkeit zu Transferrin erlaubt die Folgerung, dass Lactoferrin eine fundamentale Rolle als Eisencarrier im Eisenmetabolismus spielt. Bisher konnte hierfür jedoch kein Beweis gefunden werden, da Lactoferrin knockout-Mäuse normale Eisenparameter aufweisen (Ward et al. 2003) und ein Effekt bovines Lactoferrins auf die Eisenabsorption in Ratten nicht nachvollzogen werden konnte (Fairweather-Tait et al. 1987). Betrachtet man die geringen Lactoferrinkonzentrationen im Blut der Säugetiere, erscheint dies nicht verwunderlich. Dennoch halten manche Studien Lactoferrin für die Eisenabsorption im Darm von Bedeutung. Säuglinge, die Muttermilch ohne Lactoferrin erhalten hatten, nahmen wesentlich weniger Eisen auf, als Säuglinge mit normaler, Lactoferrin enthaltender, Muttermilch (Kawakami et al. 1991). Babynahrung, die mit Lactoferrin versetzt worden war, führte zu deutlich höheren Ferritin-Mengen im Serum als Babynahrung ohne Lactoferrin, ein Einfluss auf das rote Blutbild wurde jedoch nicht gesehen (Chierici et al. 1992). Laut Cox et al. (1979) besitzt der Bürstensaum Lactoferrin-Rezeptoren, durch die die Eisenaufnahme reguliert wird.

5.5.2 Antibakterielle Eigenschaften

Lactoferrin besitzt bakteristatische und insbesondere gegenüber gram-negativen Bakterien auch bakterizide Wirkungen. Der Grund hierfür liegt in den biochemischen Eigenschaften der Substanz, freies Eisen zu binden und die Bakterien durch Interaktion mit deren äußeren Phospholipidmembran zu destabilisieren (Kishore et al. 1991, Tigyi et al. 1992, Erdei et al. 1994, Naidu und Arnold 1994).

Bakterien benötigen Eisen als essentiellen Wachstumsfaktor. Wird dieser durch Lactoferrin bei einer Infektion entzogen, ist die Vermehrung der Erreger unmöglich - es entsteht ein „stasis effect“. Bei Zugabe von Eisen wird der Effekt aufgehoben (Masson et al. 1966/1968). Manche, v.a. gram-negative Bakterien können diesen Abwehrmechanismus verhindern, indem sie niedrig molekulare hoch affine Eisenchelatoren (Siderophoren) bilden, die das gebundene Eisen zum Bakterium zurückführen (Gray-Owen und Schryvers 1996, Yu und Schryvers 2002). Neisserien exprimieren sogar an ihrer Oberfläche Lactoferrin-spezifische Rezeptoren, die dem Lactoferrin das Eisen entziehen (Lewis et al. 1998, Schryvers und Morris 1988, Schryvers et Morris 1989).

In der Literatur wird noch ein weiterer antibakterieller Mechanismus beschrieben, der durch die basische N-terminale Region des Lactoferrins ermöglicht wird. Die Arbeiten von Arnold et al. (1977) und Yamauchi et al. (1993) zeigten, dass apo-Lactoferrin insbesondere die gram-negative bakterielle Zellmembran angreifen und penetrieren kann, wodurch ein grosser Teil Lipopolysaccharide frei wird. Diese LPS-Moleküle werden wiederum durch Lactoferrin gebunden, was zu weiteren immunmodulatorischen Wirkungen (s.u.) führt. Im Experiment erwiesen sich dabei die isolierten N-terminalen basischen Peptide (Lactoferricine s.o.) potenter als das intakte Protein (Bellamy et al. 1992); bovines Lactoferrin hatte eine höhere bakterizide Aktivität als humanes Lactoferrin (Strøm et al. 2000).

Lactoferrin hemmt zudem *in vitro* die Expression bestimmter *E. coli*-Fimbrien, sowie die Interaktion von coliformen Bakterien mit subepithelialen Matrixproteinen wie Fibronectin, Fibrinogen, Collagen I, IV, und Laminin (Ward et al. 2002), wodurch eine Infektion mit *E. coli*s verhindert werden kann. Erst vor kurzem erkannte man, dass Lactoferrin auch eine Serinproteaseaktivität besitzt. Sitz dieser Fähigkeit ist der N-terminalen Bereich. Eine Kolonisation von *Haemophilus influenzae* wird durch die,

mit Hilfe dieser Protease möglichen Inaktivierung der äußeren Membranproteine, die zum Andocken an die Wirtszelle gebraucht werden, gehemmt (Qiu et al. 1998).

Die Liste derjenigen Bakterien, an denen die bereits besprochenen bakteriziden und bakteristatischen Wirkungen des Lactoferrins untersucht wurden, ist lang. Bishop et al. ermittelte (1976) die Wirkung gegenüber *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Aerobacter aerogenes*, Dial et al. (1998) gegenüber *Helicobacter pylori* und Salamah et al.-Obaidi (1995) gegenüber *Yersinia pseudotuberculosis*. In allen Fällen war die antibakterielle Aktivität zeit- und konzentrationsabhängig, höher bei saurem pH und besonders effizient bei Temperaturen zwischen 37 und 42°C. Als Lactoferrin-Andockstelle der Enterobacteriaceae dienen Porine, hitzempfindliche Proteine der äußeren Membran, die als Trimere von Lipopolysacchariden umgeben sind. Sie dienen dem Transport von gelösten Substanzen und sind gleichzeitig Rezeptoren für Bakteriophagen (Kishore et al 1991, Tigyi et al. 1992, Erdei et al 1994, Naidu und Arnold 1994).

Ähnlich wie Lactoferricin unterstützt auch Lactoferrin den Effekt mehrerer Antibiotika. Dieses Phänomen wurde insbesondere von Ellison et al. 1998 anhand Rifampicin untersucht. Die Tatsache, dass sowohl Lactoferrin als auch Lactoferricin zu einer Potenzierung der Lysozym-Wirkung führen, wurde 1991 entdeckt (Ellison und Giehl, 1991).

Beispiele für in vivo-Wirkungen

Eine große Anzahl wissenschaftlicher Untersuchungen belegen die bakteriziden und bakteristatischen Eigenschaften des Lactoferrins in vitro. Bislang wurden jedoch nur wenige in vivo-Studien durchgeführt. Diese zeigen positive Resultate durch die Gabe von Lactoferrin, wobei dies wahrscheinlich nicht bzw. nicht ausschließlich auf die Eisensequestration zurückzuführen ist. In vitro-Experimente, welche die Wachstumshemmung der Bakterien durch Eisensequestration zeigen, können die komplexen Interaktionen einer in vivo-Infektion nicht darstellen. Eisen wird in vivo von einer viel größeren Anzahl Quellen bereitgestellt, z.B. von Hämoglobin, an das Lactoferrin nicht binden kann.

Eine kürzlich durchgeführte in vivo-Studie an Mäusen zeigt den protektiven Effekt der Substanz in Bezug auf *Helicobacter*-Infektionen, die bei der Genese von

Magenkarzinomen eine Rolle spielen (Wang et al. 2001, Dial und Lichtenberger 2002). Zagulski et al. unternahm 1989 einen Versuch, bei dem Mäuse i.v. mit *E. coli* infiziert wurden. Eine Gruppe hatte 24 Stunden vorher oral hoch dosiert Lactoferrin erhalten. Die Mäuse der Lactoferrin-Gruppe überlebten zu 70%, die Kontrollgruppe nur zu 6%. 1995 wurden Clostridienspezies (*ramosum*, *paraputrificus* und *perfringens*) in Mäuse injiziert. Auch in diesem Fall zeigte Lactoferrin potente Wirkungen, jedoch nur, wenn es mindestens 1 Tag vor Injektion oral verabreicht worden war (Teraguchi et al. 1995).

Bei SPF-Ferkeln verhinderte Lactoferrin in einer Konzentration von 2% den Tod durch induzierten Coli-LPS-Schock. Statt 74% in der Kontrollgruppe, starben in der Lactoferrin-Gruppe nur 17% (Lee et al. 1998). Der Grund hierfür wird in der durch Lactoferrin hervorgerufenen Hemmung der Bindung der aus den *E. coli*s freigesetzten LPS an die Monozyten gesehen. Dadurch wird die Bildung entzündlich-toxischer Zytokine (TNF-alpha, IL-1 und IL-6) gehemmt und die daraus resultierende Hypothermie und Schocksymptomatik verhindert. Lactoferrin fördert zudem die Inaktivierung der LPS durch neutrophile Granulozyten und verhindert damit, dass LPS andere neutrophile Granulozyten zur Generierung von Superoxid anregen (Wang et al. 1995). Im Falle einer Infektion insbesondere mit gram-negativen Bakterien steigt die Lactoferrin-Konzentration lokal signifikant an. Dies verdeutlichte ein Versuch von LaForce, der post infectionem mit *E. coli* die Lactoferrin-Konzentration in der Lunge untersuchte (LaForce 1986).

5.5.3 Modulation des Entzündungsprozesses

Wenn Erreger ins Gewebe eindringen, kommt es sofort zu vaskulären Reparationsmechanismen. Durch die Inflammation werden Gewebsräume und die Lymphgefäße durch Fibrin blockiert. Diese Verminderung des Blut- und Lymphflusses verhindert die Ausbreitung der Krankheitserreger und ihrer toxischen Produkte. Wie in der Abbildung verdeutlicht, kommt es zur Aktivierung des Monozyten-/Makrophagensystem, welches Zytokine wie IL-1-beta, TNF-alpha und GM-CSF freisetzt. Im Anschluss steigt die polymorphonukleare Neutrophilenzahl im Blut, die innerhalb einer Stunde nach Entzündungsbeginn bis zur 5-fachen Menge im Knochenmark anwächst. Eine große Anzahl an Neutrophilen dringt in das

geschädigte Gewebe ein, degranuliert und gibt dabei Lactoferrin in Konzentrationen bis 20 mg/l frei. Dieses hemmt die Produktion und Freisetzung von IL-1-beta, TNF-alpha und GM-CSF (Machnicki et al. 1993, Slater und Flechter 1987). Außerdem wird durch Lactoferrin auch Eisen gefangen und LPS gebunden (Miyazawa et al. 1991), wodurch keine neuen neutrophilen Granulozyten produziert werden, da die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine durch die Makrophagen reduziert wird. Durch die Bindung des freien Eisens wird die Bildung freier, zerstörerischer Radikale (Hydroxylradikale und Superoxid) in den Phagozyten verhindert (Trif et al. 2001; Guillén et al. 2000).

Die Wirkung des Lactoferrins im Darm scheint demnach auf miteinander kombinierten Effekten zu basieren: Bindung von Eisen und Endotoxinen (LPS), verminderte Freisetzung von Zytokinen und Reduktion der Produktion freier (Hydroxy-)Radikale.

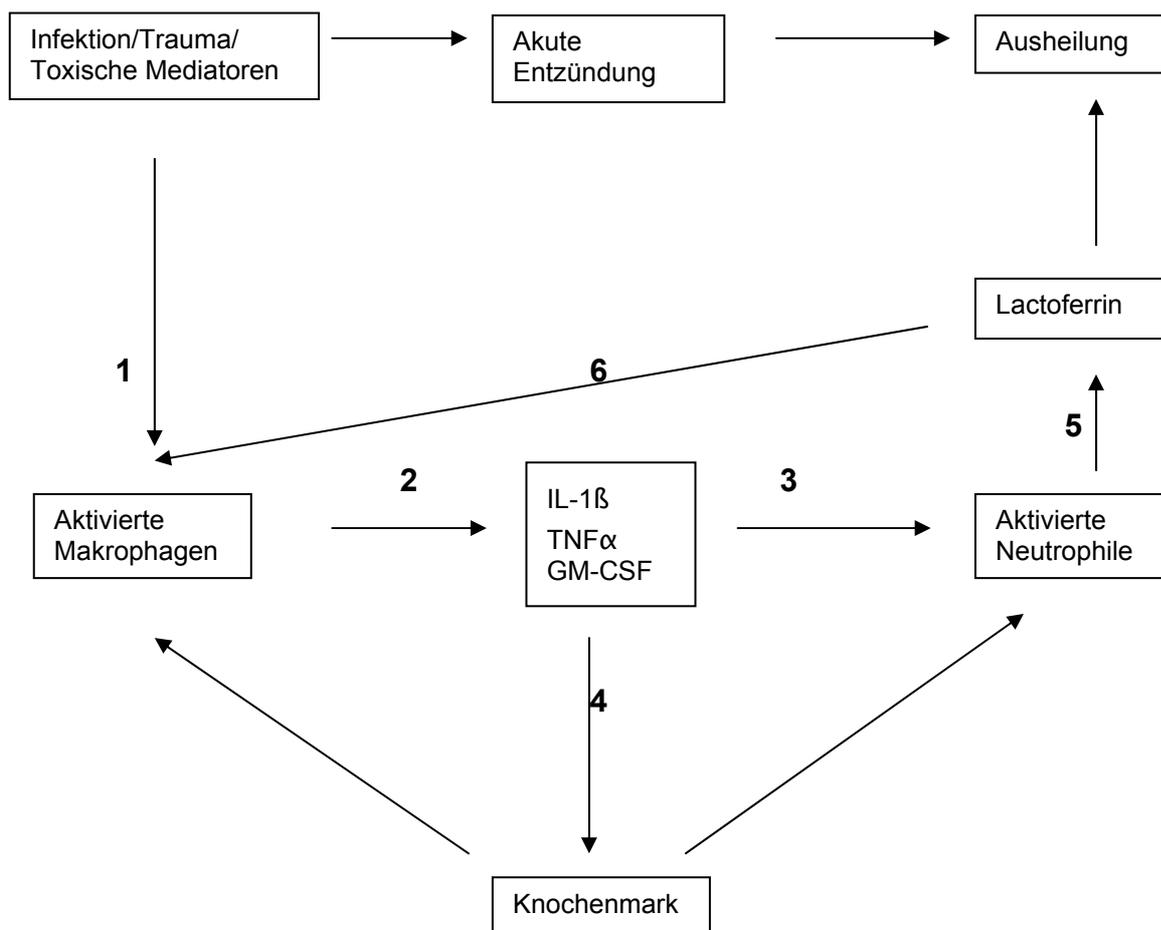


Abbildung 2: Modulation des Entzündungsprozesses durch Lactoferrin (abgeändert nach Kruzell 2000)

(1) Eine Infektion, ein Trauma oder toxische Mediatoren (Lipopolysaccharide, LPS) führen zu einer Aktivierung des Monozyten-/Makrophagensystems und stimulieren die (2) Produktion von IL-1-beta, TNF-alpha und GM-CSF. Diese wiederum aktivieren (3) zirkulierende Neutrophile und die (4) Produktion frischer Neutrophiler im Knochenmark.

Aktivierte Neutrophile degranulieren am Ort der Verletzung und setzen dabei (5) Lactoferrin frei.

(6) Durch die darauffolgende Bindung von Lactoferrin an spezifische Rezeptoren des Monozyten-/Makrophagensystems wird durch die dadurch verursachte Produktionsverminderung von IL-1beta, TNF-alpha und GM-CSF auch die Anzahl der neugebildeten Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen reduziert. Desweiteren wird durch LF auch LPS gebunden, die damit die Makrophagen nicht mehr aktivieren können.

5.5.4 Antivirale Effekte

Lactoferrin ist ein auch potenter Hemmer verschiedener umhüllter Virusarten, des Zytomegalovirus (Betaherpesvirinae) (Hasegawa et al. 1994), HI-Virus (Harmsen et al. 1995), Herpes simplex Virus 1 (labialis) und 2 (genitalis) (Hasegawa et al. 1994, Harmsen et al. 1995), respiratory syncytial virus (Grover et al. 1997, Portelli et al. 1998), Hepatitis C Virus (Leberentzündung, -zirrhose und -krebs) (Ikeda et al. 2000) sowie des Hantavirus (Murphy et al. 2000). Auch zwei unbehüllte Virusarten werden gehemmt, das simian SA-11 Rotavirus und Poliovirus Typ 1 (Superti et al. 1997, Marchetti et al. 1996).

Diese antivirale Aktivität ist dosisabhängig, wobei die besten Ergebnisse im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 2 mg/ml erreicht werden.

Die genauen Wirkungsmechanismen sind noch unklar, werden jedoch durch Interaktion des Lactoferrins mit Zelloberflächenglycosaminoglycanen und Low-Density-Lipoproteinrezeptoren, die als Bindungsplätze für umhüllte Viren fungieren, erklärt. Sowohl Lactoferrin als auch Lactoferricin hemmen beispielsweise den Eintritt des Zytomegalovirus in die Fibroblasten (Andersen et al. 2001). In manchen Fällen kommt es wohl auch zu einer direkten Bindung des Lactoferrins an das jeweilige Virus, wodurch Lactoferrin die virale Adhäsion, Absorption und Penetration des Virus in die Zelle verhindert. Der Eingriff in das Geschehen erfolgt demnach in der frühen Phase der Infektion (Zimecki 1991, Mattsby-Baltzer 1996, Shimizu 1996). Die Anti-Herpesvirusaktivität wird hauptsächlich durch den N-Lappen, jedoch in geringerem Maße auch durch den C-Lappen hervorgerufen. In vivo-Experimente zeigten, dass in Folge einer Lactoferrintherapie häufig auch die Zahl der natürlichen Killerzellen stark

ansteigt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die antivirale Wirkung des Lactoferrins auch durch den Anstieg dieser Immunzellen mitverursacht wird.

An Mäusen wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt Lactoferrin verabreicht werden muss, um protektive Wirkungen zu entfalten. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse mit dem Polyzytämie hervorrufenden Friend Virus Complex (FVC-P) infiziert. Lactoferrin erhöhte die Überlebensrate und reduzierte die Antikörperproduktion der Mäuse. Je früher es ante infectionem verabreicht wurde, desto besser. Um eine Wirkung zu entfalten, war ein Minimum von 3 Tagen vor der Infektion nötig (Siciliano et al 1990, Giansanti et al. 2002).

5.5.5 Antimykotische Wirkungen

Sowohl Lactoferrin als auch Lactoferricin hemmen das Pilzwachstum. Die aktive Komponente des Lactoferrin scheint das Lactoferricin zu sein. Die Aktivitäten wurden jedoch bisher nur vereinzelt und an wenigen Pilz- bzw. Hefespezies untersucht. Eindeutige Beobachtungen wurden in vitro an *Candida albicans* gemacht. Wird Lactoferricin mit dieser Hefe zusammengebracht, kommt es zu einer Zerstörung ihrer Zellmembran. Bei in vivo-Untersuchungen an Meerschweinchen konnte durch die Applikation von Lactoferrin eine deutliche Verbesserung einer *Trichophyton mentagrophytes*-Dermatose erreicht werden.

Weiterhin wurde der Einsatz dieser prebiotischen Substanz in Kombination mit antifungalen Wirkstoffen am Beispiel von Clotrimazol geprüft. Bei diesem handelt es sich um ein Azol-Derivat, welches durch Einlagerung und daraus folgenden Strukturveränderungen der Pilz-Zellmembran für den Austritt von Zellbestandteilen sorgt. Lactoferrin bewies bei dieser Kombination synergistische Wirkungen (Yamauchi et al. 2000).

5.5.6 Antiprotozoische Wirkung

Die antiprotozoische Wirkung von Lactoferrin wurde erstmals 1998 von Isamida et al. getestet. Mit Lactoferrin vorbehandelte und unbehandelte Mäuse wurden mit *Toxoplasma gondii* infiziert. Während nur 10% der behandelten Tiere an

Toxoplasmose verendeten, starben in der Kontrollgruppe 80%. Später wurde ein ähnliches Experiment durchgeführt, in dem *Toxoplasma gondii*- und *Eimeria stiedai*-Sporoziten jedoch mit Lactoferrin vorinkubiert wurden, wodurch eine Reduktion ihrer Infektivität hervorgerufen werden konnte (Omata et al. 2001).

Die Mechanismen dieser antiprotozoischen Wirkungen sind jedoch noch ungeklärt. Möglich wäre ein Effekt basischer Peptide auf die Integrität der Parasitenmembran und/oder eine Interaktion mit Wirtsgewebe. Weitere antiparasitische Aktivitäten scheinen mit den eisenchelatierenden Eigenschaften des Lactoferrins zusammenzuhängen, wie z.B. im Fall von *Pneumocystis carinii* (Cirioni et al. 2000). Studien an menschlichen Monozyten führten außerdem zu der Erkenntnis, dass Lactoferrin sowohl die Aufnahme, als auch die intrazelluläre Vernichtung von *Trypanosoma cruzi* fördert, wobei eine Beeinflussung der Radikalbildung durch die Substanz anzunehmen ist.

5.5.7 Immunmodulatorische Eigenschaften

Lactoferrin kann sowohl die Proliferation und Differenzierung der Immunzellen, als auch die Synthese der Interleukine und Immunglobuline beeinflussen.

Die Produktion der Immunzellen (B- und T-Lymphozyten) wurde durch die Applikation der prebiotischen Substanz angeregt, so dass die Zahl dieser Abwehrzellen im Blut und Darm beträchtlich anstieg (Zimecki et al. 1995). Im Experiment kam es im Intestinum sowohl gesunder als auch krebserkrankter Mäuse zu einer erhöhten Zellproduktion der natürlichen Killerzellen, der CD4- und CD8-Zellen (Iigo et al. 1999, Wang et al. 2000, Kuhara et al. 2001). Das lokale Immunsystem des Darmes reagiert auf vielfältige Weise auf die orale Beifütterung von Lactoferrin. In einer Untersuchung an Mäusen kam es zudem zur Erhöhung der Immunglobuline A und G in der Intestinalflüssigkeit und den Immunzellen der Milz. Die Splenozyten und Peyerschen Platten proliferierten (Debbabi et al. 1998). Auch die Interleukinsekretion wird durch Lactoferrin angeregt. Untersucht wurde dieser Effekt anhand des, zu einer verstärkten Aktivität der NK- und Th1-Zellen führenden IL-18 im Mäusedünndarm durch Wang und Kuhara (2000, 2001). Nakajima et al. beobachtete in seiner Studie 1999 jedoch nicht nur die Interleukin- sondern auch Interferon-gamma-Produktion, die ebenfalls erhöht war.

Diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass durch die orale Applikation von Lactoferrin die intestinale Immunität beeinflussbar und eine erhöhte Zytotoxizität sowie eine verbesserte lokale Infektionsimmunität möglich ist.

Einige Autoren berichten auch über einen Anstieg der systemischen Immunglobulinproduktion nach oraler Lactoferrinapplikation in Mäuseexperimenten, jedoch kommt es nach systemischer Lactoferringabe lediglich zu einem Anstieg der Immunantwort im Serum. Intestinale Zellen besitzen Rezeptoren für Lactoferrin. Da im adulten Organismus wahrscheinlich nur eine geringe Menge des oral aufgenommenen Lactoferrin im Darmtrakt resorbiert wird, nimmt man an, dass Lactoferrin seine Wirkung über diese Rezeptoren der intestinalen Epithelzellen und das GALT-Gewebe entfaltet. Die durch Lactoferrin aktivierten Darmzellen könnten mittels der Produktion von Zytokinen zirkulierende Leukozyten beeinflussen. Auch scheint eine direkte Stimulation der Leukozyten des GALT für möglich (Tomita et al. 2002). Diese aktivierten Leukozyten könnten wandern und systemische Antikörper produzieren.

In Untersuchungen der Lactoferrin-Effekte auf das menschliche Immunsystem beeinflusste die Substanz die phagozytische Aktivität, sowie die Superoxidproduktion der PMN. Beides stieg in einigen Probanden an. Es konnte zudem eine anteilmäßige Verschiebung der Lymphozytenarten beobachtet werden (Yamauchi et al. 1998).

5.5.8 Auswirkungen auf das Blutbild

Im Rahmen eines klinischen Experimentes am Menschen wurden 1998 von Zimecki et al. verschiedene Blut- und Immunparameter untersucht. Den gesunden Probanden wurde 10 Tage lang täglich 40 mg Lactoferrin oral verabreicht. Während der Untersuchungsperiode war ein leichter Abfall der Neutrophilenzahlen im Blut der Personen zu verzeichnen, die Lymphozyten stiegen dagegen an.

5.5.9 Lactoferrin und Tumorgenese

Mehrere Milchproteine erwiesen sich als Karzinogenese-protektiv, insbesondere in Hinblick auf Colon- und Mammatumoren (McIntosh 1993).

Chemisch induzierte Karzinogenese durchläuft die Stadien der Initiation und der Promotion. Bei der Initiation werden Karzinogene durch Leberenzyme in ihre aktive Form überführt, die dann zu DNA-Schäden in den Zielzellen führen. Die prämaligen Zellen proliferieren und werden durch weitere Promotionsfaktoren maligne. Die Metastasenbildung bestimmter Tumorzellen wurde *in vitro*, und - erst kürzlich entdeckt - auch das Wachstum experimentell induzierter Tumore *in vivo* durch Lactoferrin sowie durch Lactoferricin gehemmt (Ushida et al. 1998, Tsuda et al. 2002).

Tsuda et al. untersuchte den Einfluss des Lactoferrins auf Initiation und Promotion. In einer Rattenstudie sank die durch Applikation von Azoxymethan hervorgerufene Adenokarzinomrate des Colons durch den Einfluss von bovinem Lactoferrin von 44% auf 26%. Ähnliche Effekte traten auch bei Untersuchungen zum Einfluss von bovinem Lactoferrin auf die Karzinogenese im Oesophagus, Lunge und Blase auf (Tsuda et al. 1999). Die Einflussnahme auf die Metastasierung von Lungenkarzinomen wurde an Mäusen untersucht. Obwohl das Wachstum des Tumors durch Lactoferrin nicht beeinträchtigt wurde, kam es in der behandelten Gruppe dosisabhängig zu einer Reduktion auf 43% der Metastasenrate der Kontrollgruppe (Iigo et al. 1999). In einer Pilotstudie mit an chronisch aktiver Hepatitis erkrankten Patienten, zeigte sich dosisabhängig auch ein protektiver Effekt in Hinblick auf die Entwicklung hepatozellulärer Karzinome (Tsuda et al. 2002).

Mögliche antikarzinogene Wirkmechanismen sind die Regulation der Aktivität der natürlichen Killerzellen (Damiens et al. 1998), die Hemmung der VEGF(165)-medierten Angiogenese, die Beeinflussung der Apoptose (Yoo et al. 1997), sowie die Bekämpfung der Herpesvirusinfektion beim hepatozellulären Karzinom durch Hepatitis C.

5.5.10 Antiallergene und proliferative Eigenschaften des Lactoferrins

Einige vor kurzem durchgeführte Untersuchungen zeigen mögliche antiallergene Eigenschaften des Lactoferrins. Wird ein Organ durch allergene Stoffe gereizt, weist es einen sehr viel höheren Lactoferringehalt als im Normalzustand auf. Dies gilt wahrscheinlich für alle Organe, wurde bisher jedoch vorrangig in Untersuchungen an Lunge und Bronchien (Ghio et al. 1998, van de Graaf et al. 1991), sowie bei allergischen Hauterkrankungen festgestellt (Cumberbatch et al. 2000, Zweiman et al. 1990, Lerche et al. 1988). Durch diese Hochregulation der Lactoferrinproduktion werden allergische Erkrankungen gehemmt, bzw. gemildert. Sogar sehr weit fortgeschrittene Krankheitsprozesse, beispielsweise die in der Spätphase des Asthmas stattfindende Obstruktion der Luftwege scheinen im Tiermodell beeinflussbar zu sein (Elrod et al. 1997). Wirkmechanismus der Verhinderung von Hauterkrankungen ist die Hemmung der vom Allergen induzierten Langerhansschen Zellmigration, sowie die Akkumulation dieser dendritischen Zellen in den Lymphknoten (Cumberbatch 2000). Außerdem nimmt Lactoferrin bei topischer Applikation Einfluss auf die Produktion von TNF-alpha, der als Mediator eine wichtige Rolle im Ablauf der allergologischen Vorgänge spielt (Kimber et al. 1998, Enk und Katz 1992).

Lactoferrin wirkt proliferativ, insbesondere auf Epithelzellen. Diese Eigenschaft führt zu einer Veränderung der darmspezifischen Villimorphologie. 10 Tage alte Mäusejunge, die Lactoferrin erhalten hatten, wiesen ein um 27% erhöhtes Darmgewicht und ein um 6,5% verlängertes Intestinum auf (Zhang et al. 2001).

6 Welpensterben

6.1 Immunabwehr bei Welpen

Hunde besitzen eine Plazenta endotheliochorialis, bei der das Chorionepithel Kontakt mit dem Endothel der mütterlichen Kapillaren hat und die nur den Durchtritt geringer IgG-Mengen vom Muttertier zum Foetus ermöglicht. 90-95% der mütterlichen Antikörper erhält der Welpe erst nach der Geburt über das Kolostrum,

welches sehr reich an IgG und IgA, aber auch IgM und IgE ist. Diese unveränderte Aufnahme der Immunglobuline vom Darm des Neugeborenen in sein Blut wird nur in den ersten 24 Stunden post partum durch die geringe proteolytische Aktivität des Darminhaltes und durch das Vorkommen von Trypsininhibitoren im Kolostrum ermöglicht. In dieser Zeit werden maximale Immunglobulinspiegel erreicht. Danach sinkt der Gehalt der sich im Welpen-Kreislauf befindlichen maternalen Antikörper langsam ab. Jungtiere, die kein Kolostrum erhalten, erkranken erheblich leichter an Septikämien, Diarrhöen, Pneumonien und anderen Infekten, die Aufnahme ist demnach von größter Bedeutung. Dennoch haben auch Neugeborene die Möglichkeit, Immunreaktionen zu entfalten, wobei es sich zwangsläufig um eine Primärreaktion mit sehr langer Anlaufphase und geringen Antikörpertitern handelt. Passiv aufgenommene maternale Antikörper verhindern durch Feedback-Mechanismus die Synthese eigener Immunglobuline. Damit bleibt auch eine Vakzinierung eines Neugeborenen, das Kolostrum erhalten hat, ohne Erfolg (Walser et al. 1990, Tizard 2000).

Nielen stellte 1998 in Untersuchungen an Welpen vor dem Absetzen eine Mortalitätsrate von 17,8% fest. Anderen Autoren zufolge liegen die Zahlen bei in etwa 20-22%. Dabei entfällt auf Todgeburten 31,3%, die ersten 7 Lebenstage der Welpen 42,4%, Tag 8-21 14,9% und Tag 22-49 11,3%. Die Gefahr der Welpensterblichkeit ist demnach in der 1. Lebenswoche am größten. 40,6% der Welpenerkrankungen bis zur 8. Woche sind infektiös-entzündlicher Genese, darunter Sepsis, Omphalitis, Pneumonien, Meningitiden, unterschiedliche Enteritiden und den damit verbunden Diarrhöen. Zu den nichtinfektiösen Erkrankungen gehören Atelektase, Trauma, Überfütterung, Futteraspiration und Thymusatrophie. Sie sind mit 26,3% vertreten. Der Rest setzt sich aus kongenitalen Anomalien zusammen.

Insbesondere zwischen der 4. und 12. Woche erreicht die Krankheitsanfälligkeit einen weiteren Höhepunkt, da die Jungtiere aufgrund der in Abbildung 3 dargestellten „immunologischen Lücke“ nur unzureichend geschützt sind. Die Konzentration der maternalen Antikörper sinkt nach der Kolostrumaufnahme p.p. stetig ab und erreicht bereits in der 6. Lebenswoche Werte im Bereich von 200 mg/dl. Um die 14. Lebenswoche sind diese völlig verschwunden. Das Jungtier beginnt, sofern es maternale Antikörper erhalten hat, etwa um die 4 bis 5. Woche mit der Produktion eigener Immunglobuline. Diese erreichen jedoch erst mit der 15. Woche Werte von über 300 mg/dl im Serum, erst bis zur 20. Woche das Niveau eines

adulten Hundes. Unter der „immuologischen Lücke“ versteht man demnach den sehr niedrigen Immunglobulinspiegel im Blut der Jungtiere im Alter von 4 bis 10 Wochen, der sie besonders anfällig für Krankheitserreger macht.

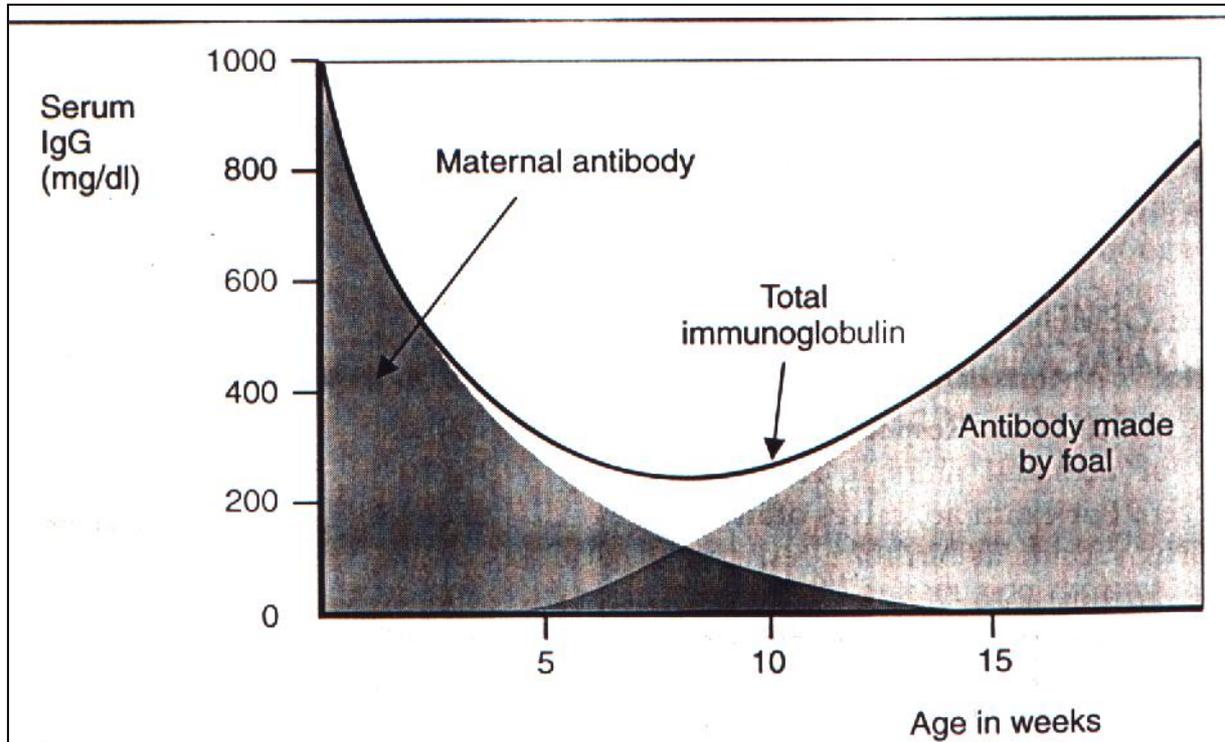


Abbildung 3: Immunglobulinverlauf der Jungtiere (hier am Beispiel eines Fohlens) (aus Tizard 2000)

Lokale Immunreaktionen finden bereits sehr früh statt. Zum Zeitpunkt des Übergangs vom Kolostrum zur Milch sind die Lymphoidgewebe des Darmes neugeborener Tiere bereits in der Lage, auf Antigene voll zu reagieren. Anfangs wird diese Immunantwort durch Interferon und IgM ermöglicht, nach 2 Wochen auch durch IgA, welches das wichtigste Immunglobulin für alle Körperoberflächen darstellt und von den Plasmazellen der Submukosa gebildet wird. Der Wirkmechanismus des IgA ist noch unklar. Es ist in der Lage, virusneutralisierend zu wirken, ist jedoch nicht bakterizid und bindet auch nicht an Makrophagen. Es verhindert wahrscheinlich die Anheftung von Bakterien und Viren an die Epitheloberflächen.

Eine sehr wichtige Rolle spielt die natürliche Flora des Darmtraktes. Sie ist nicht nur für die Abwehr pathogener Mikroorganismen, sondern auch für die Aufschlüsselung der Nahrung von Bedeutung. Die natürliche Entwicklung des Immunsystems im

Gesamtorganismus hängt von der kontinuierlichen Stimulation durch Antigene aus der Darmflora ab. Keimfrei aufgezogene Tiere haben nur schlecht entwickelte sekundäre Lymphorgane ohne Sekundärfollikel. Beim Hund gehen die häufigsten Antigenreize vom Darm aus. Antigene durchdringen entweder die Mukosa und gelangen über Gefäße in die Mesenteriallymphknoten und Leber oder sie gelangen über die oberflächlichen Lymphoidgewebe in den Körper. Die Tonsillen und Peyerschen Plaques besitzen Lymphoidgewebe, das T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen enthält (Tizard 2000).

6.2 Eubiosis und Dysbiosis des Gastrointestinaltrakts

Das Zusammenleben der verschiedenen Bakterienarten im Magen-Darmtrakt im Sinne eines offenen Ökosystems ist im Idealfall fein aufeinander abgestimmt und bildet ein dynamisches Gleichgewicht. Dieser Zustand wird aus dem Griechischen Eubiose genannt. Es existieren eine Haupt-, Begleit- und Restflora. Der Anteil der Hauptflora beträgt bei eubiotischen Verhältnissen über 90%. Diese setzt sich beim Welpen aus anaerob bzw. fakultativ anaerob lebenden Arten, die Milchsäure und andere kurzkettigen Fettsäuren bilden (Lactobacillen, Bacteroides, Eubakterien, Peptococcen, Peptostreptococcen und Bifidobakterien), zusammen. Bei der fakultativ pathogenen Begleitflora (bei gesunden Welpen ca. 1%) handelt es sich hauptsächlich um *E. coli* und Enterococcen. *C. perfringens*, Staphylococcen, Proteus und *Pseudomonas* spp. zählen zur Restflora (bei Eubiosis unter 0,01%), Streptococcen und Veillonellen spielen hier nur eine geringere Rolle (Mitsuoka 1992). Das (gesunde) Verhältnis von Haupt-, Begleit- und Restflora beträgt demnach etwa >90:1:0,01.

Diese physiologische Darmflora unterstützt Verdauung und Absorption, synthetisiert Proteine und Vitamine, unterdrückt exogene Mikroorganismen durch Bildung von Bakteriozinen und der Produktion von Schwefelwasserstoff, und stimuliert die Immunfunktion. Beim Neugeborenen besteht die Gefahr, dass sie sehr leicht durch bakterielle Überwucherung mit unerwünschten Keimen aus dem Gleichgewicht gerät, sich Toxine und Karzinogene bilden, die zu Diarrhoen, Tympanien, Obstipationen, Wachstumshemmung, Superinfektionen, Leberschäden und Immunsuppression führen. Dieser Zustand wird als Dysbiosis bezeichnet.

Störend auf die Eubiose wirken sich Fütterungsfehler, frühzeitige Entwöhnung (da die Muttermilch die milchsäurebildenden Bakterien fördert), drastische Futterwechsel, minderwertige Futterkomponenten und ungenügende Futterhygiene aus. Daneben wirken im Wirtstier gebildete Verdauungssekrete sowie ImmunsUBstanzen im Magen-Darmtrakt direkt auf die Mikroorganismen ein. Die Freisetzung der Verdauungssekrete, sowie die Art und Häufigkeit der Peristaltik, wird in hohem Maße durch Stress beeinflusst. In diesem Zusammenhang spielen bei Welpen das Absetzen, Neuordnen von Tiergruppen, Transport, Stallklima usw. eine Rolle. Schon lange bevor es zu Durchfällen kommt, können Dysbiosen vorliegen und die Nährstoffverwertung des Futters verschlechtert sein. Charakteristisch für solche Inbalancen ist die Abnahme der Keime der Hauptflora zu Gunsten der schädigenden Keime der Begleit- und Restflora. In einer Dysbiose kann der Anteil der Restflora bis auf 40% der Gesamflora ansteigen. Eine Stabilisierung der Darmflora im Sinne der Aufrechterhaltung einer Symbiose und Verhinderung der Dysbiose ist demnach äußerst wünschenswert (Busch et al. 1999).

7 Klinische und physiologische Untersuchungsparameter der Welpen bzw. deren Beeinflussbarkeit durch Probiotikafütterung

7.1 Milchaufnahme und Gewichtsentwicklung neugeborener Hundewelpen in den ersten 4 Wochen p.p.

Untersuchungen zur Milchaufnahme und Gewichtsentwicklung an neonatalen Hundewelpen ergaben, dass die relative Milchmengenaufnahme (in % des KGW) in der ersten Woche am höchsten ist und anschließend langsam abnimmt. In den 1985 von Kienzle et al. mit Hilfe der Differenzwägung durchgeführten Experimenten nahmen die Tiere im Mittel in den ersten 4 Wochen p.p. täglich 13,7% ihres KGW an Milch auf. Aufgrund indirekter Berechnungen liegt diese Zahl wahrscheinlich jedoch ca. 20 % unter der wahren Größe. Genauere Angaben sind der Tabelle 9 zu entnehmen, wobei sie sich fast vollständig mit einer Untersuchung von Oftedal decken. Hier ist die relative Milchmengenaufnahme mit 17,0% in der ersten, und 14,6% in der zweiten Woche angegeben (Oftedal 1984).

Tabelle 9: Tägliche Milchmengenaufnahme der Saugwelpen
(im Mittel, absolut in g und relativ in % KGW)
(abgeändert nach Kienzle et al. 1985)

Woche 1		Woche 2		Woche 3		Woche 4	
absolut (g)	relativ (%)	absolut (g)	relativ (%)	absolut (g)	relativ (%)	absolut (g)	relativ (%)
91,3	17,5	160,4	15,0	156,8	14,2	155,2	10,9

Wie aus der Tabelle 10 ersichtlich ist, waren die Gewichtszunahmen der Welpen absolut in der 1. Woche am niedrigsten, relativ jedoch am höchsten. Im Mittel betrug der tägliche Zuwachs in den ersten 4 Lebenswochen 5,4% des aktuellen Gewichtes. Zwischen den Geschlechtern gab es keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung. Auch die Wurfgröße spielte bei der Milchaufnahme und beim Zuwachs kaum eine Rolle.

Tabelle 10: Tägliche Gewichtszunahme im Mittel bei mittelgroßen Hunden
(in g bzw. % KGW) (abgeändert nach Kienzle et al. 1985)

Woche 1		Woche 2		Woche 3		Woche 4	
absolut (g)	relativ (%)	absolut (g)	relativ (%)	absolut (g)	relativ (%)	absolut (g)	relativ (%)
41,1	9,8	48,4	6,6	49,4	4,7	51,2	3,8

7.2 Physiologische Blutwerte von Beagle-Welpen unterschiedlichen Alters im Vergleich zu adulten Tieren

Beim Neugeborenen sind relativ große, nicht vollständig ausgereifte Erythrozyten zu finden. Das fetale Hämoglobin, welches eine deutlich höhere Sauerstoffaffinität als das Hämoglobin erwachsener Säugetiere besitzt, wird erst um die Geburt, teilweise auch erst post partum abgebaut. Wie aus der Tabelle 11 zu entnehmen, bleiben die relativ hohen Erythrozytenzahlen und Hämoglobinwerte des Neugeborenen, die jedoch weit unter dem eines adulten Hundes angesiedelt sind, nur für kurze Zeit bestehen und sinken dann ab. Das Volumen der Erythrozyten (MCV) und der Hb-Gehalt des Einzelerythrozyten (MCH), die beide bei der Geburt über den Werten

adulter Tiere liegen, verringern sich anschließend und erreichen etwa mit dem 50. Tag die Werte ausgewachsener Hunde. Die Hämoglobin- Konzentration aller Erythrozyten (MCHC) wird kaum vom Alter der Tiere beeinflusst.

Der Abfall der Erythrozytenzahlen und des Hämoglobinwertes ist durch den physiologischen Erythrozytenabbau bei verminderter Erythropoese und durch die Vergrößerung des Blutvolumens infolge des raschen Körperwachstums bedingt. Die Hämoglobin- und Hämatokrit- Werte sinken sogar noch stärker als die Erythrozytenzahlen. Ein Tiefpunkt ist in etwa im Alter von 4 Wochen erreicht, danach erfolgt mit Beginn der Beifütterung ein langsamer Anstieg. Im Alter von 6 Monaten erreicht das Jungtier bleibende Werte (Walser et al. 1990, Hoskins 1990). Details sind der Tabelle 11 und der Abbildung 4 zu entnehmen.

Tabelle 11: Mittlere Blutwerte gesunder Beagle-Welpen unterschiedlichen Alters (abgeändert nach Hoskins 1990)

Alter in Wochen	Ery ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Hkt (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	Neutros ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Lymphos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Monos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
0	5,1	15,2	46	93,0	30,0	32,0	8,6	1,9	0,9
1	4,6	12,9	29	89,0	28,0	32,0	7,4	4,3	1,1
2	3,9	10,0	29	81,5	25,5	31,5	5,2	3,8	0,7
3	3,8	9,7	28	83,0	25,0	31,0	5,1	5,0	0,7
4	4,1	9,5	28	73,0	23,0	32,0	7,2	4,5	0,8
6	4,7	10,2	28	69,0	22,0	31,5	9,0	5,7	1,1
8	4,9	11,2	30	72,0	22,5	32,0	8,5	5,0	1,0
12	6,3	14,3	31	64,6	22,8	35,3	9,8	5,7	0,9

Prinzipiell gibt es Rassenunterschiede. So weisen deutsche Schäferhunde postnatal deutlich niedrigere Erythrozytenzahl, Hämoglobin- und Hämatokritkonzentration als beispielsweise Beagle-Welpen auf. Geschlechtsunterschiede spielen jedoch kaum eine Rolle (Lund et al. 2000).

Neugeborene besitzen am ersten Lebenstag erhöhte Leukozytenzahlen, da Granulozyten –sie machen beim Neugeborenen etwa 70% der Leukozyten aus– vermehrt aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden. In den folgenden Tagen kommt es zum Absinken der Granulozyten, die Zahl der Lymphozyten nimmt dafür

stark zu. Diese Blutveränderungen sind als Adaptation mit der Geburt als Stressfaktor zu deuten und sind kein Hinweis auf Krankheitsprozesse.

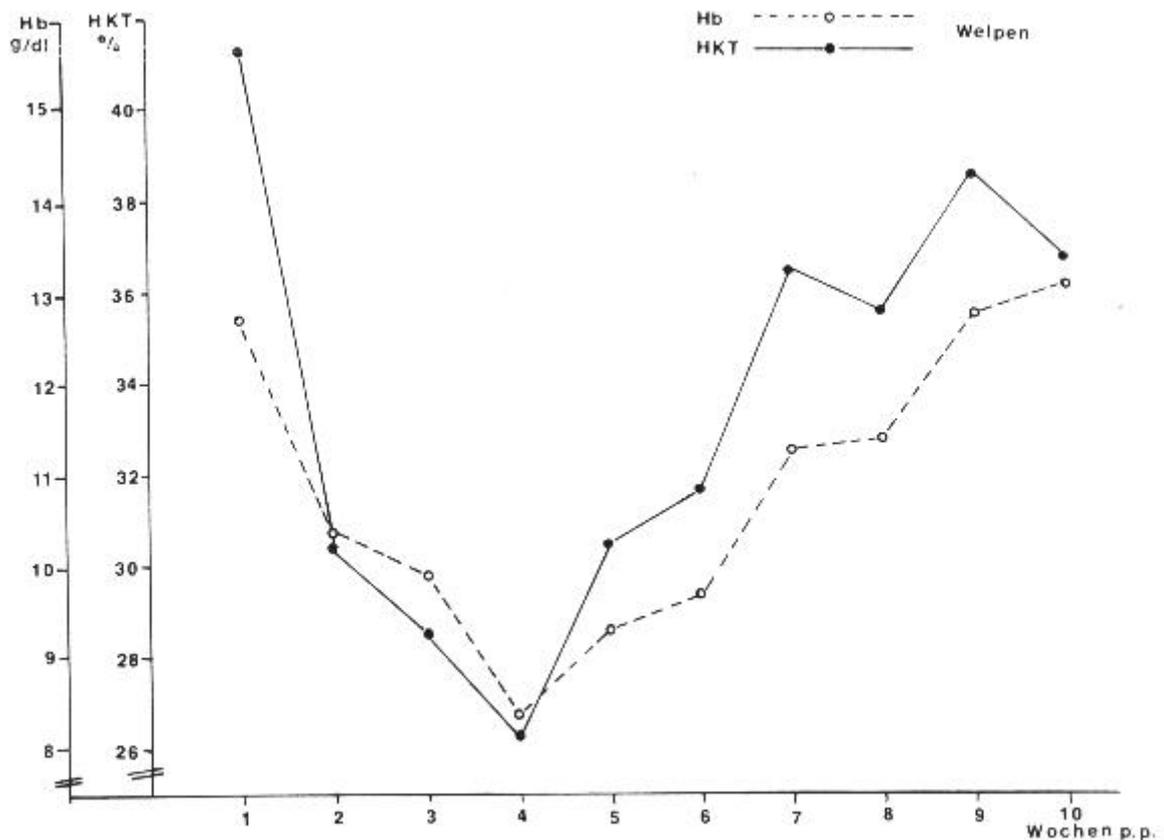


Abb. 4. Hämatokrit- und Hämoglobingehalt im Blut bei Welpen im Verlauf der ersten 10 Lebenswochen. Beginn der Beifütterung ab 5. Lebenswoche
 Fig. 4. Hematocrite and hemoglobine content of blood in puppies during the first 10 weeks of life. Additional feeding started at the age of 4 weeks

Abbildung 4: Hämoglobin- und Hämatokritverlauf neonataler Beagle-Welpen
 (aus Kienzle et al. 1985)

7.3 Einfluss von Probiotika auf die Faeces

7.3.1 Bakterielle Zusammensetzung der Hunde-Faeces

Die bakterielle Zusammensetzung der Hunde-Faeces ändert sich mit dem Alter der Tiere. Während gesunde Welpen in erste Linie Lactobacillen, Bacteroides, Eubakterien, Peptococcen und Bifidobakterien besitzen, kommen bei jungen, unter 12 Monaten alten Hunden bereits Staphylococcen dazu (Benno et al. 1992a). Ältere

Hunde haben viele Clostridien und Streptococcen in ihren Faeces, wobei das Clostridienwachstum abgänglich von der Ernährung ist (Mitsuoka et al. 1976).

Die Konzentrationen der wichtigsten im Kot adulter Hunden anzutreffenden Bakterien sind in der Tabelle 12 angegeben. Nach Untersuchungen von Amtsberg et al. (1995) liegt die aerobe Gesamtkeimzahl in den Faeces adulter Hunde je nach Ration zwischen 7,3 und 9,6 (lg/g uS).

Tabelle 12: Durchschnittliche Bakteriengehalte in Hundefaeces
(Mitsouka et al. 1976, Treschnak 1994, Ringel 1998, Benno und Mitsouka 1992, Benno et al. 1992b)
(abgeändert nach Zentek 1993)

Bakterium	lg/g uS
Bacteroides spp.	10,1
Eubacterium spp.	9,75
Peptostreptococcus spp.	9,75
Clostridium spp.	9,5
Bifidobacterium spp.	9,4
Fusobacterium spp.	9,3
Lactobacillus spp.	9,2
Streptococcus spp.	8,8
Enterobacteriaceae	7,9
C. perfringens	7,8
Staphylococcus spp.	4,4

Zentek et al. untersuchten 1998 den Effekt des Probiotikums *Enterococcus faecium* (10^7 KbE Probiotikum/g Futter) auf die bakteriologische Zusammensetzung der Faeces adulter Beagles. Dabei zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Probiotikums auf den Enterococcengehalt. Dieser lag ohne Probiotikum im Bereich zwischen 4,2 und 5,9 log/g, und stieg bei Probiotikafütterung auf Werte zwischen 7,4 und 7,8 log/g an. Der Lactobacillengehalt sank unter dem Einfluss des Probiotikums von 8,78 log/g auf 5,4 log/g. Bei den anderen Bakterien war diese Tendenz nicht so deutlich, insgesamt war jedoch eine geringe Keimzahlreduktion auszumachen.

Bei Saugwelpen wurde durch Zentek et al. ähnliche Beobachtungen gemacht. Frühabgesetzten Hundewelpen wurde dabei Muttermilch oder Milchaustauscher mit und ohne Probiotikum verfüttert. Auch hier war v.a. der Enterococcengehalt der

Faeces von den Veränderungen betroffen. Er lag bei den Welpen, die mit Muttermilch aufgezogen wurden etwa ähnlich hoch wie bei den Welpen mit Milchaustauscher und Probiotikum (durchschnittlich bei 7,93 log/g). Welpen, die mit reinem Milchaustauscher aufgezogen wurden, hatten eine signifikant geringere Enterococcenzahl in ihren Faeces (im Schnitt 6,71 log/g). Bei den anderen Keimgehalten ließen sich kaum Tendenzen feststellen.

7.3.2 pH-Wert in Kot und Chymus

Hunde besitzen als Fleischfresser einen sauren Kot, dessen pH meist zwischen 6 und 6,5 liegt. Dagegen herrscht im Ileumchymus durch den Zufluss des bicarbonatreichen Pankreassaftes ein neutrales bzw. leicht alkalisches Milieu. Sowohl der pH als auch der Lactatgehalt des Chymus werden durch Probiotikafütterung beeinflusst. Der pH wird erniedrigt, der Lactatgehalt erhöht (Zentek et al. 1998).

Der pH-Wert des Kotes hängt naturgemäß von der verabreichten Diät ab. Die Verabreichung oligosaccharidhaltiger Futtermittel führt durch die mikrobielle Vergärung zu generell niedrigeren pH-Werten. Dies gilt auch für andere praecaecal schwer verdauliche Kohlehydrate (Schünemann et al. 1989) und für bestimmte pflanzliche Proteinquellen (Mais, Weizenkleber, Sojaprotein), die zu einer Absenkung der colonalen und fäkalen pH-Werte führen (Wieczorek 1993, Zentek 1993). Der probiotische Einfluss auf den Kot-pH erwachsener Hunde war im Experiment nur in Tendenzen zu erkennen, wobei die Ernährung des Hundes den Ausschlag gab. Welpen, die Milchaustauscher mit Probiotikum erhalten hatten, wiesen einen leicht erhöhten pH auf (Zentek et al. 1998).

7.3.3 L-Lactatgehalt

Als wesentlicher Wirkmechanismus der Probiotika wird von mehreren Autoren der Einfluss auf die Milchsäurebildung angesehen (Roth und Kirchgessner 1986, Stewart et al. 1995). Nouisianen und Suomi, sowie Roth et al. (1991, 1992) konnten jedoch beim Einsatz verschiedener Lactobacillen und *Bacillus cereus* var. *toyoi* bei Schwein

und Rind keinen Einfluss auf pH-Werte oder signifikante Effekte auf die Lactatbildung erkennen. In diesem Zusammenhang wurde auch der Lactatgehalt der Faeces erwachsener Hunde mit und ohne Probiotikumfütterung von Zentek et al. (1998) untersucht. Die Ergebnisse wurden stark durch die Fütterung der Hunde beeinflusst und die individuellen Schwankungen waren groß. Rationen mit schwer verdaulichen Kohlehydraten führten zu höheren Lactatwerten als andere. Die Werte waren insgesamt sehr gering (zwischen 0,68 und 2,09 mmol/l) und bei der Beigabe zum Trockenalleinfutter konnten keine Auswirkungen des Probiotikums festgestellt werden. Die Verabreichung einer Griebenmischung führte jedoch in der Kontrollgruppe zu Werten, die über denen der Probiotikumsgruppe lagen. Bei der Bestimmung der Lactatwerte im Welpenkot erwiesen sich die Schwankungen als sehr hoch. Die höchsten Lactatwerte wurden bei Welpen gemessen, die Muttermilch erhielten (4,2 mmol/l), gefolgt von den Welpen mit Milchaustauscher ohne Probiotikum (1,4 mmol/l). Die Welpen, die den Milchaustauscher mit Probiotikum erhielten, wiesen die geringsten Lactatgehalte im Kot auf (1,0 mmol/l).

7.3.4 TS-Gehalt des Kotes

Die Auswirkungen der Probiotikafütterung auf den Trockensubstanzgehalt von Hundefaeces wurden im Rahmen der Dissertation von Molitor (1998) an 8 Hunden untersucht, jedoch nur bei der Zulage des Probiotikums *Enterococcus faecium* zur Griebenmischung bestimmt. Hier lag der Trockensubstanzgehalt des Kotes bei Probiotikumsfütterung mit 21,3 bis 24,4% deutlich unter dem der Kontrollgruppe mit 23,9 bis 28,2%.

Welpenfaeces besitzen im Vergleich zu adulten Hunden einen sehr hohen Trockensubstanzanteil. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den erwachsenen Hunden, führte die Zulage des Probiotikum zum Milchaustauscher bei Saugwelpen zu einer geringen Steigerung des TS-Gehaltes von 31,2 auf 32,1% (Molitor 1998).

C Material und Methoden

1 Versuchsaufbau

Die Fütterungsstudie dauerte insgesamt 14 Wochen. Neonatale Beagle-Welpen wurden im Alter von 3 Tagen von der Mutter getrennt, in 5 Gruppen aufgeteilt und mittels Milchaustauscher mutterlos aufgezogen. Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe, den anderen wurde anfangs ein mit bovinem Lactoferrin in 4 verschiedenen Dosierungen (30, 60, 60/95 und 120 ppm) versetzter Milchaustauscher, später entsprechendes Festfutter verabreicht.

Dabei wurden folgende Parameter untersucht und mit der Kontrollgruppe verglichen.

- Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung und Futtermittelverwertung
- Mikroflora, pH-Wert, Lactat- und Ammoniakgehalt, sowie der TS-Gehalt des Kotes
- rotes und weißes Blutbild
- Immunglobulingehalt (Diss. S. Strodbeck und S. Regulski 2004), sowie der antioxidative Status des Blutes (Diss. J. Schwarzer 2003)

Die Versuche fanden an der Außenstation Oberwiesenfeld der tierärztlichen Fakultät und im Institut für Tierernährung der LMU München statt.

Nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.5.1998 (BGBl I S. 1105) wurde ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens bei der Regierung von Oberbayern gestellt. Die Genehmigung wurde erteilt.

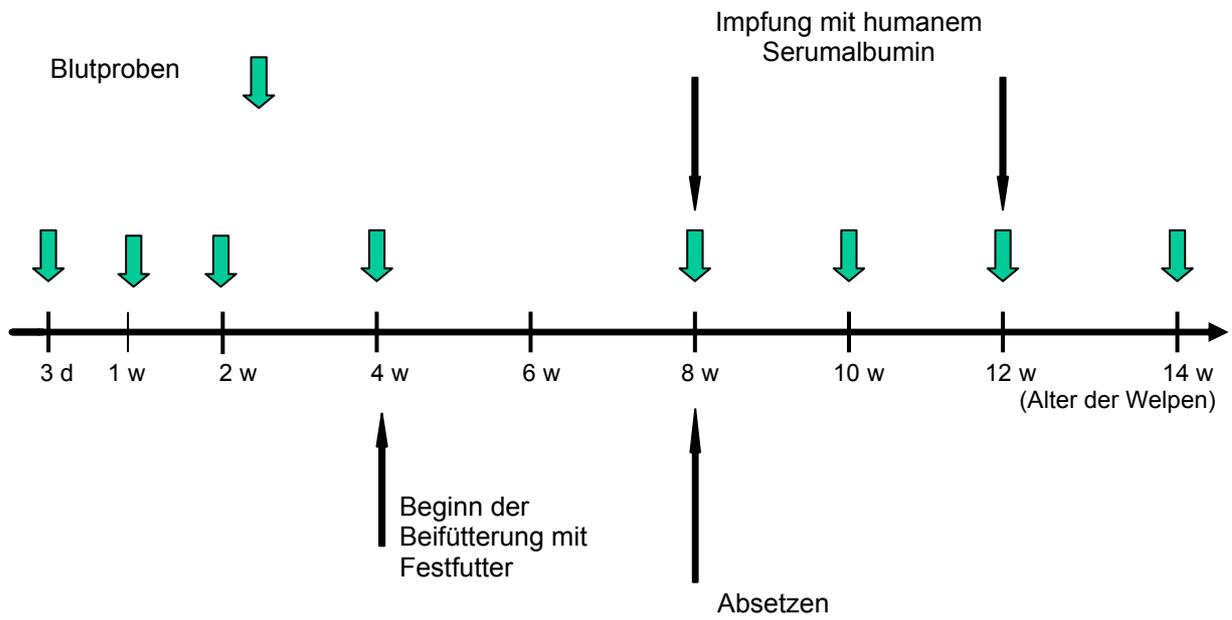


Abbildung 5: Versuchsablauf und Entnahmezeitpunkte der Blutproben

2 Versuchsordnung und Parameter

2.1 Rahmenbedingungen

2.1.1 Versuchstiere

Es wurden insgesamt 32 Tiere untersucht, aus zeitlichen Gründen konnten bis zur Abfassung der Arbeit jedoch nur die 23 Welpen, die in der Tabelle 13 aufgeführt sind, ausgewertet werden.

Tabelle 13: Die Versuchstiere nach Gruppen sortiert, deren Geschlecht und Gewicht bei Versuchsantritt (3. Lebenstag)

Hund	Gruppe	Wurf	Geschlecht	KM (g) Versuchsbeginn (Tag 3)
1	Kontrolle	1	männlich	417
2	Kontrolle	1	männlich	366
3	Kontrolle	1	weiblich	389
6	Kontrolle	2	männlich	382
7	Kontrolle	2	weiblich	336
10	LF 30 ppm	3	männlich	466
11	LF 30 ppm	3	weiblich	428
12	LF 30 ppm	3	weiblich	367
19	LF 30 ppm	5	männlich	473
20	LF 30 ppm	5	weiblich	437
17	LF 60 ppm	4	männlich	529
18	LF 60 ppm	4	weiblich	526
21	LF 60 ppm	5	weiblich	575
22	LF 60 ppm	5	weiblich	513
23	LF 60 ppm	5	weiblich	524
13	LF 60/95 ppm	3	männlich	404
14	LF 60/95 ppm	3	weiblich	445
15	LF 60/95 ppm	3	weiblich	400
16	LF 60/95 ppm	3	weiblich	460
4	LF 120 ppm	1	männlich	454
5	LF 120 ppm	1	weiblich	371
8	LF 120 ppm	2	männlich	364
9	LF 120 ppm	2	weiblich	366

2.1.2 Gruppeneinteilung

Tabelle 14: Anzahl der Tiere in den unterschiedlichen Versuchsgruppen

Kontrolle	5 Tiere
30 ppm	5 Tiere
60 ppm	5 Tiere
60 ppm im MAT, 95 ppm im Festfutter	4 Tiere
120 ppm	4 Tiere

Mit Ausnahme der LF 60/95 ppm-Gruppe befanden sich in jeder Versuchsgruppe 8 Welpen, wobei aus den genannten Gründen nur die in der Tabelle 13 und 14 angegebenen Hunde in die Auswertung miteinbezogen wurden.

Die Welpen wurden am Tag der Geburt und die folgenden beiden Tage bei der Mutter belassen um die Kolostrumaufnahme zu gewährleisten. Anschließend wurden sie von ihr getrennt, nach Geschlecht und Gewicht randomisiert und in die 5 Gruppen aufgeteilt. Aus jedem Wurf verblieb ein Welpe beim Muttertier.

2.1.3 Fütterung der Versuchstiere

2.1.3.1 Futterzusammensetzung

Eine Gruppe erhielt den unten aufgeführten Milchaustauscher bzw. später das Festfutter ohne Lactoferrinbeigabe (Kontrollgruppe), bei den anderen 4 Gruppen wurde dem Mineralpulvergemisch des Milchaustauschers so viel Lactoferrin beigegeben, dass durch die Herstellung des Milchaustauschers in diesem eine Konzentration von 30, 60 und 120 ppm Lactoferrin entstand.

Das ab der 4. Woche angebotene Festfutter war ebenfalls mit Lactoferrin in unten angegebenen Konzentrationen versetzt. Aus technischen Gründen wurde einer Versuchsgruppe, der anfangs Milchaustauscher mit der Konzentration 60 ppm Lactoferrin verabreicht worden war, später Trockenfutter der Konzentration 95 ppm verabreicht. Im Alter von 8 Wochen wurden die Welpen abgesetzt.

In den folgenden Tabellen sind die Zusammensetzung des Milchaustauschers und die des selbst analysierten Festfutters aufgeführt. (Zu den genauen Analyseverfahren und dem Vergleich des verabreichten Milchaustauschers mit der Muttermilch siehe Diss. Unsöld 2003.)

Milchaustauscher

Die Zusammensetzung des Milchaustauschers orientierte sich an der Zusammensetzung der Muttermilch. Nicht in den Lebensmittelkomponenten vorhandene notwendige Inhaltsstoffe wurden durch die Mineral- und Vitaminmischung zugesetzt.

Herstellung des Milchaustauschers

Für 100 g Milchaustauscher wurden verwendet (nach Kienzle und Landes 1995b)

10 g Eigelb

6 g Sonnenblumenöl

40 g Speisequark Magerstufe

43 g Milch (ultraheißerhitzt 1,5 % Fett)

1 g Mineralpulvergemisch (Mineralfutter und Vitamine, je nach Gruppe Lactoferrin)

Alle Zutaten wurden täglich frisch im Mixer gemischt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Inhaltsstoffe des Milchaustauschers
(in g/100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)

In g/100 g	Ra	Rp	Rfe	NfE	Rfa	BE (MJ)
Eigelb	0,08	1,30	1,10	0,07	0	0,5-0,8
Öl	0	0	6,00	0	0	0,23
Quark	0,40	6,80	0,20	1,08	0	0,19
Milch	0,3	1,46	0,04	2,06	0	0,07
Minmix	0,72	0	0	0	0	0
Summe	1,50	9,56	7,34	3,21	0	0,99-1,29

Tabelle 16: Aminosäuregehalte des Milchaustauschers
(in g/100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)

In g/100g	Linol-säure	Ile	Leu	Lys	Met	Cys	Phe	His	Thr	Trp	Val	Arg
Eigelb	0,01	0,07	0,11	0,08	0,04	0,02	0,07	0,03	0,07	0,02	0,10	0,08
Öl	0,66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quark	0	0,40	0,74	0,62	0,19	0,06	0,37	0,24	0,32	0,07	0,40	0,32
Milch	0	0,09	0,15	0,12	0,04	0,17	0,08	0,04	0,08	0,08	0,61	0,06
Summe	0,67	0,56	1,00	0,82	0,27	0,25	0,52	0,31	1,10	0,17	1,11	0,46

Tabelle 17: Mineralstoff- und Spurenelementgehalt des Milchaustauschers
(in 100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)

In 100g	Ra (mg)	Ca (mg)	P (mg)	Mg (mg)	K (mg)	Na (mg)	Fe (mg)	Cu (mg)	Zn (mg)	Mn (mg)	J (µg)
Eigelb	0,17	14,00	59,00	1,50	14,00	5,00	0,55	0,03	0,46	0	1,00
Öl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quark	0,40	28,00	76,00	4,00	38,00	14,00	0,20	0	0	0	0
Milch	0,39	49,45	40,85	6,45	43,00	43,00	0,03	0,00	0,22	0,22	0,43
Minmix	0,72	150,00	20,00	3,00	45,00	62,00	0,21	0,40	0,70	0,70	114,0
Summe	1,68	241,45	195,85	14,95	140,0	124,0	0,99	0,43	1,38	0,92	115,43

Tabelle 18: Vitamingehalt des Milchaustauschers
(in 100 g Milchaustauscher) (Meyer et al. 1986)

Pro 100 ml MAT	A (IE)	D3 (IE)	E (mg)	B1 (mg)	B2 (mg)	B6 (mg)	B12 (µg)	Biotin (µg)	Nikotin-säure (mg)	Panto-thens. (mg)
Eigelb	370,00	0	0,30	0,03	0,04	0,03	0,20	6,00	0,01	0,37
Öl	0	0	14,00	0	0	0	0	0	0	0
Quark	18,00	0	0	0,02	0,12	0,01	0	0	0,04	0,08
Milch	0	0,01	0,02	0,07	0,82	0,16	1,81	12,90	0,47	1,38
Minmix	300,00	0	0	0	0,52	0,70	0	5,00	1,00	0,05
Summe	688,00	0,01	14,32	0,12	1,50	0,90	2,01	23,90	1,52	1,88

Festfutter

Tabelle 19: Zusammensetzung des Trockenfutters (Weender Analyse)

In uS (Pellets)	Kontrolle	30 ppm	60 ppm	95 ppm	120 ppm
TS	94,43	94,43	92,70	94,79	94,69
Asche (%)	6,38	6,87	6,70	6,84	6,39
RP (%)	27,30	26,72	25,60	26,06	26,42
Rfa (%)	2,60	2,63	2,20	2,79	2,90
Rfe (%)	9,93	10,53	8,60	10,62	10,05
Nfe (%)	48,22	47,68	47,00	48,48	48,94

Tabelle 20: Mineralstoff- und Spurenelementgehalt des Trockenfutters
(in der TS)

	Kontrolle	30 ppm	60 ppm	95 ppm	120 ppm
Ca (g/kg)	11,72	13,54	12,68	13,20	12,97
P (g/kg)	4,01	4,25	3,91	4,34	3,85
Na (g/kg)	2,56	2,62	2,65	2,89	2,47
K (g/kg)	4,17	4,83	4,31	4,84	3,87
Zn (mg/kg)	95,18	100,99	101,57	85,99	111,85
Cu (mg/kg)	10,16	11,55	12,40	13,40	9,87
Mg (mg/kg)	527,70	548,05	504,28	466,87	518,14
Fe (mg/kg)	136,96	155,90	164,49	144,71	123,06
Mn (mg/kg)	26,40	28,96	26,63	25,34	25,90

2.1.3.2 Fütterungszeiten

Bis zum Ende der ersten Lebenswoche wurden die Welpen 7 mal täglich mit der Flasche (s.u.) gefüttert. Tagsüber alle 3 Stunden, nachts alle 4 Stunden.

Tag 8 bis Tag 17 wurde tagsüber 6 mal gefüttert und eine sechsstündige nächtliche Pause eingehalten, danach nur noch 5 mal mit einer achtstündigen nächtlichen Pause. Ab der Beifütterung im Alter von 4 Wochen wurde die Anzahl der Fütterungen auf 4 mal täglich reduziert, nach dem Absetzen mit 8 Wochen nur noch 3 mal täglich gefüttert. Zugang zu frischem Wasser war ständig gegeben.

2.1.3.3 Fütterungstechnik

Die Welpen wurden vor und nach jeder einzelnen Fütterung auf der Mettler-Waage SG 8001, Toledo, Schweiz gewogen und die Differenz als Futteraufnahme festgehalten (Differenzwägung). Zusätzlich wurde die jeweilige Menge des verabreichten Milchaustauschers bzw. des Festfutters notiert. Die Gabe des Milchaustauschers erfolgt anfangs ad lib., nach der 2. Woche rationiert, wobei die natürliche Gewichtsentwicklung der beim Muttertier verbliebenen Welpen als Anhaltspunkt für die Menge diente. Zur Flaschenfütterung wurde das Karlie®Saugflaschen-Set, 150 ml, D-Haaren verwendet. Der Milchaustauscher wurde täglich frisch gemixt, im Kühlschrank aufbewahrt und vor Verabreichung im "Petra electric"- Babykostwärmer, Typ BF1 (LZ 025 106), Deutschland bis auf 35°C erwärmt.

Bis zum Ende der 4. Woche, aus technischen Gründen in einigen Fällen auch bis Anfang der 5. Woche wurde ausschließlich der selbst hergestellte Milchaustauscher verwendet. Anschließend wurde bis Ende der 8. Woche die angebotene Menge Milchaustauscher kontinuierlich reduziert und dafür der Festfutteranteil am Gesamtfutter angehoben. Am Tag 56 wurden die Welpen abgesetzt und ab diesem Zeitpunkt ausschließlich mit Festfutter gefüttert. Mit Beginn der Beifütterung (4. Woche) fraßen die Hunde bereits selbständig vom Teller.

2.1.4 Kot- und Harnabsatz

Beides wurde anfangs nach jeder Fütterung durch Massage des Abdomens, des Genitalbereichs und des Anus mit einem feuchten, warmen Tuch stimuliert. Bis Ende der 2. Woche lernten die Hunde es, ohne Hilfe Kot und Harn abzusetzen.

2.1.5 Unterbringung

Die Hunde wurden anfangs in Schweineabferkelboxen und Welpenkisten, später in Pferdeboxen jeweils auf Heu gehalten.

Es wurden Wärmelampen und Hundedecken bereitgestellt.

2.1.6 Entwurmungen

In wöchentlichen Abständen wurde mit Banminth-Paste, Pfister, sowie einmalig mit Panacur® Tabletten, Hoechst Russel Vet Unterschleißheim, entwurmt.

2.2 Untersuchungsparameter und Analyseverfahren

2.2.1 Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung und Futterverwertung

Die Futteraufnahme wurde wie oben beschrieben ermittelt und die Gewichtsentwicklung der Tiere täglich festgehalten. Die Futterverwertung wurde als Quotient aus Futteraufnahme und Gewichtszunahme errechnet.

2.2.2 Bestimmung des roten und weißen Blutbildes

Materialien

- Butterfly (Microperfuseur, 0,7 mm, G22, Laboratoires Pharmaceutiques, VYCON, V-creeen, Ecouen, Frankreich)
- sterile schwarze 22 G-Kanüle (0,7 mm, Neolus Terumo®)
- Kalium-EDTA-Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nürnberg)

Probenentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der V.cephalica antebrachii, bei den jüngeren Welpen mittels Butterfly, bei den älteren mit einer schwarzen 22 G-Kanüle. Als Blutröhrchen wurde das Kalium-EDTA-Röhrchen verwendet.

Zeitpunkte

Die erste Blutuntersuchung fand am Tag 28, also vor der Beifütterung statt. Vorher war dies aus Gründen der dazu notwendigen Blutmenge (ca. 0,5 ml) nicht möglich. Weitere Untersuchungen erfolgten bis zum Versuchsende (14. Woche) im zweiwöchigen Abstand (außer 6. Woche) und decken sich mit den Plasmaentnahmezeitpunkten (s.u.).

Untersuchung

Das Blutbild wurde in der I. Medizinischen Tierklinik der LMU München mittels Cell Dyn 3500 (Abatt, Wiesbaden) untersucht.

2.2.3 Untersuchungen des Plasmas

2.2.3.1 Parameter

Plasma wurde zu 8 verschiedenen Zeitpunkten mit dem Ziel gewonnen, den *Gesamt-IgG- und IgA-Gehalt, Antikörper gegen humanes Serumalbumin* und den *antioxidativen Status* der Welpen zu bestimmen.

2.2.3.2 Blutentnahmezeitpunkte

- 1) Tag 3
- 2) Tag 7
- 3) Tag 14
- 4) Tag 28
- 5) Woche 8
- 6) Woche 10
- 7) Woche 12
- 8) Woche 14

2.2.3.3 Entnahme

Materialien

- Butterfly (Microperfuseur, 0,7 mm, G-22, Laboratoires Pharmaceutiques, VYCON, V-creeen, Ecouen, Frankreich)
- sterile schwarze 22 G-Kanüle (Neolus Terumo®)
- Microvette®200LH-System, (Sarstedt, Nürnbergrecht)
- Zentrifuge
- PBS (pH 7,2)
- Eppendorf-Cups

Durchführung

Die Blutentnahme erfolgte wie oben beschrieben, als Blutröhrchen wurden jedoch Microvetten verwendet. Diese wurden zentrifugiert und das dadurch gewonnene Plasma für die Immunglobulinbestimmung 1:100 verdünnt. Das verdünnte und unverdünnte Plasma wurde in Eppendorf-Cups bei -80°C eingefroren.

2.2.3.4 Bestimmung des antioxidativen Status

Der antioxidative Status wurde durch Charakterisierung der Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), der antioxidativ wirksamen Vitamine E und C und der Metaboliten Harnsäure und Bilirubin am Institut für Physiologie und Physiologische Chemie, Veterinärstr. 13, München, unter der Leitung von Herrn Dr. Stohrer bestimmt. Zusätzlich wurde freies Eisen, Lactat, CK und GOT im Blut untersucht. Diese Arbeiten wurden von Frau Julia Schwarzer durchgeführt. (Diss. J. Schwarzer 2003)

2.2.3.5 Bestimmung der Immunglobuline

Die Messungen des Gesamt-IgG- und IgA-Gehaltes, sowie der Antikörper gegen humanes Serumalbumin im Plasma werden mittels Sandwich ELISA-Verfahren nach Erhard et al. (1995) am Institut für Tierhygiene, Schwere-Reiter-Str.9, München unter der Leitung von Herrn Prof. Erhard erfolgen.

Der Gesamt-IgG- und IgA-Status der Welpen wird dabei von allen Plasmaproben bestimmt. Antikörper gegen humanes Serumalbumin werden dagegen nur in den Proben der 10., 12., und 14. Woche gemessen. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in der 8. und 12. Lebenswoche mit humanem Serumalbumin immunisiert.

Diese Arbeiten werden von Frau Strodbeck und Frau Regulski durchgeführt. (Diss. S. Strodbeck und S. Regulski 2004).

2.2.4 Untersuchungen in den Faeces

- Der Kot wurde mikrobiologisch untersucht.

Folgende weitere Parameter wurden im Kot bestimmt.

- pH-Wert
- L-Lactatgehalt
- Ammoniakgehalt
- TS-Gehalt

2.2.4.1 Untersuchungszeitpunkte

Für alle oben genannten Untersuchungen mit Ausnahme der TS, war der Kot an den folgenden 4 Zeitpunkten gesammelt und aufbereitet worden.

Der pH-Wert wurde immer sofort im frischen Kot gemessen.

- 1) Tag 3 bis Tag 8 (aus technischen Gründen jedoch manchmal erst bis Ende der 2. Woche)
- 2) vor der Beifütterung (Woche 4)
- 3) in der 8. Woche
- 4) in der 14. Woche

2.2.4.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Der Kot jedes Welpen wurde am Institut für Tierhygiene und Tierschutz der LMU München, Schwere-Reiter-Str.9, unter der Leitung von Herrn Prof. Erhard zu den oben genannten Zeitpunkten mikrobiologisch untersucht.

Parameter

- Gesamtkeimzahl
- E. coli
- Enterococcen
- Lactobacillen und Leuconostoc
- Clostridien

Vorbereitung

Der Kot der Welpen wurde in sterilen Kotröhrchen gesammelt und aus der Mitte des Kotes 1 Gramm entnommen.

Durchführung

Verwendete Nährböden

Keimgruppe	Bezeichnung	Zusammensetzung
Gesamtkeimzahl	Caso (Merck)	Casein, Pepton, Sojamehl, Agar Agar
E. coli	McKonkey (Merck)	Pepton aus Fleisch und Casein, Lactose, Gallensalz, Neutralrot, Kristallviolett, Agar Agar
Enterococcen	CNA (Biomérieux)	Pepton, Hydrolysat pflanzl. und tierischer Proteine, Herzpepton, Maisstärke, NaCl, Hammelblut, Antibiotikamischung, Agar Agar
Lactobacillen/ Leuconostoc	Rogosa (Merck, selbstgegossen)	Pepton, Hefeextrakt, Glucose, Kaliumdihydrogenphosphat, Ammoniumcitrat, Tween Natriumacetat, Magnesiumsulfat, Tween Eisensulfat, Mangansulfat
Clostridien	RCM (Merck, selbstgegossen)	Pepton, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Glucose, Stärke, Salz, Natriumacetat, Cysteiniumchlorid, Agar Agar, Polymyxin B (Sigma)

Weitere Materialien

- Petrischalen (Greiner Labortechnik)
- Enterotube-II-BBL (Becton Dickinson, Reutlingen)

- MRS-Agar (Biomérieux, Nürtingen)
- Standard-I-Agar (Merck, Darmstadt)

- API-Strep System (Biomérieux, Nürtingen)
- API-20A-System (Biomérieux, Nürtingen)
- Anaerocult C (Merck, Darmstadt)
- Anaerocult A (Merck, Darmstadt)

- Oxidasestäbchen (Baktident Oxidase von Merck, Darmstadt)
- Kovacs-Reagenz (Merck, Darmstadt)
- VPI (KOH) (Biomérieux, Nürtingen)
- VPI2 (alpha-Naphtol) (Biomérieux, Nürtingen)

Verdünnung der Proben

Mit dem entnommenen Gramm Kot wurde mittels steriler Kochsalzlösung eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten erstellt. Dazu wurde der entnommene Kot in einer Petrischale mit 2 Milliliter Kochsalzlösung aufgeschlemmt und in ein mit 7 Milliliter Kochsalzlösung gefülltes Röhrchen überführt, so dass eine Verdünnung von 1:10 entstand. Nach dem Mischen wurde wiederum ein Milliliter der Suspension in das nächste, mit 9 Milliliter Kochsalz gefüllte Röhrchen pipettiert, um die Kotsuspension um eine weitere Zehnerpotenz zu verdünnen. Diese Verdünnungsschritte wurden wiederholt bis eine Suspension von 1:10 Mrd. entstand.

Beimpfung der Platten

Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahlen wurden die Platten so beimpft, dass die Verdünnungsbereiche 1:100 000 bis 1:10 Mrd. abgedeckt wurden.

Bei den E. coli und Enterococcen wurden Verdünnungen von 1:10 000 bis 1:1 Mrd. verwendet, bei den Lactobacillen 1:1000 bis 1:100 Mio.

Clostridien wurden aus den Verdünnungsbereichen 1:1 Mio. bis 1:10 Mrd. auf die Platten verimpft.

Gesamtkeimzahl

Zur Untersuchung der Gesamtkeimzahlen wurden Caso-Platten verwendet und darauf unter sterilen Bedingungen 0,1 Milliliter der jeweils unterschiedlich verdünnten Probe verimpft und ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte aerob 24 Stunden bei 38°C. Es folgte eine optische Auszählung um die sich in einem Gramm Kot befindlichen Colony Forming Units zu erfassen.

E. coli

Zur Bestimmung der E. coli-Keime wurden McKonkey-Platten verwendet. Auch hier wurde unter aeroben Bedingungen 24 Stunden bei 38°C bebrütet und ausgezählt. Um das Vorhandensein anderer Bakterien auszuschließen, wurde ein Teil der gewachsenen Kolonien mit der Gram-Färbung angefärbt und die gram-negativ reagierenden Stäbchen auf Standard-I-Agar verimpft, um sie nochmals für 24 Stunden bei 38°C zu bebrüten. Nun wurde eine der gewachsenen Kolonien mittels Oxidasestäbchen auf das Vorhandensein von Oxidase untersucht. Ein Teil der negativ reagierenden Bakterienkolonien wurde anschließend auf Enterotube-II-BBL verimpft, um ein weiteres Mal für 24 Stunden bei 38°C bebrütet zu werden. Ein Großteil der Reaktionen liefen spontan ab, für die Indolreaktion musste jedoch nach der Bebrütung noch Kovacs-Reagenz zugegeben werden, für die Volges-Proskauer-Reaktion noch VPI (KOH) und VPI2 (alpha-Naphtol). Die positiven Reaktionen wurden mit einer Zahl bewertet, die Zahlen wurden anschließend addiert und führten mit Hilfe der beigefügten Anleitung zur genauen Identifizierung des Keims.

Enterococcen

Zur Bestimmung der Enterococcen wurde das CNA-Medium verwendet. Die Enterococcen wurden 24 Stunden bei 44 °C bebrütet und ausgezählt. Auch hier wurde die Gram-Färbung angewandt und die gram-positiven Bakterien nochmals auf Standard-I-Agar 24 Stunden bei 38 °C bebrütet. Anschließend wurde auf Vorhandensein einer Katalase mittels Verreiben einer Kolonie in einem Tropfen 3%igen H₂O₂ auf einem Objektträger untersucht. Enterococcen sind Katalase negativ und dürfen damit bei dieser Untersuchung keine Blasen bilden. Die nun eindeutig als Enterococcen identifizierten Keime wurden ausgezählt und anschließend für das API-20-Strep-System vorbereitet. Dazu wurde eine Kolonie in 300 Mikroliter steriles Wasser suspendiert und damit eine Hammelblutplatte überflutet. Die Bebrütung erfolgte 24 Stunden bei 44°C. Die Kolonien der Platte wurden daraufhin mit einem Tupfer abgenommen, in steriles Wasser suspendiert und teilweise direkt auf API, teilweise auch erst nach Übertragung in ein API-GP-Medium auf das API-System überimpft. Das so

behandelte API-System wurde 4 Stunden aerob bebrütet. Nach dieser Zeit erfolgte die 1. Auswertung mittels API-Auswertungsprogramm am Computer. Evtl. war eine Verlängerung der Bebrütungszeit um 20 Stunden von Nöten.

Lactobacillen/ Leuconostoc

Die Lactobacillen und Leuconostoc wurden mit Hilfe des Rogosa-Agar angezüchtet. Da es sich bei diesen um mikroaerophile Bakterien handelt, war eine Bebrütung im Anaerobiertopf mit Anaerocult C nötig. Die Bebrütungsdauer betrug 72 Stunden bei 38°C. Auch hier wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und nach Gram eingefärbt. Eine weitere Differenzierung erfolgte mittels MRS-Agar, auf den die Kolonien übertragen und 24 Stunden lang anaerob bei 38 °C bebrütet wurden. Nun wurden mit einem Wattetupfer alle Kulturen von der Anzuchtplatte abgenommen und in 2 Milliliter sterile Aqua dest. übertragen. Somit entstand eine dichte Suspension. Einige Tropfen dieser Suspension wurden in eine Ampulle Suspensionsmedium übertragen, so dass die Trübung McFarland 2 entsprach. Danach wurde die doppelte Anzahl der oben verwendeten Tropfen in eine Ampulle API-50-CHL Medium verbracht und damit das API-50-System beimpft. Nach der Beschichtung mit Paraffinöl wurde das System 24 Stunden bei 38°C im Brutschrank gelassen und dann per Computer ausgewertet.

Clostridien

Zur Untersuchung auf Clostridien wurden RCM-Platten verwendet. Diese wurden 48 Stunden anaerob bei 38°C im Anaerobiertopf mit Hilfe von Anaerocult A bebrütet. Hier wurde direkt wie oben beschrieben auf Katalase untersucht, um das Wachstum anderer Keime auszuschließen. Clostridien sind katalase-negativ. Die Vorbereitung für das API-20A-System fand mittels einer aeroben und anaeroben Bebrütung zweier Blutplatten statt, die mit den, durch die Bebrütung der RCM-Platten gewonnenen Kolonien beimpft worden waren. Diese 24 stündige Bebrütung ermöglichte es herauszufinden, ob sich außer den gewollten Clostridien auch noch ungewollte

Bacillen unter den bebrüteten Keimen befanden. Clostridien sind obligate Anaerobier, Bacillen wachsen auch unter aeroben Bedingungen. Alle, sich auf der anaeroben Platte befindlichen Keime wurden auf das API-20A-System verimpft, 24 Stunden bebrütet und nach Zugabe der vorgeschriebenen Reagenzien abgelesen und mittels Computerprogramm ausgewertet.

2.2.4.3 pH-Messung

Der pH-Wert wurde mittels pH-Elektrode des pH-Meters 325 (Sen Tix 97T, WTW, Wien) immer sofort im frischen Kot gemessen. Dazu wurde der Kot vorher mit Aqua dest. (1:5) gemischt und die Elektrode in das Kot-Wasser-Gemisch gehalten.

2.2.4.4 Bestimmung des L-Lactatgehaltes

Vorbereitung

Ein Teil Kot wurde mit 10 Teilen 0,6 molarer Perchlorsäure versetzt, homogenisiert, zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und eingefroren.

Prinzip

L-Lactat wird durch NAD (Nicotinamid-adenin-dinucleotid) in Gegenwart von L-LDH (Lactatdehydrogenase) oxidiert. Dabei entstehen Pyruvat und NADH. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt stark auf der Seite des Lactats. Nur durch eine Folgereaktion, in der mit Hilfe des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und L-Glutamat das Pyruvat weiter umgesetzt wird, kann das Gleichgewicht der Reaktion so verschoben werden, dass alles Lactat bestimmt wird.

Chemikalien

Boehringer

NAD (S. 459; Nr. 621650)

GPT (S. 445; Nr. 737127)

L-LDH (S. 448; Nr. 127884)

Fluka

L-Glutaminsäure (S.715; Nr. 49450)

Glycyl-Glycin (S. 725; Nr. 50200)

Lithium-L-Lactat (S. 913; Nr. 62556)

Herstellung der Chemikalien

Glycylglycinpufferlösung (pH 10)

4,75 Gramm Glycylglycin und 0,88 Gramm L-Glutaminsäure wurden mit ca. 50 Milliliter bidest. Wasser gelöst. Ein pH-Wert von 10 wurde mit Hilfe von Natronlauge (8 Gramm NaOH mit Wasser zu 100 Milliliter) eingestellt. Die Lösung wurde mit bidest. Wasser auf 60 Milliliter aufgefüllt. Sie war bei 4°C 3 Monate haltbar.

NAD-Lösung

210 Milligramm NAD wurden mit 6 Milliliter bidestilliertem Wasser gelöst. Auch diese Lösung war bei 4°C 4 Wochen haltbar.

GPT

Hier handelte es sich um eine Kristallsuspension, wobei 10 Milligramm in 1 Milliliter Ammoniumsulfatlösung (Konzentration 3,2 mol/l, 80 U/mg) gelöst waren. Die Lösung war bei 4°C 1 Jahr haltbar.

L-LDH

10 Milligramm waren in 1 Milliliter Glycerin/Wasser-Mischung (Massenkonzentration 50 g/100 ml, 550 U/ml) gelöst. Die Suspension war bei 4°C ein Jahr haltbar.

Geräte

Spektralphotometer Wellenlänge 365 nm

Meßküvetten 1 cm Schichtdicke

Pipetten

Einweghandschuhe

Rührspatel

Handschweiß enthält Milchsäure, deshalb war darauf zu achten, dass Pipettenspitzen und alles was sonst mit der Probe in Kontakt kam nicht mit den Fingern berührt wurde, sondern immer mit Handschuhen.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: 365 nm

Küvette: 1 cm Schichtdicke

Temperatur: 25°C

Testvolumen: 1,120 ml

Messung: gegen Luft

In die Küvetten wurde pipettiert

	Leerwert	Probe (je doppelt)
Glutamat/Glycinpuffer	0,500 ml	0,500 ml
NAD-Lösung	0,100 ml	0,100 ml
GPT	0,010 ml	0,010 ml
Probelösung	-	0,050 ml
bidest. Wasser	0,500 ml	0,450 ml
dann gemischt (Rührspatel) und nach ca. 5 min die Extinktion gemessen (E1). Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von		
L-LDH	0,010 ml	0,010 ml
dann gemischt und nach Ablauf der Reaktion (ca.20-30 min) die Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar hintereinander gemessen (E2).		

Für Leerwert und Probe wurden die Extinktionsdifferenzen berechnet (E2-E1), und die Differenz des Leerwerts von der Extinktionsdifferenz der Probe abgezogen.

$$\Delta E = (E2-E1)_{\text{Probe}} - (E2-E1)_{\text{Leerwert}}$$

Berechnung

$$c = \frac{V \cdot MG}{\Delta \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E \text{ [g/l]}$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

Δ = Extinktionskoeffizient von NADH bei 365 nm: 3,4 [l/(mmol*cm)]

Folglich für L-Lactat

$$c = \frac{1,120 \cdot 89,1}{3,4 \cdot 1 \cdot 0,050 \cdot 1000} \cdot \Delta E \text{ [g L-Lactat/l]}$$

Da eine Verdünnung vorgenommen worden war, musste das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Dieser Betrag hier nach Umrechnung von Milliliter auf Gramm 11,25, da 1000 Milliliter Kot-Perchlorsäuregemisch ein Gewicht von 1022,73 Gramm hatten.

Bei Analyse der Reinsubstanz waren Ergebnisse von ca. 98 % zu erwarten. Als Standard haben wir Lithium-L-Lactat (Molmasse 96,0 g/mol) verwendet. Dieses wurde in Konzentrationen von 0,05; 0,10; 0,15 und 0,30 Gramm Li-L-Lactat/l angesetzt.

2.2.4.5 Messung des Ammoniakgehaltes**Materialien und Reagenzien**

- 14 ml Röhrchen (REF 55.463, Sarstedt, Nürnberg)
- rauchende Salzsäure
- NaOH-Lösung (10mol/l)

Gerät

- WTW-Ammoniak elektrode NH 500/2 (Wien)
- pH-Meter 325

Vorbereitung

Der frische Kot wurde 1:10 mit Aqua tridest. versetzt, homogenisiert und in der oben genannten Zentrifuge zentrifugiert. 5 Milliliter des Überstandes wurden mit 0,4 Milliliter 1:4 verdünnter rauchender HCl versetzt und sofort eingefroren.

Messung

Die Messung erfolgte mit der WTW- Ammoniak elektrode und dem pH-Meter 325 in der aufgetauten, und im Wasserbad auf 25°C temperierten Probe.

Dazu wurde eine Ammonium-Standardlösung (10g/l) in Zehnerschritten bis 1:10 000 verdünnt, jeder der Lösungen 2% NaOH-Lösung (10mol/l) zugegeben um eine Umwandlung des Ammoniumions in Ammoniak zu erreichen, das pH-Meter auf mV umgestellt und während der Messung gerührt. Der stabile Wert wurde abgelesen und mit den Werten eine halblogarithmische Eichkurve erstellt. Die einzelnen Proben wurden ebenfalls mit 2%NaOH-Lösung versetzt und dann der mV-Wert abgelesen. Anhand der Kalibriergeraden konnte die Ammoniakkonzentration der Proben ermittelt werden. Anschließend mussten die Werte noch mit dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert werden.

2.2.4.6 TS-Bestimmung

Im Unterschied zu allen anderen Kotuntersuchungen wurde die Kot-Trockensubstanz aller Welpen wöchentlich bestimmt, sobald die Welpen ausreichend Kot für diese Untersuchung absetzten (ab der 2. Woche).

Für die Untersuchung der Kot-TS wurde der Kot der Welpen wöchentlich in Kotbecher gesammelt, das Kot- und Bechergewicht notiert und der Kot eingefroren. Zur Bestimmung wurden die Kotbecher für 36 Stunden in den Heraeus-Trockenschrank verbracht, im Exsikkator 30 min abgekühlt und anschließend neu gewogen. Durch Subtraktion des Bechergewichtes vom Auswaagegewicht wurde das

Gewicht des getrockneten Kotes ermittelt und durch die Einwaage des frischen Kotes dividiert. Um die Kot-TS in Prozent zu ermitteln, wurde das erhaltene Ergebnis noch mit 100 multipliziert.

3 Statistische Auswertungen

Die Auswertungen der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SAS für Windows.

Es wurde eine Varianzanalyse und der LS-means-Test zur Feststellung von Unterschieden zwischen den einzelnen Versuchsgruppen durchgeführt. Außerdem wurde der T-Test zu Hilfe genommen, um Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Gesamtheit der Lactoferringruppen zu überprüfen.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung wurden logarithmiert, um die Signifikanzprüfung zu erleichtern.

D Ergebnisse

1 Gewichtsentwicklung

Tabelle 21: Einteilung der Tiere in die Versuchsgruppen

Kontrolle	5 Tiere, 3 Rüden, 2 Hündinnen
30 ppm	5 Tiere, 2 Rüden, 3 Hündinnen
60 ppm	5 Tiere, 1 Rüde, 4 Hündinnen
60 ppm im MAT, 95 ppm im Festfutter	4 Tiere, 1 Rüde, 3 Hündinnen
120 ppm	4 Tiere, 2 Rüden, 2 Hündinnen

Wie bereits erwähnt, wurden insgesamt 32 Tiere untersucht, wobei sich in jeder Versuchsgruppe, mit Ausnahme der LF 60/95 ppm-Gruppe, 8 Welpen befanden. Aus zeitlichen Gründen wurden bis zur Abfassung der Arbeit jedoch nur 23 Welpen, die in der Tabelle 21 aufgeführt sind, ausgewertet.

Der Fütterungsversuch dauerte 14 Wochen. In dieser Zeit wurden die Tiere täglich gewogen und die Gewichtsentwicklung festgehalten.

Bei Versuchsbeginn (Tag 3) wogen die Hunde durchschnittlich 430 Gramm, im Alter von 14 Wochen hatten sie ein Durchschnittsgewicht von 6668 Gramm.

Im Folgenden wird ein Überblick über die Anfangs- und Endgewichte und die wöchentliche Gewichtsentwicklung der verschiedenen Versuchsgruppen gegeben.

Dabei wurden die Tiere immer am Abend des letzten Tages der jeweiligen Lebenswoche gewogen.

Tabelle 22: Durchschnittliche Anfangs- und Endgewichte der Welpen jeder Gruppe in g (Mittelwert \pm Standardabweichung s)

Gruppe	Durchschnittliches Anfangsgewicht Tag 3	Durchschnittliches Endgewicht Tag 98
Kontrolle	378 \pm 30 ^{abc}	6739 \pm 490
LF 30 ppm	428 \pm 10 ^{abc}	6718 \pm 967
LF 60 ppm	533 \pm 24 ^{abc}	6802 \pm 833
LF 60/95 ppm	407 \pm 44 ^{abc}	6332 \pm 252
LF 120 ppm	394 \pm 41 ^{abc}	6747 \pm 792

a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Bereits zu Versuchsbeginn gab es signifikante Gruppenunterschiede. Das mittlere Tag 3-Gewicht der Kontrolltiere war am niedrigsten, gefolgt von den Gewichten der LF 120 ppm-Gruppe, die ebenfalls im Schnitt unter 400 Gramm lagen. Am schwersten waren die Tiere der LF 60 ppm-Gruppe mit über 500 Gramm. Die Standardabweichungen innerhalb einer Gruppe waren bei den Anfangsgewichten gering.

Am Ende des Versuchs hatte die LF 60/95 ppm-Gruppe mit durchschnittlich 6,3 Kilogramm ein deutlich geringeres Gewicht als die anderen Versuchsgruppen, die zwischen 6,7 und 6,8 Kilogramm lagen.

Tabelle 23: Durchschnittsgewichte der Hunde der einzelnen Versuchsgruppen am Ende jeder Lebenswoche in g/Hund (Mittelwert $\times \pm$ Standardabweichung s)

Lebens-woche	Gruppe	Durchschnittsgewicht	Lebens-woche	Gruppe	Durchschnittsgewicht
1	Kontrolle	568 \pm 106 ^{bc}	8	Kontrolle	3556 \pm 296
	LF 30 ppm	703 \pm 32 ^{bc}		LF 30 ppm	3500 \pm 301
	LF 60 ppm	745 \pm 80 ^b		LF 60 ppm	3600 \pm 308
	LF 60/95 ppm	592 \pm 39 ^{bc}		LF 60/95ppm	3385 \pm 187
	LF 120 ppm	543 \pm 103 ^{bc}		LF 120 ppm	3596 \pm 698
2	Kontrolle	864 \pm 161 ^c	9	Kontrolle	4148 \pm 297
	LF 30 ppm	1001 \pm 95		LF 30 ppm	4027 \pm 470
	LF 60 ppm	1054 \pm 116		LF 60 ppm	4298 \pm 614
	LF 60/95ppm	935 \pm 20 ^c		LF 60/95ppm	3857 \pm 133
	LF 120 ppm	879 \pm 169 ^c		LF 120 ppm	4050 \pm 657
3	Kontrolle	1106 \pm 228 ^c	10	Kontrolle	4576 \pm 391
	LF 30 ppm	1323 \pm 71		LF 30 ppm	4402 \pm 609
	LF 60 ppm	1456 \pm 156 ^c		LF 60 ppm	4685 \pm 425
	LF 60/95ppm	1191 \pm 30 ^c		LF 60/95ppm	4125 \pm 237
	LF 120 ppm	1158 \pm 270 ^c		LF 120 ppm	4539 \pm 702
4	Kontrolle	1529 \pm 135	11	Kontrolle	5096 \pm 454 ^c
	LF 30 ppm	1608 \pm 135		LF 30 ppm	5034 \pm 793
	LF 60 ppm	1822 \pm 193 ^c		LF 60 ppm	5485 \pm 750
	LF 60/95ppm	1525 \pm 67 ^c		LF 60/95ppm	4548 \pm 149 ^c
	LF 120 ppm	1488 \pm 237 ^c		LF 120 ppm	5034 \pm 633
5	Kontrolle	2064 \pm 235	12	Kontrolle	5577 \pm 458
	LF 30 ppm	2047 \pm 218		LF 30 ppm	5613 \pm 845
	LF 60 ppm	2219 \pm 236		LF 60 ppm	5904 \pm 719
	LF 60/95ppm	1941 \pm 22		LF 60/95ppm	5171 \pm 270
	LF 120 ppm	1998 \pm 325		LF 120 ppm	5533 \pm 760
6	Kontrolle	2539 \pm 239	13	Kontrolle	6213 \pm 494
	LF 30 ppm	2578 \pm 183		LF 30 ppm	6134 \pm 810
	LF 60 ppm	2827 \pm 346		LF 60 ppm	6348 \pm 666
	LF 60/95ppm	2473 \pm 32		LF 60/95ppm	5762 \pm 254
	LF 120 ppm	2529 \pm 503		LF 120 ppm	6129 \pm 810
7	Kontrolle	3133 \pm 261	14	Kontrolle	6739 \pm 490
	LF 30 ppm	3056 \pm 274		LF 30 ppm	6718 \pm 967
	LF 60 ppm	3288 \pm 356		LF 60 ppm	6802 \pm 833
	LF 60/95ppm	2937 \pm 126		LF 60/95ppm	6332 \pm 252
	LF 120 ppm	3007 \pm 563		LF 120 ppm	6747 \pm 792

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Bis zur 4. Lebenswoche waren signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen, die ihren Ausgang bereits mit der ungleichen Gewichtsverteilung zu Beginn des Versuchs genommen hatten, festzustellen. Die Gewichte der Kontrollgruppe, LF 120 ppm- und LF 60/95 ppm-Gruppen waren bis zu diesem Zeitpunkt, im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen, gering. Danach legte die Kontrollgruppe etwas zu. Ab der 6. Lebenswoche wiesen die Hunde der LF 60 ppm-Gruppe die höchsten Gewichte auf, die anderen Gruppen waren sich zu diesem Zeitpunkt sehr ähnlich. Die LF 60/95 ppm-Gruppe lag in der Gewichtsentwicklung ab Beginn der 8. Lebenswoche hinter den anderen Gruppen und holte dieses Defizit bis zum Ende des Versuchs auch nicht wieder auf. Gewichtsunterschiede zu Versuchsende gab es unter den anderen Versuchsgruppen kaum.

Anfangs war die Standardabweichung der Kontrolle und LF 120 ppm-Gruppe im Gegensatz zu den anderen Gruppen hoch, später die der LF 30-, 60-, und LF 120 ppm-Gruppe. Die teilweise unterschiedliche Geschlechtsverteilung in den Gruppen hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Gewichtsentwicklung, ebenso wenig der Einsatz von Lactoferrin.

Aus den wöchentlichen Gewichtsdifferenzen wurden die mittleren wöchentlichen Zunahmen, die aus der folgenden Tabelle zu entnehmen sind, errechnet.

Tabelle 24: Durchschnittliche wöchentliche Gewichtszunahmen in g je Hund und Gruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung s)

Lebens-woche	Gruppe	durchschnittliche Zunahmen	Lebens-woche	Gruppe	durchschnittliche Zunahmen
1	Kontrolle	190 \pm 85	8	Kontrolle	424 \pm 145
	LF 30 ppm	275 \pm 95		LF 30 ppm	444 \pm 62
	LF 60 ppm	212 \pm 94		LF 60 ppm	312 \pm 111
	LF 60/95 ppm	185 \pm 23		LF 60/95ppm	448 \pm 85
	LF 120 ppm	148 \pm 71		LF 120 ppm	490 \pm 141
2	Kontrolle	296 \pm 56	9	Kontrolle	591 \pm 280
	LF 30 ppm	298 \pm 85		LF 30 ppm	533 \pm 179
	LF 60 ppm	309 \pm 63		LF 60 ppm	698 \pm 444
	LF 60/95ppm	344 \pm 31		LF 60/95ppm	472 \pm 57
	LF 120 ppm	337 \pm 71		LF 120 ppm	454 \pm 175
3	Kontrolle	243 \pm 85	10	Kontrolle	428 \pm 114
	LF 30 ppm	321 \pm 88		LF 30 ppm	374 \pm 210
	LF 60 ppm	401 \pm 48		LF 60 ppm	591 \pm 232
	LF 60/95ppm	256 \pm 23		LF 60/95ppm	410 \pm 176
	LF 120 ppm	279 \pm 101		LF 120 ppm	488 \pm 70
4	Kontrolle	423 \pm 103	11	Kontrolle	519 \pm 91
	LF 30 ppm	282 \pm 92		LF 30 ppm	632 \pm 227
	LF 60 ppm	366 \pm 40		LF 60 ppm	801 \pm 520
	LF 60/95ppm	334 \pm 41		LF 60/95ppm	423 \pm 156
	LF 120 ppm	330 \pm 70		LF 120 ppm	496 \pm 129
5	Kontrolle	534 \pm 148	12	Kontrolle	482 \pm 73
	LF 30 ppm	439 \pm 116		LF 30 ppm	579 \pm 143
	LF 60 ppm	397 \pm 64		LF 60 ppm	419 \pm 484
	LF 60/95ppm	416 \pm 50		LF 60/95ppm	624 \pm 132
	LF 120 ppm	510 \pm 93		LF 120 ppm	499 \pm 139
6	Kontrolle	475 \pm 49	13	Kontrolle	636 \pm 122
	LF 30 ppm	531 \pm 113		LF 30 ppm	521 \pm 220
	LF 60 ppm	608 \pm 142		LF 60 ppm	443 \pm 141
	LF 60/95ppm	532 \pm 45		LF 60/95ppm	591 \pm 95
	LF 120 ppm	531 \pm 180		LF 120 ppm	596 \pm 89
7	Kontrolle	594 \pm 128	14	Kontrolle	526 \pm 16
	LF 30 ppm	478 \pm 77		LF 30 ppm	584 \pm 169
	LF 60 ppm	461 \pm 169		LF 60 ppm	631 \pm 252
	LF 60/95ppm	464 \pm 95		LF 60/95ppm	570 \pm 39
	LF 120 ppm	578 \pm 96		LF 120 ppm	618 \pm 141

Die Übersicht über die Gewichtszunahmen bekräftigt das, was bereits über die Gewichtsentwicklung der Welpen gesagt wurde. Nahm eine Gruppe in einer Woche nur gering zu, glich sie das meist im Laufe der nächsten Zeit aus. Die absoluten Zunahmen lagen anfänglich bei in etwa 200 Gramm und stiegen zu Versuchsende auf über 600 Gramm wöchentlich. Relativ zum aktuellen Körpergewicht waren diese jedoch in der 1. Lebenswoche mit ca. 32% am höchsten und in der 14. Woche mit rund 9% am niedrigsten.

Ab der 8., bis inklusive der 10. Woche, also mit dem Beginn des Absetzens, kam es vorübergehend zu einem leichten Rückgang der Zunahmen. Die Standardabweichung stieg mit Beginn der 6. Woche, die Gewichte der Welpen variierten zunehmend.

2 Futtermaufnahme

Die Fütterung erfolgte nach den ersten beiden Lebenswochen rationiert und der individuellen Gewichtsentwicklung des Tieres angepasst.

Die Tabelle 25 gibt über die durchschnittlich pro Woche aufgenommenen Futtermengen der Welpen verschiedener Gruppen Aufschluss.

Tabelle 25: Wöchentliche durchschnittliche Futtermaufnahme in g je Gruppe und Tier (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s)

Woche	Kontrolle	LF 30 ppm	LF 60 ppm	LF 60/95 ppm	LF 120 ppm
1	445 \pm 135	583 \pm 51	589 \pm 206	507 \pm 25	413 \pm 121
2	946 \pm 293	1044 \pm 77	1029 \pm 141	972 \pm 68	1073 \pm 302
3	978 \pm 294 ^{bc}	1150 \pm 262 ^b	1445 \pm 253 ^{bc}	1006 \pm 60 ^{bc}	995 \pm 184 ^{bc}
4	1482 \pm 101 ^{ac}	1231 \pm 183 ^{ac}	1401 \pm 269 ^a	1234 \pm 130 ^a	1377 \pm 159 ^a
5	1391 \pm 58	1329 \pm 58	1209 \pm 284	1129 \pm 97	1412 \pm 159
6	1325 \pm 179 ^b	1129 \pm 161 ^{bc}	1209 \pm 116 ^b	1291 \pm 143 ^b	1395 \pm 180 ^{bc}
7	1275 \pm 117 ^c	1056 \pm 150 ^c	1188 \pm 115	1260 \pm 211	1344 \pm 190 ^c
8	1164 \pm 145	1222 \pm 271	1200 \pm 227	1319 \pm 184	1280 \pm 239
9	1097 \pm 152	1146 \pm 80	1236 \pm 22	1127 \pm 57	1234 \pm 152
10	1169 \pm 181	1170 \pm 141	1260 \pm 0 ^c	963 \pm 168 ^c	1235 \pm 185 ^c
11	1316 \pm 86 ^{bc}	1172 \pm 120 ^{bc}	1252 \pm 18 ^{bc}	1096 \pm 50 ^b	1309 \pm 160 ^{bc}
12	1397 \pm 69 ^{abc}	1542 \pm 30 ^{abc}	1575 \pm 0 ^{abc}	1520 \pm 0 ^{abc}	1344 \pm 60 ^{abc}
13	1506 \pm 115 ^{bc}	1638 \pm 58 ^{bc}	1575 \pm 0 ^{bc}	1680 \pm 0 ^b	1470 \pm 124 ^{bc}
14	1854 \pm 49 ^{abc}	1770 \pm 14 ^{abc}	1785 \pm 0 ^{abc}	1760 \pm 0 ^{ab}	1786 \pm 6 ^{ab}

-
- a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.
 - b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.
 - c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die Futteraufnahmen bewegten sich im Bereich von anfangs etwa 450 Gramm wöchentlich bis 1800 Gramm in der 14. Woche. Auf das Körpergewicht bezogen nahmen die Welpen somit in der ersten Woche insgesamt 81% ihres Körpergewichts zu Wochenende auf, in der letzten Versuchswoche 27%. Auffallend ist, dass die Gruppen zwar jede Woche unterschiedliche Mengen Futter verzehrten, die sich häufig signifikant unterschieden, die Gesamtmenge des durchschnittlich pro Hund aufgenommenen Futters jedoch ähnlich war (zwischen 16807 und 17953 Gramm). Damit verhielt sich die Futteraufnahme über den gesamten Zeitraum betrachtet relativ ausgeglichen. Die geringste Futteraufnahme war, wie in Hinblick auf die Gewichtsentwicklung zu erwarten, in der LF 60/95 ppm-Gruppe zu verzeichnen, die höchste in der LF 60 ppm-Gruppe. Zwischen der Kontrollgruppe und den Lactoferringruppen bestand –auf den gesamten Versuch bezogen- kein signifikanter Unterschied.

Die in den letzten 3 Versuchswochen praktizierte Einzelfütterung der LF 60/95 ppm-Gruppe und der LF 60 ppm-Gruppe führte zu einer Standardabweichungen von 0%.

3 Futtermittelverwertung

Die Futtermittelverwertung der Gruppen wurde als Quotient aus der Futteraufnahme und der Gewichtszunahme errechnet, und wird in den beiden folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 26: Wöchentliche durchschnittliche Futtermittelverwertung der verschiedenen Gruppen

Woche	Kontrolle	LF 30 ppm	LF 60 ppm	LF 60/95 ppm	LF 120 ppm
1	2,51	2,28	2,75	2,78	3,04
2	3,15	3,84	3,38	2,84	3,22
3	4,09	3,63	3,59	3,95	3,70
4	3,62	4,50	3,80	3,72	4,25
5	2,76	3,18	3,50	2,96	2,80
6	2,79	2,24	2,07	2,43	2,75
7	2,20	2,24	3,01	2,73	2,35
8	3,21	2,75	4,36	2,97	2,69
9	2,03	2,32	2,63	2,42	3,11
10	2,82	3,83	2,42	2,64	2,56
11	2,59	2,03	2,51	2,92	2,74
12	2,96	2,78	2,90	2,51	2,81
13	2,42	3,71	3,83	2,90	2,50
14	3,53	3,22	3,19	3,10	3,01

Tabelle 27: Mittlere Futtermittelverwertung der einzelnen Gruppen im Gesamtversuch (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s)

Kontrolle	LF 30 ppm	LF 60ppm	LF 60/95 ppm	LF 120 ppm
2,90 \pm 0,54	3,03 \pm 0,81	3,03 \pm 1,19	2,92 \pm 0,42	2,97 \pm 0,59

Die Futtermittelverwertung war in der Periode der reinen Milchaustauscheraufnahme mit im Schnitt 3,4 deutlich schlechter als zum Zeitpunkt der Trockenfütterung (2,8). Die Lactoferringruppen hatten mit durchschnittlich 2,99 gegenüber der Kontrollgruppe mit 2,90 eine etwas, jedoch nicht signifikant schlechtere Futtermittelverwertung. Diese war dennoch nicht nur im Schnitt, sondern während des gesamten Versuchs schlechter. Die mittlere Futtermittelverwertung aller Versuchsgruppen im Gesamtversuch war 2,97.

4 Kotparameter

Alle unten angegebenen Kotparameter wurden, mit Ausnahme der Trockensubstanz, die wöchentlich bestimmt wurde, zu den folgenden Zeitpunkten untersucht.

- 1) Tag 3 bis 8
- 2) Woche 4 (vor der Beifütterung)
- 3) Woche 8 (vor dem Absetzen)
- 4) Woche 14 (zu Versuchsende)

4.1 Mikrobiologische Untersuchung des Kotes

Zu den 4 verschiedenen Entnahmezeitpunkten wurde der Kot mikrobiologisch qualitativ und quantitativ auf die Gesamtkeimzahl, Escherichiae, Enterococcen, Clostridien und Lactobacillen/Leuconostoc untersucht.

Dabei wurden die folgenden Keime gefunden.

Escherichiae:	Escherichia coli, Escherichia fergusonii
Enterococcen:	Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Enterococcus gallinarium, Streptococcus bovis, Enterococcus hermannii, Enterococcus durans
Clostridien:	Clostridium perfringens, Clostridium butyricum
Milchsäurebildner:	Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus buchneri, Leuconostoc lactis
Sonstige:	Citrobacter freundii, Klebsiella oxytoca, Klebsiella ozaenae, Pantoea agglomerans, Providencia alcalifaciens

Ausschlaggebend waren in erster Linie die unten aufgeführten Keime.

Bei der Signifikanzprüfung wurden die Werte logarithmiert, um diese zu erleichtern.

4.1.1 Aerobe Gesamtkeimzahlen

Die aeroben Bakterienzahlen, die sich in einem Gramm Kot der Tiere im Gruppenmittel befanden, wurden in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 28: Durchschnittliche aerobe Gesamtkeimzahlen je Welpen und Gruppe in KbE (Mrd.) (Mittelwert \pm Standardabweichung s) in einem g Kot an den 4 Probeentnahmezeitpunkten

Gruppe	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	4,60 \pm 2,02	2,63 \pm 2,09	0,56 \pm 0,75	4,45 \pm 1,44 ^{abc}
LF 30 ppm	8,46 \pm 10,76 ^c	1,41 \pm 0,88	3,42 \pm 3,93	2,72 \pm 2,48 ^{abc}
LF 60 ppm	17,55 \pm 9,97	1,84 \pm 2,50	2,26 \pm 4,33	0,08 \pm 0,08 ^{abc}
LF 60/95 ppm	5,44 \pm 3,22 ^c	0,98 \pm 1,49	0,69 \pm 0,63	3,24 \pm 1,97 ^{abc}
LF 120 ppm	3,46 \pm 2,88 ^c	1,67 \pm 2,08	0,72 \pm 0,86	1,18 \pm 1,27 ^{abc}

a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die Anzahl der KbE im Kot variierte von Entnahmezeitpunkt zu Entnahmezeitpunkt stark. Die Kontrollgruppe hatte bei der 2. und 4. Entnahme die höchsten Keimzahlen, bei der 1. Entnahme war in dieser Hinsicht die LF 60 ppm-Gruppe führend. Im Gesamtversuch wies die LF 120 ppm-Gruppe mit durchschnittlich 1,76 Mrd. Keimen die geringsten Keimzahlen auf, die LF 60 ppm-Gruppe mit 5,43 Mrd., aufgrund der sehr hohen Konzentrationen bei der 1. Entnahme, die höchsten. In den Prebiotikumsgruppen wurde die Keimzahl von der 1. zur 2. oder 3. Entnahme stärker als in der Kontrollgruppe reduziert. Auch der in der Kontrollgruppe stattfindende Wiederanstieg der Keimzahlen von der 12. zur 14. Woche war in den Lactoferringruppen nur in abgeschwächter Form vorhanden. Die bei der 4. Entnahme im Vergleich der Kontroll- mit den Prebiotikumsgruppen gemessenen Differenzen wurden nach Logarithmierung als statistisch signifikant (VA, T-Test) eingestuft. Höhere Lactoferrindosierungen reduzierten die Keimzahl hier stärker als niedrigere.

4.1.2 E. coli

4.1.2.1 Absolute Zahlen

Tabelle 29: Durchschnittliche Anzahl der E. coli-Bakterien (Mio.) (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) je Welpen und Gruppe in einem g Kot an den 4 Probeentnahmezeitpunkten

Gruppe	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	3123,3 \pm 2717,1	1348,2 \pm 1364,8	50,1 \pm 67,1	192,3 \pm 249,3
LF 30 ppm	670,0 \pm 712,2 ^c	756,3 \pm 888,1	17,6 \pm 25,6	249,2 \pm 349,4
LF 60 ppm	5120,0 \pm 9837,1	1175,4 \pm 1873,7	100,4 \pm 91,1	20,6 \pm 34,1
LF 60/95 ppm	1370,0 \pm 488,1 ^c	517,5 \pm 792,1	131,4 \pm 259,1	450,1 \pm 833,7
LF 120 ppm	1365,0 \pm 975,7	892,3 \pm 1310,0	24,0 \pm 27,2	32,1 \pm 17,4

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die durchschnittliche Anzahl der E. coli-Keime im Kot verschiedener Gruppen variierte, wie aus der Tabelle 29 ersichtlich, stark, jedoch nicht vergleichbar mit den Unterschieden zwischen den einzelnen Versuchstieren. Die Standardabweichung überstieg in einigen Fällen sogar den Mittelwert. Die LF 60-ppm-Gruppe, gefolgt von der Kontrolle besaßen mit durchschnittlich 1,6 und 1,2 Mrd. die höchsten E. coli-Keimzahlen im Kot, die anderen Gruppen lagen im Bereich einer halben Milliarde und damit deutlich darunter. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Ähnlich wie bei den Gesamtkeimzahlen fielen in allen Versuchsgruppen die Anzahl der E. coli-Bakterien von der ersten (erste Lebenswoche, im Mittel 2,9 Mrd.) zur 3. Entnahme (vor dem Absetzen, durchschnittlich 64,7 Mio.) ab, um danach mit Ausnahme der LF 60 ppm-Gruppe bis zum Ende des Versuches anzusteigen. Die Ausgangskeimzahlen wurden auch hier nicht mehr erreicht.

4.1.2.2 Prozentanteil der E. coli an der Gesamtkeimzahl

Tabelle 30: Durchschnittlicher Prozentanteil der E. coli an der Gesamtkeimzahl (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) je Welpen und Gruppe zu den 4 Probeentnahmezeitpunkten

Gruppe	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	58,73 \pm 37,17	47,06 \pm 32,82	8,78 \pm 14,14	4,46 \pm 6,14
LF 30 ppm	18,76 \pm 24,30	58,06 \pm 41,58	1,17 \pm 1,54	9,65 \pm 10,97
LF 60 ppm	36,12 \pm 24,31	51,08 \pm 15,00	26,59 \pm 23,76	33,12 \pm 37,32
LF 60/95 ppm	29,08 \pm 9,09	54,65 \pm 20,78	2,67 \pm 2,41	13,85 \pm 26,17
LF 120 ppm	46,00 \pm 18,81	47,63 \pm 29,12	3,79 \pm 5,89	5,02 \pm 3,10

Die Tabelle zeigt, dass der Anteil der E. coli an den aeroben Gesamtkeimzahlen anfänglich in etwa zwischen 20 und 60% lag, und sich später auf 1 bis 33% sehr stark reduzierte. Dabei waren auch hier bei der LF 60 ppm-Gruppe (36,7%), im Gegensatz zu den anderen Lactoferringruppen (im Mittel 24,2%), durchschnittlich sehr hohe Werte zu verzeichnen, so dass diese Gruppe, insbesondere bei der 1. Entnahme, nicht nur hohe aerobe Keimzahlen im Kot hatte, sondern sich darunter auch ein großer Prozentanteil E. coli befand.

Die Kontrollgruppe wies zwar absolut sehr hohe E. coli-Zahlen auf, relativ waren diese mit im Schnitt 29,8% jedoch um nur 4 Prozentpunkte höher als die der LF 60/95-, oder LF 120 ppm-Gruppe. Wie bereits erwähnt waren die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufgrund der hohen Differenzen zwischen den Einzeltieren statistisch nicht relevant.

4.1.3 Enterococcen

Bei der Differenzierung der Enterococcen wurden *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. durans* und *Streptococcus bovis* gefunden, wobei *S. bovis*, *E. faecium* und *E. faecalis* häufig vorkamen. *E. gallinarum* war selten und ausschließlich bei der ersten Entnahme der Kontrolle, LF 30- und 120 ppm-Gruppe vorhanden, *E. durans* nur in Ausnahmefällen, weshalb diese beiden Bakterien nicht

in der Tabelle 32 aufgeführt sind. Die Tabellen geben eine Übersicht über die mittlere Anzahl der Enterococcen und deren Spezies je Welpen und Versuchsgruppe.

Tabelle 31: Durchschnittliche Anzahl Enterococcen in einem g Kot (Mio.)
(Mittelwert \pm Standardabweichung s) je Welpen und Versuchsgruppe

Gruppe	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	292,0 \pm 402,8	178,4 \pm 175,2	125,0 \pm 70,0 ^c	1036,2 \pm 1012,9 ^{ac}
LF 30 ppm	2906,2 \pm 5874,1	331,7 \pm 520,5	240,2 \pm 244,8	168,0 \pm 210,6 ^a
LF 60 ppm	2462,0 \pm 3488,1 ^c	130,0 \pm 116,1	51,0 \pm 100,2 ^c	36,5 \pm 70,8 ^a
LF 60/95 ppm	312,3 \pm 520,2 ^c	48,9 \pm 55,2	370,3 \pm 316,0 ^c	68,3 \pm 134,5 ^{ac}
LF 120 ppm	320,3 \pm 369,4	51,8 \pm 68,0	131,0 \pm 128,2	479,5 \pm 683,5 ^{ac}

a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Tabelle 32: Durchschnittliche Menge der aufgeführten Enterococcenspezies je Versuchsgruppe und Tier in einem g Kot in Mio. zu den 4 Entnahmezeitpunkten

Gruppe	Keim	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	E. faecium	20,00	70,00	9,00	0
	E. faecalis	28,00	16,00	0	6,00
	S. bovis	198,00	92,40	116,00	550,20
LF 30 ppm	E. faecium	32,20	3,40	0	0
	E. faecalis	680,00	19,68	0	18,00
	S. bovis	1394,00	306,80	240,18	118,00
LF 60 ppm	E. faecium	44,00	8,00	3,00	0,50
	E. faecalis	960,00	98,76	0	1,60
	S. bovis	1458,00	32,20	47,96	32,00
LF60/95ppm	E. faecium	22,25	6,26	0	0,8
	E. faecalis	272,50	20,68	0	0
	S. bovis	17,50	22,00	362,83	65,00
LF 120 ppm	E. faecium	15,75	5,25	0	0
	E. faecalis	0	31,50	0	0
	S. bovis	272,00	15,00	38,50	479,50

Ein signifikanter antimikrobieller Einfluss durch die Gabe von Lactoferrin war hier nur bei der 4. Entnahme nach Logarithmierung im T-Test erkennbar. Bereits bei der 2.

Entnahme waren jedoch die Enterococcen der Prebiotikumsgruppen im Vergleich zur 1. Entnahme viel stärker reduziert, als die der Kontrolle. Am stärksten (auf ein Achzehntel der Ausgangsmenge) sank die Anzahl der Enterococcen in der LF 30 ppm-Gruppe, am schwächsten in der Kontrollgruppe.

In allen Versuchsgruppen waren diese Keime bei der 1. Entnahme sehr viel stärker vorhanden als bei der 2. Die Zahlen stiegen bis zum Versuchsende meist wieder an. Die LF 30- und 60 ppm-Gruppen besaßen anfangs fast das Zehnfache des Enterococcengehaltes der anderen Gruppen, glichen sich jedoch rasch an. Auch im Gesamtversuch hatten diese beiden Gruppen mit durchschnittlich 911,5 und 668,9 Mio. die höchsten Enterococcengehalte, die niedrigsten waren mit 200,0 und 245,7 Mio. in den LF 60/95- und LF 120 ppm-Gruppen zu finden. Die Kontrollgruppe lag mit durchschnittlich 407,9 Mio. Enterococcen im Mittelfeld.

Die *E. faecium*-Gehalte waren, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, bei der sie von der 1. zur 2. Entnahme anstiegen, ständig im sinken begriffen und meist bereits mit dem Beginn der reinen Trockenfutterverabreichung nicht mehr nachweisbar. Ganz ähnlich verhielt es sich mit *E. faecalis*, der in den LF 30- und 60 ppm-Gruppen stark vertreten war. Er wies anfangs deutlich höhere Gehalte als *E. faecium* auf, war jedoch in allen Gruppen mit Ausnahme der Kontrollgruppe bereits ab der 3. Entnahme nicht mehr vorhanden.

S. bovis hatte mit Ausnahme der LF 60/95 ppm-Gruppe immer die höchsten Gehalte und war bis zum Versuchsende in allen Proben zu finden. In den Gruppen, in denen er anfangs stark vertreten war (LF 30- und 60 ppm-Gruppen) fiel er im Versuchsverlauf ab, in den anderen stieg er zu Versuchsende an.

4.1.4 C. perfringens

Wie aus Tabelle 33 hervorgeht, wurden Clostridien nur unregelmäßig im Kot nachgewiesen, womit keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten. Bei der 1. Entnahme waren Clostridien im Kot fast aller Hunde, mit Ausnahme der Welpen der LF 60 ppm-Gruppe vorhanden, danach in allen Versuchsgruppen stark dezimiert und teilweise nicht mehr nachweisbar. Die LF 30 ppm-Gruppe hatte mit 1,3 Mrd. bei der 1. Entnahme die mit Abstand höchste Anzahl Clostridien im Kot. Bei der 2. und 3. Entnahme war die Kontrollgruppe führend.

Tabelle 33: Durchschnittliche Anzahl der *C. perfringens* je Gruppe und Hund in einem g Kot (Mio.) zu den 4 Entnahmezeitpunkten

Gruppe	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	403,30	73,00	4,00	0
LF 30 ppm	1300,00	14,00	0	0,02
LF 60 ppm	0	0	3,60	0
LF 60/95 ppm	100,00	0	0	5,00
LF 120 ppm	102,50	1,50	0	0

4.1.5 Lactobacillen/Leuconostoc

Bei der Differenzierung der in den Faeces gefundenen Lactobacillen/Leuconostoc wurden in erster Linie die in Tabelle 34 aufgeführten *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *Leuconostoc lactis* und vereinzelt auch *L. buchneri* gefunden.

Tabelle 34: Durchschnittliche Anzahl Lactobacillen/Leuconostoc in einem g Kot (Mio.) (Mittelwert \pm Standardabweichung s) je Hund und Versuchsgruppe

Gruppe	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	60,33 \pm 95,0 ^{bc}	40,52 \pm 47,4 ^c	65,00 \pm 142,6	404,60 \pm 456,4 ^c
LF 30 ppm	3672,00 \pm 2608,0 ^{bc}	4,91 \pm 10,7	151,62 \pm 192,7	234,50 \pm 324,5 ^c
LF 60 ppm	2991,55 \pm 4731,4 ^{bc}	9,94 \pm 9,4 ^c	666,05 \pm 1472,5 ^c	7,08 \pm 8,8 ^c
LF 60/95 ppm	2355,00 \pm 2912,1 ^{bc}	0,88 \pm 1,6 ^c	91,18 \pm 161,4	1001,5 \pm 993,7 ^c
LF 120 ppm	13,40 \pm 20,6 ^{bc}	19,77 \pm 29,6	47,84 \pm 87,6 ^c	829,00 \pm 788,6 ^c

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die aus Tabelle 34 als Standardabweichung hervorgehenden Differenzen zwischen den Einzeltieren waren groß.

Die Lactoferringruppen wiesen bei der 3. und 4. Entnahme im Mittel höhere Konzentrationen an Lactobacillen als die Kontrollgruppe auf, wobei diese Tendenzen nur bei einzelnen Gruppen (LS-means-Test) als signifikant eingestuft werden konnten.

Die Kontrolle- und LF 120 ppm-Gruppe hatten bei der 1. Entnahme im Vergleich zu den anderen Gruppen auffallend geringe Lactobacillenwerte, die sich anschließend nicht so stark wie die der anderen Gruppen veränderten. Insgesamt hatten diese beiden Gruppen mit durchschnittlich 142,6 und 227,5 Mio. die geringsten Keimzahlen, die LF 30 ppm-Gruppe aufgrund der sehr hohen Ausgangskeimzahlen mit mehr als einer Milliarde, die höchsten.

Gemeinsam hatten die Gruppen das bereits mehrfach erwähnte, und auch hier mit Ausnahme der LF 120 ppm-Gruppe bei allen Versuchsgruppen zutreffende Absinken der Lactobacillenzahlen von der 1. zur 2. Entnahme, sowie den, auf die Hälfte bis ein Drittel des Ausgangsniveaus folgenden Wiederanstieg.

Tabelle 35: Durchschnittliche Menge der aufgeführten milchsäurebildenden Keime je Versuchsgruppe und Tier in einem g Kot in Mio. zu den 4 Entnahmezeitpunkten

Gruppe	Keim	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	L.acidophilus	58,33	30,52	1,00	330,00
	L.fermentum	2,00	10,00	0	0
	L.buchneri	0	0	0	0
	L.lactis	0	0	64,00	74,60
LF 30 ppm	L.acidophilus	472,00	0,06	12,02	34,50
	L.fermentum	600,00	0	0	162,00
	L.buchneri	240,00	0	0	0
	L.lactis	2360,0	6,06	139,60	38,00
LF 60 ppm	L.acidophilus	2254,09	0,54	0,01	0,40
	L.fermentum	0	2,40	0	0
	L.buchneri	375,00	0	0	0
	L.lactis	737,46	7,00	666,04	6,68
LF60/95ppm	L.acidophilus	1055,00	0,88	83,18	745,00
	L.fermentum	925,00	0	0	0
	L.buchneri	375,00	0	0	0
	L.lactis	0	0	7,76	130,00
LF 120 ppm	L.acidophilus	6,15	17,29	3,04	22,78
	L.fermentum	7,25	2,48	0,02	0,35
	L.buchneri	0	0	0	0
	L.lactis	0	0	44,78	805,88

Was die einzelnen Lactobacillenarten betrifft, so war L. acidophilus bei allen Gruppen und jeder Entnahme stets nachweisbar, und damit die in diesem

Experiment vorherrschende Lactobacillenspezies. Auch er nahm parallel zu den Gesamtlactobacillen im Versuchsablauf erst ab und zum Ende des Versuchs wieder zu. Stark vertreten war er insbesondere in den LF 30-, LF 60/95-, und LF 60 ppm-Gruppen. *L. buchneri* und *L. fermentum* kamen beide eher selten vor, *L. fermentum* häufiger als *L. buchneri*, jedoch beide meist zu Versuchsanfang.

Leuconostoc lactis war bei der Kontrollgruppe, LF 60/95- und 120 ppm-Gruppe eher zu Versuchsende, bei der LF 30- und LF 60-ppm-Gruppe über den gesamten Versuch im Kot nachweisbar. Mit über 2 Mrd. Keimen bei der 1. Entnahme war er in der LF 30 ppm-Gruppe am stärksten vorhanden.

4.2 Lactat

Der Lactatgehalt des Kotes wurde enzymatisch bestimmt. Einen Überblick über die ermittelten Werte gibt die folgende Tabelle.

Tabelle 36: Durchschnittliche Lactat-Werte (Mittelwert \pm Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 4 Probeentnahmezeitpunkten in mg/kg Kot

Gruppe	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	131,4 \pm 33,9 ^{abc}	438,5 \pm 342,2 ^c	1343,5 \pm 1752,9	77,3 \pm 46,2 ^{abc}
LF 30 ppm	2036,1 \pm 1161,0 ^{abc}	760,3 \pm 971,6	176,9 \pm 219,6	55,2 \pm 44,9 ^{abc}
LF 60 ppm	814,7 \pm 973,1 ^{abc}	1184,9 \pm 957,5 ^c	504,5 \pm 788,6	40,0 \pm 10,2 ^{abc}
LF60/95ppm	2484,6 \pm 2206,5 ^{abc}	246,6 \pm 1190,0	222,9 \pm 219,6	610,4 \pm 445,6 ^{abc}
LF 120 ppm	1319,1 \pm 154,3 ^{ab}	1888,8 \pm 1772,0 ^c	1044,5 \pm 537,8	933,3 \pm 744,9 ^{abc}

a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die Tabelle verdeutlicht die große Streuung, sowie die starke Variation der Werte.

Die Kontrollgruppe wies im Gegensatz zu den Lactoferringruppen bei der

1. Entnahme signifikant geringe Lactatgehalte (T-Test, VA) im Kot auf. Fast das 20-fache dieser Konzentration befand sich in den Faeces der LF 60/95- und der LF 30 ppm-Gruppe, das 6- bis 10-fache in denen der LF 60- und LF 120 ppm-Gruppe. Bis

zur 2. Entnahme fielen die Konzentrationen der LF 30-, und LF 60/95 ppm-Gruppen im Gegensatz zu den anderen Gruppen, in denen sie anstiegen, ab. Trotz vorübergehendem Anstieg sanken alle Lactatwerte zum Ende des Versuchs mehr oder weniger stark. Die Unterschiede der Kontrollgruppe zu der LF 60/95 ppm- und der LF 120 ppm-Gruppe waren bei der 4. Entnahme signifikant (T-Test, VA). Als einzige Gruppe behielt die LF 120 ppm-Gruppe über den ganzen Zeitraum hohe Lactatwerte, die Kontrolle hatte v.a. bei der 3. Entnahme sehr hohe Werte. Im Versuchsmittel wies die Kontrollgruppe mit 497,7 mg/kg die geringsten Lactatmengen auf, gefolgt von der LF 30 ppm-Gruppe, der LF 60 ppm- und der LF 60/95 ppm-Gruppe. Die LF 120 ppm-Gruppe hatte mit 1296,4 mg/kg die höchsten Lactatkonzentrationen im Kot.

4.3 Ammoniak

Die mit der Ammoniakелеktrode gemessenen und umgerechneten Ergebnisse werden in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37: Durchschnittliche Ammoniak-Werte (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 4 Probeentnahmezeitpunkten in mg/kg Kot

Gruppe	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	99,0 \pm 41,4 ^{abc}	288,0 \pm 295,8	300,0 \pm 37,4 ^{abc}	218,0 \pm 63,4 ^{abc}
LF 30 ppm	335,0 \pm 336,2 ^{abc}	93,4 \pm 19,2	89,4 \pm 35,4 ^{abc}	69,4 \pm 21,6 ^{abc}
LF 60 ppm	121,0 \pm 55,1 ^{ab}	110,0 \pm 53,4	106,0 \pm 49,3 ^{abc}	74,0 \pm 11,4 ^{abc}
LF 60/95 ppm	287,5 \pm 123,ab	172,0 \pm 66,8	215,0 \pm 79,4 ^{abc}	55,8 \pm 25,1 ^{abc}
LF 120 ppm	130,0 \pm 612,4 ^{ab}	170,0 \pm 200,8	175,0 \pm 73,7 ^{abc}	156,2 \pm 52,5 ^{abc}

a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Während die Faeces der Kontrollwelpen bei der 1. Entnahme noch signifikant geringe Werte aufwiesen, waren bei ihnen ab der 2. bis zur 4. Entnahme die höchsten Ammoniakkonzentrationen zu finden. Im Gegensatz dazu sanken bei der

LF 30 ppm- und LF 60/95 ppm-Gruppe die anfangs hohen Ammoniakgehalte bis zur 2. Entnahme ab. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bzw. zwischen der Kontrollgruppe und den Lactoferringruppen gab bei der 3. und 4. Entnahme (VA, T-Test). Bei den Lactoferringruppen waren die Ammoniakkonzentrationen der 2., 3. und 4. Entnahme deutlich geringer als die der Kontrollgruppe. Der Gehalt der LF 60/95 ppm-Gruppe war zu Versuchsende mit 55,8 mg/kg im Vergleich zu allen anderen Gruppen am geringsten; die nach der Kontrollgruppe zweithöchste Ammoniakkonzentration war in der LF 120 ppm-Gruppe zu finden.

Betrachtet man den Gesamtversuch, so hatte die Kontrollgruppe die höchsten Konzentrationen im Kot (durchschnittlich 226,3 mg/kg), die LF 60 ppm- Gruppe die geringsten (102,8 mg/kg). Auch hier waren die Standardabweichungen und damit die Unterschiede zwischen den Einzeltieren hoch.

4.4 pH des Kotes

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die Messergebnisse des pH-Meters.

Tabelle 38: Durchschnittliche pH-Werte (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 4 Probeentnahmezeitpunkten

Gruppe	Tag 3 bis 8	Woche 4	Woche 8	Woche 14
Kontrolle	6,05 \pm 0,25	5,88 \pm 0,17 ^{abc}	5,99 \pm 0,26	6,71 \pm 0,52
LF 30 ppm	6,29 \pm 0,31	6,20 \pm 0,29 ^{ab}	6,07 \pm 0,23	6,70 \pm 0,48
LF 60 ppm	5,96 \pm 0,55	6,56 \pm 0,50 ^{ab}	6,34 \pm 0,50	6,20 \pm 0,27
LF 60/95 ppm	6,28 \pm 0,50	6,07 \pm 0,52 ^{abc}	6,10 \pm 0,14	6,98 \pm 0,99
LF 120 ppm	6,40 \pm 0,70	5,75 \pm 0,24 ^{abc}	6,43 \pm 0,38	6,39 \pm 0,79

a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Lactoferringruppen (mit Ausnahme der LF 120 ppm-Gruppe) traten ausschließlich bei der 2. Entnahme auf. Hier wies die Kontrolle einen um 0,27 geringeren pH als die

Prebiotikumsgruppen auf. Im Gesamtversuch hatte erstere einen mittleren pH von 6,16, die Lactoferringruppen im Schnitt 6,29.

Die durchschnittlichen pH-Werte aller Lactoferringruppen schwankten zwischen 6,24 und 6,36, wobei die Werte der letzten Entnahme deutlich über dem Durchschnitt angesiedelt waren. Die LF 60/95 ppm-Gruppe hatte dabei den höchsten, die LF 120 ppm-Gruppe unter den Lactoferringruppen den niedrigsten durchschnittlichen pH-Wert. Die Werte fielen mit Ausnahme der LF 60 ppm-Gruppe in allen Versuchsgruppen nach der ersten Entnahme, um zu einem späteren Zeitpunkt wieder anzusteigen.

4.5 Trockensubstanzgehalt des Kotes

Tabelle 39 gibt eine Übersicht über die, ab der 2. Lebenswoche wöchentlich bestimmten Trockensubstanzgehalte des Kotes.

Tabelle 39: Durchschnittliche TS-Werte (%) der einzelnen Gruppen zu allen Probeentnahmezeitpunkten

Lebens- woche	Gruppe	TS-Gehalt des Kotes	Lebens- woche	Gruppe	TS-Gehalt des Kotes
2	Kontrolle	34,39	8	Kontrolle	27,23
	LF 30 ppm	28,09		LF 30 ppm	25,75
	LF 60 ppm	28,02		LF 60 ppm	26,12
	LF 60/95 ppm	36,72		LF 60/95 ppm	23,19
	LF 120 ppm	38,73		LF 120 ppm	26,66
3	Kontrolle	37,59	9	Kontrolle	27,76
	LF 30 ppm	30,60		LF 30 ppm	26,51
	LF 60 ppm	29,24		LF 60 ppm	26,54
	LF 60/95 ppm	34,41		LF 60/95 ppm	27,41
	LF 120 ppm	36,90		LF 120 ppm	25,58
4	Kontrolle	28,19	10	Kontrolle	25,86
	LF 30 ppm	34,60		LF 30 ppm	25,78
	LF 60 ppm	24,61		LF 60 ppm	28,75
	LF 60/95 ppm	36,90		LF 60/95 ppm	27,45
	LF 120 ppm	37,86		LF 120 ppm	27,21
5	Kontrolle	24,36	11	Kontrolle	26,50
	LF 30 ppm	28,00		LF 30 ppm	27,89
	LF 60 ppm	24,40		LF 60 ppm	30,67
	LF 60/95 ppm	24,97		LF 60/95 ppm	24,06
	LF 120 ppm	25,29		LF 120 ppm	25,41

6	Kontrolle	26,37		12	Kontrolle	23,75
	LF 30 ppm	26,58			LF 30 ppm	24,66
	LF 60 ppm	26,73			LF 60 ppm	26,35
	LF 60/95 ppm	24,75			LF 60/95 ppm	25,66
	LF 120 ppm	25,20			LF 120 ppm	23,05
7	Kontrolle	27,05		13	Kontrolle	23,65
	LF 30 ppm	26,91			LF 30 ppm	23,84
	LF 60 ppm	25,64			LF 60 ppm	26,16
	LF 60/95 ppm	25,40			LF 60/95 ppm	25,34
	LF 120 ppm	26,15			LF 120 ppm	26,04
				14	Kontrolle	24,20
					LF 30 ppm	28,55
					LF 60 ppm	26,25
					LF 60/95 ppm	30,57
					LF 120 ppm	23,79

In der 2.,3. und 4. Woche lagen die Trockensubstanzgehalte bei deutlich über 30, teilweise sogar bei über 38%. Mit Beginn der Beifütterung Anfang der 5. Woche sanken die Werte dann in Bereiche zwischen 24 und 28%, nur in Ausnahmefällen darüber oder darunter, in denen sie bis zum Ende des Versuchs verblieben. Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Lactoferringruppen waren mit durchschnittlich 0,4% gering. Die LF 120 ppm-Gruppe besaß mit im Mittel 26,8 % die geringsten Trockensubstanzgehalte, die LF 60/95-ppm-Gruppe mit 28,4% die höchsten. Dazwischen befanden sich die Kontrolle und die LF 30 ppm-Gruppe mit 27,8 und 27,5%, sowie die LF 60 ppm-Gruppe mit 26,9%.

5 Blutwerte

Das rote und weiße Blutbild wurde von allen Versuchstieren erstmalig am Tag 28 und anschließend bis zum Versuchsende (14. Woche) in zweiwöchigem Abstand (außer 6. Lebenswoche) mit dem Cell Dyn untersucht.

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die Gruppenergebnisse.

5.1 Erythrozyten

Tabelle 40: Durchschnittliche Erythrozytengehalte des Blutes (Mittelwert \pm Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten ($\cdot 10^{12}/l$)

Gruppe	Tag 28	Tag 56	Tag 70	Tag 84	Tag 98
Kontrolle	4,09 \pm 0,30	5,20 \pm 0,26 ^b	5,87 \pm 0,46	6,05 \pm 0,28 ^c	5,96 \pm 0,30 ^{bc}
LF 30 ppm	4,23 \pm 0,34	5,51 \pm 0,48 ^b	6,41 \pm 1,54	5,71 \pm 0,21 ^c	5,81 \pm 0,44 ^b
LF 60 ppm	4,38 \pm 0,31	5,90 \pm 0,44 ^{bc}	7,06 \pm 1,32	5,96 \pm 0,25 ^c	5,99 \pm 0,13 ^{bc}
LF 60/95 ppm	4,09 \pm 0,25	5,10 \pm 0,13 ^{bc}	5,53 \pm 0,29	5,64 \pm 0,21	5,39 \pm 0,15 ^{bc}
LF 120 ppm	4,13 \pm 0,20	5,10 \pm 0,30 ^{bc}	6,25 \pm 1,69	5,90 \pm 0,13	6,10 \pm 0,39 ^{bc}

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die Tabelle verdeutlicht den Anstieg der Erythrozytenzahlen bei allen Gruppen von der 1. (Tag 28) zur 3. Entnahme (Woche 10) von rund $4 \times 10^{12}/l$ auf $6 \times 10^{12}/l$. Bis zur 14. Woche gab es danach in manchen Gruppen einen geringen Rückgang. Die Standardabweichung blieb fast durchgehend mit meist zwischen 0,15 und 0,5 niedrig. Die LF 60 ppm-Gruppe hatte anfangs etwas höhere Werte als die anderen Gruppen. Es gab zwar bei der 2. und 5. Entnahme signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, jedoch keinerlei signifikante Differenzen zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen. Lactoferrin übte demnach keinen Einfluss auf die Anzahl der roten Blutkörperchen aus.

5.2 Hämoglobin

Tabelle 41: Durchschnittliche Hämoglobingehalte des Blutes der einzelnen Gruppen in mmol/l (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) an den 5 Probeentnahmezeitpunkten

Gruppe	Tag 28	Tag 56	Tag 70	Tag 84	Tag 98
Kontrolle	5,10 \pm 0,32	7,03 \pm 0,39	7,93 \pm 0,61 ^c	8,30 \pm 0,21 ^{bc}	8,23 \pm 0,40 ^{bc}
LF 30 ppm	4,73 \pm 0,23	6,87 \pm 0,41 ^c	8,27 \pm 1,91	7,59 \pm 0,31 ^{bc}	7,80 \pm 0,57
LF 60 ppm	5,03 \pm 0,34	7,43 \pm 0,50 ^c	9,22 \pm 1,58	7,95 \pm 0,36 ^{bc}	8,03 \pm 0,21 ^{bc}
LF 60/95 ppm	4,80 \pm 0,59	6,68 \pm 0,1 ^c	7,40 \pm 0,32 ^c	7,71 \pm 0,26 ^{bc}	7,54 \pm 0,17 ^{bc}
LF 120 ppm	5,20 \pm 0,20	6,98 \pm 0,34	8,52 \pm 2,06	8,20 \pm 0,06 ^{bc}	8,49 \pm 0,47 ^{bc}

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Ein Einfluss der prebiotischen Substanz war auch hier nicht zu spüren. Die durchschnittlichen Werte sowohl der Kontrollgruppe, als auch der LF 60 ppm- und 120 ppm-Gruppen lagen geringgradig über dem der anderen Gruppen. Die Standardabweichung war mit wenigen Ausnahmen unter 0,5, und damit niedrig. Auch die Hämoglobinwerte stiegen bei allen Versuchsgruppen kontinuierlich bis zur 3. Entnahme an. Danach blieben sie auf dem Niveau zwischen 7,5 und 8,5 mmol/l.

5.3 Hämatokrit

Tabelle 42: Durchschnittliche Hämatokritgehalte des Blutes (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten in %

Gruppe	Tag 28	Tag 56	Tag 70	Tag 84	Tag 98
Kontrolle	25,88 \pm 1,16 ^c	33,44 \pm 1,68 ^{bc}	36,50 \pm 2,70	37,52 \pm 1,47 ^c	37,40 \pm 1,96
LF 30 ppm	23,56 \pm 1,36 ^c	33,16 \pm 2,95 ^{bc}	38,60 \pm 10,12	35,36 \pm 1,74 ^c	36,40 \pm 2,72
LF 60 ppm	25,02 \pm 1,03 ^c	33,60 \pm 2,67 ^{bc}	44,16 \pm 8,17 ^c	37,50 \pm 1,72 ^c	38,62 \pm 0,30
LF60/95ppm	23,85 \pm 2,78	31,55 \pm 1,03 ^{bc}	33,70 \pm 1,28 ^c	35,40 \pm 0,94 ^c	36,60 \pm 4,39
LF 120 ppm	26,30 \pm 0,64 ^c	32,80 \pm 1,23 ^{bc}	37,00 \pm 5,40	37,25 \pm 0,83	38,68 \pm 2,30

- b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.
 c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Der mittlere Hämatokrit aller 4 Wochen alten Welpen lag bei ca. 25%, der der 14 Wochen alten Hunde bei 37,5%. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Lactoferringruppen gab es nicht. Die Lactoferringruppen untereinander zeigten nur bei der 2. Entnahme zum Teil signifikante Differenzen (VA), wobei keinerlei Zusammenhang zu den Lactoferrinkonzentrationen festzustellen war. Der Hämatokrit aller Versuchsgruppen stieg über den gesamten Versuch an, anfangs schneller und stärker als zu den späteren Entnahmezeitpunkten.

5.4 Leukozyten

Tabelle 43: Durchschnittliche Leukozytengehalte des Blutes (Mittelwert $\bar{x} \pm$ Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten ($\cdot 10^9/l$)

Gruppe	Tag 28	Tag 56	Tag 70	Tag 84	Tag 98
Kontrolle	12,16 \pm 2,38	19,20 \pm 6,99 ^c	14,77 \pm 3,46 ^{abc}	15,18 \pm 4,68 ^c	15,90 \pm 4,56 ^c
LF 30 ppm	14,70 \pm 4,82	13,28 \pm 2,09 ^c	10,68 \pm 2,76 ^{abc}	14,26 \pm 2,56	16,06 \pm 3,73 ^c
LF 60 ppm	12,56 \pm 2,65	13,52 \pm 0,71 ^c	9,95 \pm 2,63 ^{abc}	13,28 \pm 1,47	10,94 \pm 1,57
LF 60/95ppm	13,41 \pm 4,26	13,60 \pm 2,15 ^c	13,58 \pm 1,03 ^{abc}	13,93 \pm 1,81	15,48 \pm 4,13 ^c
LF 120 ppm	12,71 \pm 2,77	16,50 \pm 4,05	11,00 \pm 2,64 ^{abc}	10,85 \pm 2,32 ^c	15,05 \pm 3,40

- a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.
 b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.
 c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die Tabelle zeigt, dass die Lactoferringruppen im Gesamtversuch mit im Schnitt 13,27 deutlich niedrigere Leukozytenzahlen als die Kontrollgruppe (15,44) hatten, wobei die LF 60 ppm-Gruppe mit 12,05 die geringsten Werte aufwies. Bei der 3.

Entnahme waren signifikante Differenzen (VA, T-Test) zwischen der Kontrolle und einzelnen Lactoferringruppen nachweisbar.

Eine Vermehrung der weißen Blutkörperchen trat außer bei der LF 30 ppm-Gruppe bei allen Gruppen, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung zwischen der 1. und 2. Entnahme auf. Danach stagnierte die Anzahl der Leukozyten (LF 60/95 ppm-Gruppe) oder fiel ab (alle anderen Gruppen), um bis zur 14. Lebenswoche nochmals anzusteigen. Die Leukozytenzahlen der Versuchsgruppen waren bei der letzten Entnahme mit Ausnahme der LF 60 ppm-Gruppe praktisch identisch.

5.5 Neutrophile Granulozyten

5.5.1 Absolute Zahlen

Tabelle 44: Durchschnittliche Gehalte an neutrophilen Granulozyten des Blutes (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten (* $10^9/l$)

Gruppe	Tag 28	Tag 56	Tag 70	Tag 84	Tag 98
Kontrolle	5,74 \pm 0,95	10,61 \pm 4,42	7,19 \pm 1,30	6,99 \pm 1,60 ^{bc}	9,39 \pm 3,47
LF 30 ppm	8,26 \pm 4,63	6,98 \pm 2,88	6,95 \pm 1,75	9,13 \pm 2,22 ^{bc}	9,95 \pm 3,64
LF 60 ppm	7,25 \pm 1,71	8,35 \pm 0,26	6,11 \pm 1,26 ^c	7,37 \pm 0,47 ^{bc}	9,91 \pm 0,31
LF 60/95 ppm	6,48 \pm 1,18	7,24 \pm 0,81	8,64 \pm 1,04 ^c	9,02 \pm 1,36 ^{bc}	10,40 \pm 2,93
LF 120 ppm	6,73 \pm 1,54	11,06 \pm 4,60	6,49 \pm 0,91 ^c	5,92 \pm 0,86	9,91 \pm 3,86

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die absolute Anzahl neutrophiler Granulozyten der Kontrollgruppe und der Lactoferringruppen war mit durchschnittlich 7,98 und 8,11 sehr ähnlich, die Unterschiede zwischen den einzelnen Lactoferringruppen waren, wie die Tabelle verdeutlicht, ebenfalls relativ gering. Signifikante, jedoch lactoferrinunabhängige Differenzen traten ausschließlich bei der 4. Entnahme auf (VA). Die höchsten mittleren Neutrophilenzahlen besaß die LF 60/95 ppm-Gruppe, die niedrigsten die

LF 60 ppm-Gruppe. Auch hier sanken die anfangs hohen Werte in allen Gruppen ab um anschließend zu steigen. Alle Werte lagen zwischen 5,70 und 11,10.

5.5.2 Relative Zahlen

Tabelle 45: Durchschnittliche relative Anteile an neutrophilen Granulozyten des Blutes (Mittelwert \bar{x} \pm Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten in %

Gruppe	Tag 28	Tag 56	Tag 70	Tag 84	Tag 98
Kontrolle	48,22 \pm 9,50	59,14 \pm 23,48	50,08 \pm 10,42 ^{abc}	48,08 \pm 12,66 ^{abc}	50,76 \pm 9,45
LF 30 ppm	53,46 \pm 13,71	52,24 \pm 19,20	65,50 \pm 7,56 ^{abc}	63,68 \pm 6,81 ^{abc}	61,02 \pm 11,20
LF 60 ppm	57,80 \pm 2,76	61,72 \pm 1,77	62,56 \pm 5,15 ^{abc}	55,76 \pm 2,73 ^{abc}	60,32 \pm 11,20 \pm
LF 60/95 ppm	51,23 \pm 13,66	53,58 \pm 3,21	62,45 \pm 5,15 ^{abc}	64,73 \pm 2,81 ^{ab}	67,00 \pm 1,45
LF 120 ppm	53,18 \pm 7,02	64,73 \pm 12,07	60,18 \pm 7,02 ^{ab}	55,73 \pm 8,39 ^{ab}	64,58 \pm 12,51

a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die oben verdeutlichte, im Vergleich zur Kontrollgruppe geringe Anzahl Leukozyten in den Lactoferringruppen, in Kombination mit ähnlichen Neutrophilenzahlen führte in diesen Gruppen bei der 3. und 4. Entnahme zum signifikanten Anstieg des relativen Anteils neutrophiler Granulozyten (VA, T-Test) an den Gesamtleukozyten. Die Kontrollgruppe wies im Versuchsmittel einen Prozentanteil neutrophiler Granulozyten von etwas über 51 auf, die Prebiotikagruppen jedoch fast 60%. Besonders hohe Unterschiede waren bei der 3. und 4. Entnahme zu verzeichnen. Dabei war die Dosierung des Lactoferrins nicht ausschlaggebend. Bei allen Gruppen stieg der Prozentanteil neutrophiler Granulozyten an den Leukozyten im Laufe des Versuchs an. Die Standardabweichungen waren in der Kontrollgruppe am höchsten.

5.6 Lymphozyten

5.6.1 Absolute Zahlen

Tabelle 46: Durchschnittliche Gehalte an Lymphozyten (Mittelwert $\bar{x} \pm$ Standardabweichung s) im Blut der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten ($\cdot 10^9/l$)

Gruppe	Tag 28	Tag 56	Tag 70	Tag 84	Tag 98
Kontrolle	5,14 \pm 2,19	3,41 \pm 0,79	5,95 \pm 3,15 ^{abc}	6,65 \pm 3,81 ^{abc}	4,84 \pm 2,21
LF 30 ppm	4,14 \pm 1,26	4,46 \pm 1,97	2,68 \pm 1,30 ^{abc}	3,43 \pm 1,10 ^{abc}	4,14 \pm 1,67
LF 60 ppm	3,77 \pm 1,01	4,07 \pm 0,80	2,35 \pm 1,16 ^{abc}	4,44 \pm 0,85 ^{ab}	3,35 \pm 0,87
LF 60/95 ppm	5,53 \pm 3,61	4,61 \pm 0,99	3,15 \pm 0,46 ^{abc}	3,02 \pm 0,57 ^{ab}	3,11 \pm 0,52
LF 120 ppm	4,67 \pm 1,59	3,88 \pm 0,40	3,22 \pm 1,92 ^{abc}	3,65 \pm 1,92 ^{abc}	3,62 \pm 1,76

a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die Zahlen in der Tabelle zeigen, dass in den Lactoferringruppen die Lymphozytenproduktion bei der 2. Entnahme im Vergleich zur Kontrolle vorübergehend anstieg, danach ab dem Alter von 10 Wochen signifikant (VA, T-Test) abfiel. Im Versuchsmittel lagen die Werte der Kontrollgruppe bei 5,20, die der Lactoferringruppen unter 3,80. Dies bedeutet eine mittlere Reduktion der Lymphozyten um rund 28%, zum Zeitpunkt der 3. Entnahme um 48%. Die stärkste Verringerung auf durchschnittlich 3,60 fand in der LF 60 ppm-Gruppe statt. In den Lactoferringruppen waren die niedrigsten Werte bei der 3. Entnahme, also im Alter von 10 Wochen vorhanden, bei der Kontrolle dagegen mit 8 Wochen.

5.6.2 Relative Zahlen

Tabelle 47: Durchschnittliche Gehalte an Lymphozyten im Blut (Mittelwert \pm Standardabweichung s) der einzelnen Gruppen an den 5 Probeentnahmezeitpunkten in %

Gruppe	Tag 28	Tag 56	Tag 70	Tag 84	Tag 98
Kontrolle	40,66 \pm 12,05	32,64 \pm 23,42	38,50 \pm 15,39 ^{ac}	40,98 \pm 15,61 ^{abc}	30,52 \pm 10,45
LF 30 ppm	31,42 \pm 15,60	33,92 \pm 15,57	24,26 \pm 8,87 ^{ac}	24,40 \pm 7,97 ^{abc}	26,28 \pm 10,75
LF 60 ppm	29,82 \pm 2,67	29,96 \pm 5,40	22,52 \pm 6,17 ^{ac}	33,22 \pm 2,72 ^{abc}	28,44 \pm 5,08
LF 60/95 ppm	37,92 \pm 14,88	33,58 \pm 2,50	23,05 \pm 4,74 ^{ac}	21,70 \pm 2,73 ^{ab}	20,50 \pm 2,58
LF 120 ppm	36,65 \pm 8,46	25,05 \pm 8,50	27,68 \pm 10,05 ^a	31,95 \pm 10,68 ^{ab}	24,98 \pm 13,01

a: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Lactoferringruppen (T-Test) zu dem genannten Zeitpunkt.

b: signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen (VA) zu dem genannten Zeitpunkt.

c: signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der markierten Versuchsgruppe zu anderen markierten Versuchsgruppen zu dem genannten Zeitpunkt (LS-means-Test).

Die Tabelle verdeutlicht nochmals die reduzierten Lymphozytenzahlen in den Lactoferringruppen ab dem Alter von 8 Wochen. Diese hatten mittlere prozentuale Lymphozytengehalte von unter 30, die Kontrollgruppe von über 37. Eine Erhöhung der Lactoferrinkonzentrationen rief dagegen keine umgekehrt proportionale Lymphozytenproduktion hervor. Bei den Prebiotikumsgruppen sanken die anfangs vergleichsweise hohen Werte bereits nach der 1. Entnahme um mindestens 1/3 ab.

E Diskussion

1 Aufbau und Ziel der Fütterungstudie

Ziel des Versuchs war es den Einsatz der prebiotischen Substanz Lactoferrin am Modell der mutterlosen Aufzucht von neonatalen Beagle-Welpen zu prüfen.

Das Modell der mutterlosen Aufzucht ermöglicht eine Standardisierung der Versuchsbedingungen, ohne dass Variabilitäten in Wurfgröße, Milchleistung des Muttertieres oder ungleichmäßige Milchaufnahme der Welpen die Auswertung beeinflussen.

Von zentralem Interesse war in der vorliegenden Arbeit, ob Lactoferrin intestinale oder auch extraintestinale Wirkungen bei Welpen entfaltet und außerdem in welchen Konzentrationen man es verabreichen muss, um mögliche positive Effekte zu erreichen. Lactoferrin war noch nie Gegenstand eines Fütterungsversuchs an Welpen gewesen. Seine Ungefährlichkeit wurde jedoch bereits in Rattenexperimenten bewiesen (Tomita et al. 2002).

Für die Studie standen insgesamt 32 Welpen zur Verfügung, von denen aus zeitlichen Gründen bis zur Abfassung der vorliegenden Arbeit nur 23 ausgewertet werden konnten.

Die Welpen wurden am 3. Lebenstag von der Mutter getrennt und in 5 Gruppen, eine Kontrollgruppe und 4 Lactoferringruppen mit unterschiedlichen Dosierungen, aufgeteilt (siehe Tabelle 13 und 14). Die Tiere blieben bis Ende der 14. Woche im Versuch, wobei ihre Futterraufnahme und Gewichtsentwicklung täglich festgehalten wurde. In regelmäßigen Abständen wurde außerdem die mikrobielle Zusammensetzung der Kotflora, einige weitere Kot-Parameter, sowie das rote und weiße Blutbild untersucht.

Bei der geplanten Gruppengröße von 8 Tieren pro Versuchsgruppe (mit Ausnahme der LF 60/95 ppm-Gruppe) können sicher einige der festgestellten Befunde noch deutlicher herausgearbeitet werden.

2 Futterraufnahme, Gewichtsentwicklung und Futterverwertung

Um zu klären, welchen Einfluss Lactoferrin auf den Stoffwechsel der Tiere nimmt, wurde zum einen die Futterraufnahme und Gewichtsentwicklung der Versuchsgruppen verglichen, zum anderen die Futterverwertung berechnet. Ab der 3. Lebenswoche wurden die Welpen rationiert und ihren individuellen Bedürfnissen angepasst gefüttert. Die Abbildung 6 gibt einen Überblick über die durchschnittliche Gewichtsentwicklung der Welpen unterschiedlicher Versuchsgruppen.

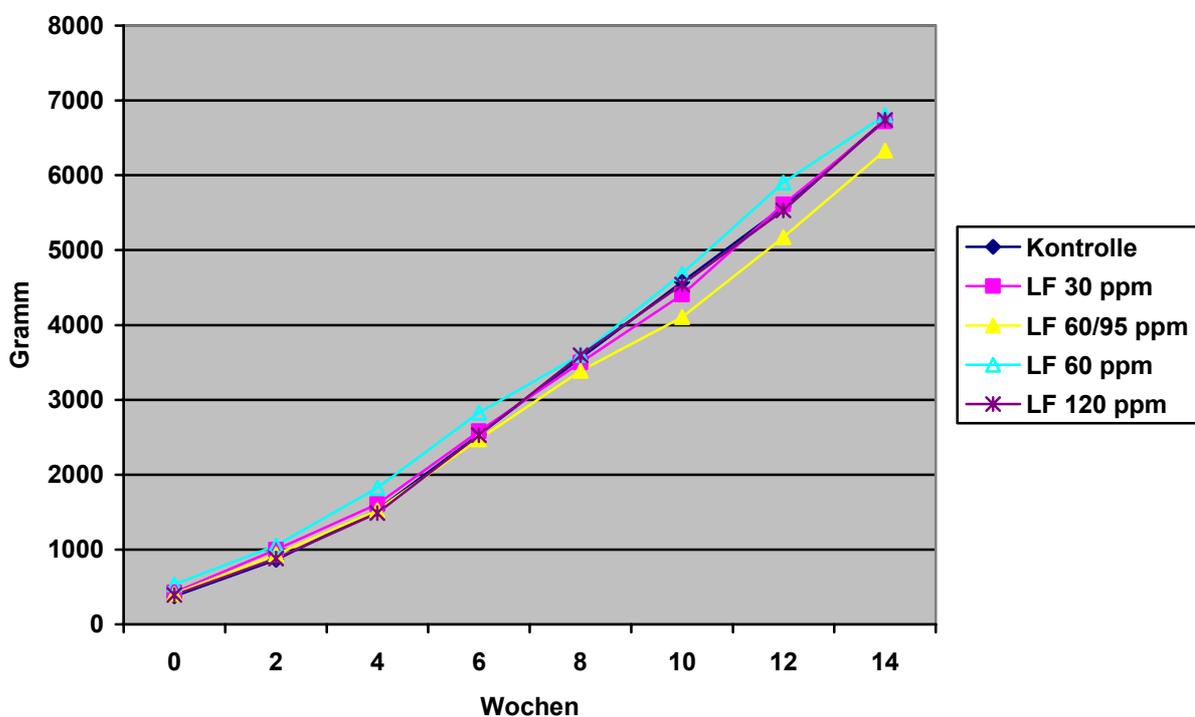


Abbildung 6: Mittlere Gewichtsentwicklung der Welpen der verschiedenen Versuchsgruppen

Durch Randomisierung bei Beginn des Versuchs wurde versucht, die Gewichtsschwankungen zwischen den Gruppen auszugleichen. Da die Welpen von unterschiedlichen Elterntieren stammten, zu unterschiedlichen Zeitpunkten geboren worden waren und mindestens zu zweit einer Versuchsgruppe zugeteilt werden sollten, war dies nicht vollständig möglich. Dadurch erklären sich die relativ großen Gewichtsunterschiede zu Versuchsbeginn, die bis zur 4. Lebenswoche anhielten. Die ab der 6. Woche hohen Körpergewichte der LF 60 ppm-Gruppe und die zum

gleichen Zeitpunkt dazu im Verhältnis sehr niedrigen der LF 60/95 ppm-Gruppe sind vermutlich auf die unterschiedlich starke Futteraufnahme und auf genetische Unterschiede, nicht jedoch auf das verabreichte Lactoferrin zurückzuführen. Die Tiere beider Versuchsgruppen hatten nämlich sehr ähnliche Lactoferrindosen erhalten. Trotzdem bewegte sich ihr Körpergewicht in genau entgegen gesetzter Weise außerhalb der durchschnittlichen Gewichtsentwicklung. Der Umstand, dass sich die LF 60/95 ppm-Gruppe aus einem einzigen Wurf zusammensetzte und dass alle anderen Versuchsgruppen eine untereinander sehr ähnliche Gewichtsentwicklung durchliefen, stützt diese Annahme. Ein Einfluss des Lactoferrins auf die Gewichtsentwicklung bzw. auf die Zunahmen der Welpen konnte demnach, wie aus Abbildung 6 klar hervorgeht, nicht festgestellt werden. Hätte Lactoferrin bei gleicher Futteraufnahme positive Effekte auf die Gewichtsentwicklung ausgeübt, so hätte es einen förderlichen Einfluss auf die Futtermittelverwertung nehmen müssen. Lactoferrin verbesserte diese jedoch nicht. Die durchschnittliche Futtermittelverwertung der Lactoferringruppen war mit 2,99 sogar geringgradig, jedoch nicht signifikant schlechter als die der Kontrollgruppe mit 2,90. Diese Tendenz kann nicht als rein zufälliger Befund gewertet werden, da die Beobachtung während des gesamten Fütterungsversuches gemacht wurde. So war sowohl bei der reinen Milchaustauscherfütterung in Woche 1 bis 4, bei der die Futtermittelverwertung bei allen Gruppen schlechter als während der Trockenfutterperiode war, als auch in der Übergangsphase und bei reiner Festfutterfütterung, durchwegs eine durch Lactoferrin geringgradig verschlechterte Futtermittelverwertung festzustellen. Die Konzentration des Lactoferrins im Futter spielte hierbei, in den von uns gewählten Größenordnungen, keine Rolle. Allerdings fiel die LF 60/95 ppm-Gruppe mit einer ähnlich guten Futtermittelverwertung wie die der Kontrollgruppe aus dem Rahmen.

Eine Ursache für dieses Phänomen der geringgradig verschlechterten Futtermittelverwertung könnte möglicherweise in einer durch Lactoferrin hervorgerufenen Veränderung der bakteriellen Besiedelung des Gastrointestinaltraktes liegen, die die Verwertung des Futters negativ beeinflusst.

Beschleunigte Gewichtsentwicklungen und verbesserte Zunahmen sind ohnehin beim Kleintier aufgrund der häufig resultierenden Skelett- und Adipositasproblematik nicht Ziel einer gesunden Aufzucht. Sie spielen dagegen beim Nutztier eine bedeutende Rolle.

Im Vergleich der von uns durchgeführten mutterlosen Aufzucht mit Studien an Welpen, die beim Muttertier belassen worden waren (Kienzle et al. 1985), war die Gewichtszunahme der Welpen unseres Versuchs bei fast gleicher Milchmengenaufnahme in den ersten 4 Wochen etwas geringer.

3 Mikrobiologie des Kotes

Wie bereits dargestellt, handelt es sich beim Darm um ein sehr wichtiges Immunorgan, dessen mikrobielle Besiedelung für die Gesunderhaltung des gesamten Organismus von essentieller Bedeutung ist. Die Untersuchung der Kotflora wurde mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluss des Lactoferrins auf pathogene, fakultativ pathogene und die Gesundheit fördernde Keime im Colon festzustellen. Dabei wurden typische Vertreter dieser drei Kategorien ausgewählt.

Die aeroben Gesamtkeimzahlen unterlagen starken Schwankungen, sowohl von Hund zu Hund als auch bei den verschiedenen Zeitpunkten der Untersuchung. Trotzdem konnten gewisse Tendenzen festgestellt werden. Geht man davon aus, dass Lactoferrin seine bekannten und bereits mehrfach erwähnten antimikrobiellen Fähigkeiten bei der ersten Untersuchung der aeroben Keimzahlen in der 1. Lebenswoche aufgrund der erst sehr kurzen Verabreichungsdauer noch nicht entfalten konnte, so war bei den anderen Entnahmezeitpunkten eine konzentrationsabhängige Keimzahlreduktion in den Lactoferringruppen zu beobachten. Die Keimzahlen der LF 120 ppm-Gruppe lagen bei der 2. bis 4. Entnahme durchschnittlich 53% unter denen der Kontrollgruppe; die anderen Lactoferringruppen befanden sich in fast direkter Dosis-Wirkungsbeziehung dazwischen. Hier führten demnach höhere Lactoferrinkonzentrationen zu einer stärkeren Keimzahlreduktion, ein geringgradiger Effekt wurde bereits mit einer Konzentration von 30 ppm erreicht. Diese Ergebnisse waren jedoch nur bei der 4. Entnahme statistisch signifikant. Betrachtet man jedoch die extreme Keimzahlverringering in denjenigen Lactoferringruppen, die anfangs sehr hohe Zahlen im Kot hatten (LF 60- und 30 ppm-Gruppen), könnte man diese Reduktion mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auf die Wirkung von Lactoferrin zurückführen.

Gemeinsam war bei allen untersuchten Versuchsgruppen, dass die höchsten Bakterienzahlen bei den neugeborenen Welpen in der 1. Woche festgestellt werden konnten. Durch die Beifütterung mit Festfutter sanken diese Gehalte unterschiedlich stark auf bis auf 1/10 der Ausgangswerte. Mit dem Absetzen kam es zum Anstieg der Keime, die jedoch die Ausgangsquantitäten nicht wieder erreichten.

Die durchschnittlichen Gesamtkeimzahlen lagen in unseren Untersuchungen zwischen 80 Mio. und 17,55 Mrd., wobei die geringeren Zahlen bei den bereits älteren Welpen im Alter von 8 bis 14 Wochen auftraten. In der Literatur wird für die aerobe Gesamtkeimzahl in einem Gramm Welpenkot ein Bereich zwischen 8,9 und 10 log/g (entspricht 790 Mio. bis 10 Mrd. Keime) (Zentek et al. 1998) genannt, für die adulten Hunde ein Bereich zwischen 7,3 und 9,6 log/g (entspricht 19,9 Mio. bis 3,9 Mrd. Keime) (Amtsberg et al. 1995). Erwachsene Hunde besitzen demnach im Mittel deutlich weniger aerobe Keime im Kot als neugeborene Welpen.

Eine Reduktion der Gesamtkeimzahlen durch Lactoferrin wurde bereits an Mäusen durch Teraguchi et al. (1995) gefunden. Dabei wurde die Milch mit 0,5, 1 und 2 % Lactoferrin versetzt; die Lactoferrindosierungen lagen damit höher als in den vorliegenden Untersuchungen.

E. coli gehört beim Hund zu den fakultativ pathogenen Keimen und sollte zusammen mit den ebenfalls fakultativ pathogenen Enterococccen nicht mehr als 1 % der Darmflora des gesunden Welpen bilden (Mitsuoka 1992). Nehmen diese Keime überhand, drohen die Gefahren Diarrhöe, Obstipation, Tympanie, Leberschäden und Immunsuppression. Aus diesem Grund gilt die Reduktion solcher Bakterien als äußerst wünschenswert.

Gerade aufgrund der in der Literatur zahlreich belegten, v.a. gegen gram-negative Keime sehr potenten bakteriziden und bakteristatischen Aktivitäten des Lactoferrins in vivo (Lee et al. 1998) und in vitro (Reiter et al. 1975, Bishop et al. 1976), erschien uns der Effekt auf diese Keime für unser Experiment besonders interessant.

In der vorliegenden Untersuchung ist es aufgrund der extremen Variationen zwischen den Einzeltieren jedoch schwierig, eine Wirkung des Lactoferrins auf diese fakultativ pathogenen Keime zu erkennen. Selbst wenn man annimmt, dass auch hier Lactoferrin erst ab der 2. Entnahme Auswirkungen auf die *E. coli*-Keimzahlen haben konnte, so liegen zwar die *E. coli*-Werte der Lactoferringruppen im Mittel um bis zu

40% unter denen der Kontrollgruppe, eine eindeutige Aussage über die keimzahlreduzierenden Fähigkeiten des Lactoferrins ist durch die großen Schwankungen jedoch unmöglich.

Die Entnahme und Verarbeitung des Kotes war mit Problemen behaftet, die zu derartigen Variationen geführt haben könnten. Anfangs setzten die Welpen nur sehr wenig Kot ab, so dass eine ausreichende Menge bei manchen Welpen bereits am Tag 3, bei anderen jedoch erst mehrere Tage später gewonnen werden konnte. In manchen Fällen war außerdem aus technischen Gründen der Zeitraum zwischen Probengewinnung und Verarbeitung länger als 20 Minuten. Eindeutig kann hier nur - ähnlich wie bei der aeroben Gesamtkeimzahl - das alle Gruppen betreffende Absinken und spätere Ansteigen der Werte im Versuchsablauf festgestellt werden. Dies bedeutet eine mittlere E. coli- Keimzahlreduktion von der 1. zur 8. Lebenswoche auf ein Fünfundvierzigstel.

Die E. coli-Prozentanteile an der aeroben Gesamtkeimzahl lagen im Versuch mit anfangs 20- bis 60% und später 1- bis 33% viel höher, als es von gesunden Welpen erwartet wird. Eine mögliche Erklärung ist das beim menschlichen Säugling bekannte Phänomen, dass Babies, die Babynahrung erhalten, im Stuhl viel mehr E. coli, Coliforme, Enterococcen und Bacteroides aufweisen als Säuglinge, die gestillt werden. Letztere haben dafür einen höheren Anteil Lactobacillen und Bifidobakterien. Mit der Flasche großgezogene Babies unterdrücken demnach die fakultativ pathogene Flora viel schlechter als gestillte Babies (Benno et al. 1984, Kleesen et al. 1995). Diese Beobachtung scheint auf Welpen übertragbar zu sein.

Gründe für diese unterschiedliche Entwicklung der Flora könnten Abweichungen der pH-Werte zwischen Babynahrung/Milchaustauscher und Muttermilch, Mangel an immunologisch aktiven Proteinen wie IgA und Lactoferrin in der Babynahrung bzw. im Milchaustauscher, sowie der hohe Anteil der nicht im Dünn- sondern erst im Dickdarm verstoffwechselten Oligosaccharide in der Muttermilch, die als Nahrung für Lactobacillen dienen, sein. Eine große Lactobacillenflora führt zur Reduktion fakultativ pathogener Keime.

Die Verabreichung von Lactoferrin führte in der vorliegenden Untersuchung zu keinem reduktiven Effekt auf den Prozentanteil der E. colis an der Gesamtkeimzahl. Erklärungen für diese Wirkschwäche wären eine Inaktivierung des Lactoferrins während der Beigabe zum Milchaustauscher, eine Immunantwort auf das

körperfremde Protein im Darm, das Fehlen unterstützender Faktoren, wie z.B. Lysozym, Bicarbonat, Complement oder auch eine Wirkschwäche des bovinen Lactoferrins im Organismus einer anderen Spezies (Wharton et al. 1994). Kuhmilch, ein Bestandteil des von uns verwendeten Milchaustauschers enthält zudem viel Citrat, welches Eisen an die Bakterien liefert und somit Lactoferrin entgegenwirkt (Reiter et al. 1975). Hinzu kommt, dass der verwendete Milchaustauscher etwas mehr Eisen als die Muttermilch enthielt. Im eisenhaltigen Milieu ist die Aktivität des Lactoferrins stark eingeschränkt, da dessen antibakterielle Wirkung zum großen Teil auf dem Entzug von Eisen beruht. Geringe Milieuveränderungen könnten in diesem Fall schon eine große Rolle spielen.

Die Beigabe von bovinem Lactoferrin zur Babynahrung erreichte auch im Schrifttum die erhoffte Verbesserung nicht. Mit Hilfe des Lactoferrins wurde im Experiment an Säuglingen zwar eine Bifidusbakterienflora etabliert, jedoch nur bis zum Alter von 3 Monaten. Das Clostridien- und Bacterioideswachstum wurde durch Lactoferrin nicht unterdrückt (Roberts et al. 1992).

Ähnlich wie bei den *E. coli*s scheint der überdurchschnittlich hohe Anteil der ebenfalls fakultativ pathogenen, jedoch zur normalen Darmflora von Mensch und Tier gehörenden Enterococcen auch hier auf dem Umstand der mutterlosen Aufzucht zu beruhen. Die Beobachtung, dass die in den meisten Lactoferringruppen anfangs sehr hohen Enterococcengehalte ab der 4. Lebenswoche deutlich stärker als in der Kontrollgruppe verringert wurden, ist möglicherweise auf die antimikrobielle Wirkung von Lactoferrin zurückzuführen. Statistisch signifikant war dieser Einfluss nur in der 14. Woche. Die höher dosierten Lactoferringruppen hatten von der 2. bis zur 4. Entnahme im Mittel stärker reduzierte Enterococcenzahlen.

In der Literatur sind die bakteriziden und bakteristatischen Effekte des Lactoferrins auf pathogene Streptococcen in vitro bereits bekannt (Rainard 1986), in vivo jedoch bisher noch nie bewiesen.

Bei allen in diesem Versuch nachgewiesenen Entero- bzw. Streptococcenarten handelte es sich um normale Darmkeime, die jedoch unspezifische Infektionen auslösen können.

C. perfringens wurde von uns als Beispiel eines pathogenen Keimes untersucht, gegen welchen Lactoferrin im Schrifttum potente Wirkungen aufweisen soll (Teraguchi et al. 1995). In unseren Untersuchungen wurde dieses Bakterium nur eher selten und meist bei der 1. Entnahme gefunden. Ein Grund für das unregelmäßige Vorkommen und die großen Konzentrationsschwankungen könnte auch in seiner starken Umweltlabilität liegen. Insbesondere bei der LF 60/95- und der LF 60 ppm-Gruppe konnte aus technischen Gründen – wie bereits erwähnt - der Kot nicht immer in den ersten 20 min nach dem Kotabsatz verarbeitet werden. Dadurch könnte der Nachweis stark dezimiert bzw. unmöglich gemacht worden sein, womit die Auswertung der Ergebnisse nur mit Vorbehalt zu betrachten ist.

Die neugeborenen Welpen wiesen, ähnlich der anderen Bakterien, die höchsten Keimzahlen auf. Geht man davon aus, dass Lactoferrin eine gewisse Zeit braucht um zu wirken, könnten die bei der 2. und 3. Entnahme führenden Keimzahlen der Kontrollgruppe evtl. als Hinweis auf Effekte des Lactoferrins gedeutet werden. Signifikante Wirkungen konnten jedoch, aufgrund der oben genannten Probleme, nicht nachgewiesen werden.

Die höchsten von uns festgestellten Clostridienkonzentrationen lagen bei 1,3 Mrd., und damit deutlich unter den in der Literatur genannten Keimzahlen von 3,2 Mrd. Keime pro Gramm Kot bei adulten Hunden (Zentek 1993). Letztere besitzen generell höhere Clostridienzahlen im Kot als Welpen.

Milchsäurebakterien sind erwünscht, da sie durch Lactatproduktion eine Reduktion des pH-Wertes im Darm bewirken, wodurch das Überhandnehmen und die Adhäsion gewisser pathogener Keime, z.B. *C. perfringens*, an die Darmwand (Rinkinen et al. 2003) verhindert wird, aber auch fakultativ pathogene Keime, die zur Begleitflora gehören, zurückgedrängt werden. Damit wird die Eubiosis gefördert, die eine wichtige Voraussetzung für die Gesunderhaltung des Neugeborenen darstellt. Jedes Jungtier besitzt eine Lactoflora, welche in aller Regel durch Pro- und Prebiotika unterstützt und gefördert wird. Die Wirkung des Lactoferrins auf die Keimzahlen milchsäurebildender Bakterien im Kot ist demnach von Interesse.

Eine förderliche Wirkung des Lactoferrins auf die Milchsäurebildner kann in der vorliegenden Untersuchung unter Betrachtung der Ergebnisse der 3. und 4. Entnahme angenommen werden, mit der Voraussetzung, dass Lactoferrin einige Zeit braucht um seine Wirkung zu entfalten. Um die Proliferation der milchsäurebildenden

Keime zu unterstützen, war hier eine minimale Konzentration von 60 ppm nötig, da bei einer Konzentration von 30 ppm noch keine derartigen Ergebnisse erzielt werden konnten. Eine Erhöhung auf über 95 ppm brachte danach keine Verbesserungen mehr. Diese Feststellungen werden jedoch wiederum durch die starken Schwankungen der milchsäurebildenden Keime bei den einzelnen Entnahmen und unter den Einzeltieren erschwert. Eine höhere Tierzahl ermöglicht unter Umständen eine Verifizierung dieser Annahmen.

Die höchsten Keimkonzentrationen waren auch hier bei den neugeborenen Welpen anzutreffen, die geringsten in der Zeit vor der Beifütterung bis zum Absetzen.

Im Unterschied zu den im Schrifttum genannten Zahlen (Zentek 1993) für Lactobacillen im Kot adulter Hunde (1,6 Mrd.), lagen unsere Welpen deutlich darunter. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte auch hier die mutterlose Aufzucht und insbesondere der damit verbundene Mangel an erst im Dickdarm verstoffwechselten Oligosacchariden geben (s.o.).

4 Einfluss des Lactoferrins auf die Kotparameter Ammoniak, L-Lactat, pH und die Kot-Trockensubstanz

Das im Darm bakteriell und enzymatisch durch proteolytischen Abbau gebildete Ammoniak muss in der Leber entgiftet werden und belastet den Organismus und dessen Organe stark. Insbesondere bei sehr jungen Tieren, deren Entgiftungsmöglichkeiten noch nicht vollständig entwickelt sind, ist deshalb eine Reduktion der Ammoniakgehalte als potentiell schädlichem Metaboliten des Proteinabbaus durchaus wünschenswert. Diese gilt als eine der Wirkungen der Probiotika (Guillot 1990, Gedek 1993). Proteolytisch aktive Mikroorganismen sind häufig auch potentiell pathogene Keime, deren Reduktion ohnehin erstrebenswert ist (Clostridien, Proteus, Salmonellen). Ob die prebiotische Substanz Lactoferrin den Organismus in dieser Hinsicht unterstützt und die Produktion des Ammoniaks negativ beeinflusst, war deshalb in Hinblick auf die Gesundheit und die Gesunderhaltung der Welpen von großem Interesse.

Bei den eigenen Untersuchungen waren, - insgesamt betrachtet -, die höchsten Ammoniakkonzentrationen mit durchschnittlich 226,3 mg/kg in der Kontrollgruppe zu

finden. Wie aus Abbildung 7 ersichtlich, zeigten sich bei der ersten Entnahme in der Kontrollgruppe geringe Werte, die Konzentrationen stiegen ab der 2. Entnahme jedoch stark an. Die Ammoniakwerte in fast allen Lactoferringruppen sanken im Laufe des Versuchs von den hohen Ausgangskonzentrationen stark ab und waren durchschnittlich 35% und damit signifikant geringer als die der Kontrollgruppe. Lässt man die erste Entnahme, bei der eine Lactoferrinwirkung noch nicht erwartet werden kann, außer acht, so sind die Ergebnisse noch deutlicher. Im Mittel hatten die Lactoferringruppen von der 2. bis zur letzten Entnahme um 46% geringere Ammoniakkonzentrationen als die Kontrollgruppe. Dabei war eine sehr hohe Reduktion bereits mit der 30 ppm-Dosierung erreicht; ab einer Lactoferrinkonzentration von 95 ppm war jedoch eine gegenteilige Wirkung zu verzeichnen. Die Ammoniakkonzentrationen nahmen dann wieder zu. Diesen Ergebnissen zufolge reduziert Lactoferrin in bestimmten Konzentrationen die Ammoniakwerte im Kot. Diese wichtige Wirkung bedeutet nicht nur eine mögliche Entlastung des Organismus von einem schädlichen Metaboliten, sondern ist auch für den Hundebesitzer von Bedeutung, da der unangenehme Ammoniakgeruch der Faeces verringert wird.

Die Ammoniak-reduzierende Wirkung lässt sich wahrscheinlich auf die antibakteriellen Fähigkeiten des Lactoferrins und der damit verbundenen Dezimierung proteolytischer Bakterien (Naidu et al. 1994, Tomita et al. 1998) zurückführen. Dieser Befund ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

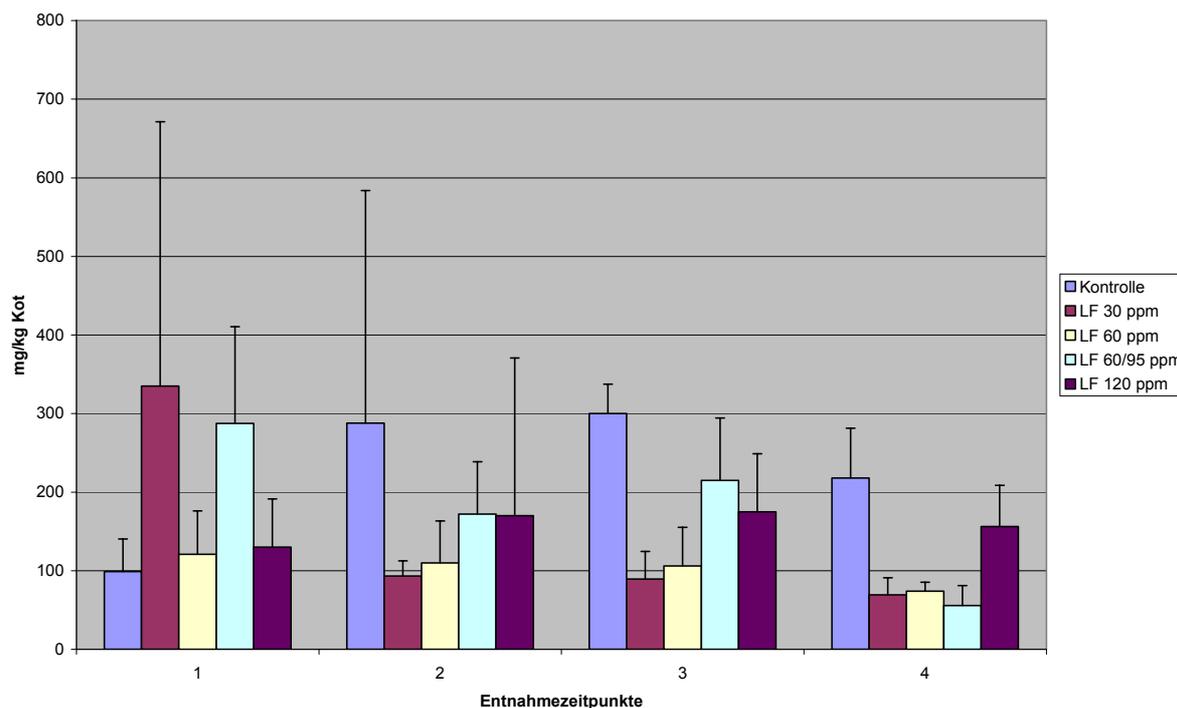


Abbildung 7: Ammoniakkonzentrationen der Versuchsgruppen zu den 4 Probeentnahmezeitpunkten unter Berücksichtigung der Standardabweichung in mg/kg Kot

Die Milchsäurebildung durch die von den Pro- und Prebiotika geförderten milchsäurebildenden Keime führt zu einem Absinken des pH-Wertes im Darm (Roth und Kirchgessner 1986, Stewart et al. 1995), sie verhindert die Besiedelung mit pathogenen und fakultativ pathogenen Keimen und fördert damit Verdauung und Absorption der Nahrungsbestandteile. Aus diesem Grund wurde der L-Lactatgehalt und der pH des Kotes im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen bestimmt. Die pH-Werte in den Lactoferringruppen waren durchschnittlich um 0,13 höher als in der Kontrollgruppe. Diese Unterschiede waren jedoch unter Betrachtung der Standardabweichung, weder bedeutungsvoll noch signifikant. Alle pH-Werte lagen in dem für Fleischfresser typisch sauren Bereich.

Einige Autoren, darunter Schünemann et al. (1989) bekräftigten die negative Korrelation zwischen pH und Lactatgehalt in den Faeces. In unseren Untersuchungen war jedoch keine Korrelation zwischen diesen beiden Messgrößen erkennbar.

Die photometrisch gemessenen Lactatkonzentrationen variierten von Welpen zu Welpen und von Entnahme zu Entnahme stark, was eine Systematisierung der Ergebnisse erschwert. Anhand der Mittelwerte jeder einzelnen Gruppe kann jedoch auf eine mögliche milchsäurebildende Wirkung von Lactoferrin geschlossen werden. Die niedrigsten mittleren Lactatwerte fanden sich in der Kontrollgruppe (497,7 mg/kg), die höchsten in der LF 120 ppm-Gruppe (1296,4 mg/kg). Die anderen Prebiotikumsgruppen lagen in direkter Dosis-Wirkungsbeziehung dazwischen. Problematisch bei dieser Betrachtung ist - analog zu den Verhältnissen bei den milchsäurebildenden Bakterien -, dass die Kontrolle bei der 3., und zum Teil auch bei der 4. Entnahme höhere Werte als einige der Lactoferringruppen aufwies. Außerdem erfolgte die Betrachtung unter Einbezug der 1. Entnahme, bei der unklar ist, ob die hohen Lactatwerte der Lactoferringruppen bereits auf einen Effekt des Lactoferrins zurückzuführen sind. Eine mögliche Wirkung der prebiotischen Substanz ist demnach nur bei der Entnahme 1, 2 und teilweise auch 4 nachvollziehbar. Auch hier wird die größere Tierzahl von n=8 die Lactoferrin-Wirkung wahrscheinlich deutlicher zum Vorschein bringen.

Zentek et al. (1998) hatten in ihrer Arbeit zwar *in vitro* einen starken Einfluss des von ihnen verwendeten Probiotikums auf den Lactatgehalt und den pH-Wert des Kotes herausgestellt, *in vivo* war eine derartige Wirkung jedoch nicht nachweisbar. Bei denjenigen Welpen, die das Probiotikum erhielten, waren sogar die geringsten Lactatwerte im Kot zu finden.

In den vorliegenden Untersuchungen fand, über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet, durch die Lactoferrinverabreichung eine Reduktion der Kot-TS um durchschnittlich 0,4% statt. Dabei fällt die LF 60/95 ppm-Gruppe insofern aus dem Rahmen, als sie als einzige Prebiotikumsgruppe höhere Trockensubstanzgehalte als die Kontrolle aufwies. Lässt man diese Gruppe außer acht, so ist in den anderen Versuchsgruppen eine konzentrationsabhängige Verringerung der Trockensubstanz von der Kontrolle (27,8%) zur LF 120 ppm-Gruppe (26,8%) um ein Prozent festzustellen. Zu erklären ist dieser Befund mit einer möglichen Veränderung der resorptiven Funktionen des Dickdarmes aufgrund der modulierenden Wirkung des Lactoferrins auf die gastrointestinale Bakterienflora.

Zur exakten Beurteilung der Kot-TS hätte eigentlich über einen Zeitraum von mehreren Tagen die gesamte Kotmenge sofort nach dem Absetzen gesammelt werden sollen, um tageszeitliche und tageweise Unterschiede auszuschließen. Dies war über die Dauer des Gesamtversuchs nicht möglich. Um die Fehlerquote zu minimieren, wurde daher stichprobeweise der Kot mehrmals wöchentlich gesammelt und eingefroren, und bei der Verarbeitung darauf geachtet, dass die Proben mehrerer Entnahmen einer Woche zusammen verarbeitet wurden.

5 Einfluss des Lactoferrins auf das rote und weiße Blutbild

Von Interesse ist die Entwicklung des roten Blutbildes und der Vergleich der Gruppen untereinander insbesondere deshalb, da einige Autoren, darunter Kawakami, Lønnerdal und Cox (1991,1979) Lactoferrin für die Eisenabsorption im Darm als essentiell erachten. Dieser Theorie zufolge könnte das rote Blutbild der Kontrollgruppe deutlich geringere Erythrozyten, Hämoglobin- und Hämatokritwerte aufweisen, als das der anderen Versuchsgruppen und der beim Muttertier gebliebenen Welpen anderer Studien. Dennoch ist – in der entsprechenden Literatur - auch bei nachgewiesener erhöhter Eisenaufnahme durch Lactoferrin nicht zwingend ein Effekt auf das rote Blutbild zu entdecken. Chierici et al. (1992) stellten fest, dass die erhöhte Lactoferrinzufuhr über die Babynahrung zwar zu höheren Serum-Ferritinspiegeln, jedoch zu keiner Veränderung des roten Blutbildes der Säuglinge führte. Die interessante Frage, ob das zugesetzte Lactoferrin durch eine möglicherweise erhöhte Eisenresorption aus dem Darm Einfluss auf das rote Blutbild ausübt, lässt sich durch einen Vergleich der roten Blutbilder der Lactoferringruppen mit der Kontrollgruppe beantworten.

Da zur Untersuchung des Blutes mittels Cell Dyn mindestens ein halber Milliliter Blut nötig ist, wurde das Blutbild erstmals im Welpenalter von 4 Wochen bestimmt. Wie aus der Abbildung 4 hervorgeht, ist zu diesem Zeitpunkt aufgrund des Abbaus von Hämoglobin und der Erythrozyten aus der Fetalzeit, außerdem wegen der relativ geringen Erythropoese, des schnellen Körperwachstums und der damit verbundenen Vergrößerung des Blutvolumens meist ein Tiefpunkt der Werte des roten Blutbildes erreicht.

Eine Auswirkung der Lactoferrin-Gabe ließ sich anhand unserer Versuchsanordnung nicht konstatieren, da zwischen diesen Werten - insgesamt gesehen - keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren. Differenzen bei den einzelnen Entnahmen, die keinerlei Zusammenhang zum verabreichten Lactoferrin zeigten, können mit dem genetischen bzw. umweltbedingten Einfluss erklärt werden. Der Eisengehalt des Milchaustauschers lag mit 1 mg/100 ml Milchaustauscher geringgradig über dem Gehalt der Muttermilch (0,7 mg/100 ml). Eine etwas erhöhte Eisenaufnahme im Darm aufgrund des Eisengehaltes im Milchaustauscher kann deshalb nicht völlig ausgeschlossen werden. Selbst wenn Lactoferrin auf die Eisenaufnahme im Darm eine Wirkung entfalten sollte, so konnten dennoch die Auswirkungen im Rahmen dieser Untersuchung am roten Blutbild nicht belegt werden.

Im Vergleich der Erythrozytenzahlen aller Gruppen (sowohl der Kontrolle als auch der Lactoferringruppen) unseres Versuchs mit den in der Literatur angegebenen Daten zeigt sich, dass unsere Tiere teilweise in der 8. Woche (2. Entnahme) sogar deutlich höhere Erythrozytengehalte (durchschnittlich $5,4 \times 10^6/l$) als in der Vergleichsliteratur ($4,9 \times 10^6/l$) (Walser et al. 1990) aufwiesen. Der Hämatokrit unserer Welpen lag anfangs etwas niedriger, überstieg in der 8. Lebenswoche den Hämatokrit der Studie von Walser et al. jedoch um durchschnittlich 3 Prozentpunkte, in der 12. Woche um 5 bis 6 %.

Die in der vorliegenden Untersuchung deutlich hervortretende, möglicherweise auf Lactoferrin zurückzuführende Wirkung, ist der im folgenden mit Hilfe von Abbildungen dargelegte Effekt auf das weiße Blutbild. Die Lactoferringruppen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe bei der 3. und 4. Entnahme in der 10. bis 12. Lebenswoche signifikant erniedrigte Lymphozytenzahlen, sowie – damit verbunden - eine Erhöhung der Leukozytenzahlen und des relativen Prozentanteils neutrophiler Granulozyten auf.

Im Vergleich der Lactoferringruppen mit der Kontrolle war festzustellen, dass es in dem genannten Zeitraum zu einer verringerten Anzahl der Leukozyten in den Lactoferringruppen kam, wobei sich dieser Abfall als bedingt konzentrationsabhängig erwies. Es ist möglicherweise so, dass der physiologische Anstieg der Leukozyten im Alter von 4 bis 12 Wochen durch die Gabe von Lactoferrin gebremst werden kann.

In der 12. Lebenswoche lagen schließlich bei den Welpen der Prebiotikumsgruppen, insbesondere bei denen mit höher dosiertem Lactoferrin, die Leukozytenzahlen bis zu dem Extrem von 5000 unter denen der Kontrolle und damit auch unter den in der Literatur (Walser et al. 1990) zu findenden Angaben, da diese mit den Werten unserer Kontrollgruppe übereinstimmen. Teilweise kam es bis zur 14. Woche jedoch in den Lactoferringruppen zum späten Anstieg der Leukozyten und damit verbundenen Ausgleich gegenüber der Kontrollgruppe.

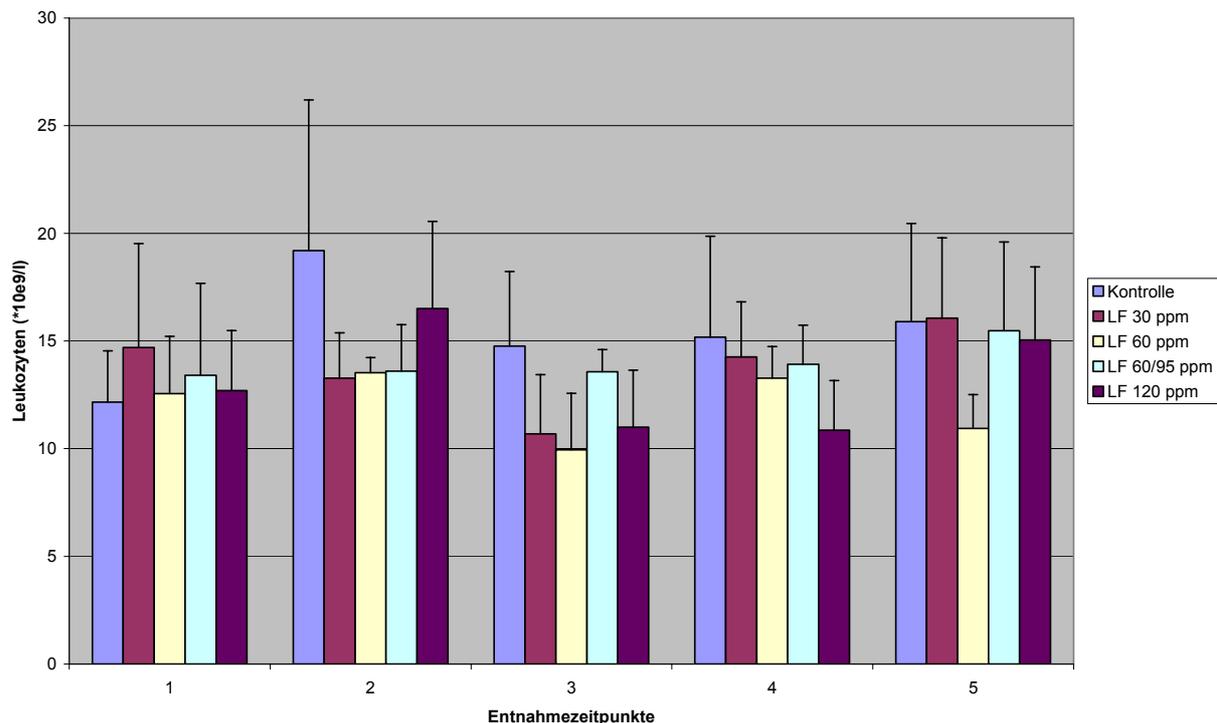


Abbildung 8: Mittlere Leukozytenzahlen der Versuchsgruppen (*10e9/l) während des Versuchs unter Berücksichtigung der Standardabweichung

Die Ursache für die niedrigen Gesamtleukozytenzahlen in den Lactoferringruppen bei der 3., 4., und teilweise auch letzten Entnahme wird offensichtlich, wenn man sich die Lymphozyten in diesem Zeitraum betrachtet und mit der Kontrollgruppe vergleicht. Durch die Lactoferrinfütterung wurden die mittleren Lymphozytenwerte der Prebiotikumsgruppen um fast 28% reduziert, die der 3. Entnahme sogar um fast 48%. Damit machten sie insgesamt einen um 9% verringerten Anteil an den Leukozyten aus.

Die Produktion der Lymphozyten stieg bei allen Lactoferringruppen bei der 2. Entnahme in der 8. Woche vorübergehend leicht an, sank dann im Unterschied zur Kontrollgruppe im Alter von 10 Wochen ab und war am Ende des Versuchs noch nicht an die der Kontrollgruppe angeglichen. Dabei waren bereits in der LF 30 ppm-Gruppe in den meisten Fällen die geringsten Lymphozytenzahlen festzustellen. Andere Gründe für eine Lymphozytopenie, wie z.B. eine akute virale Infektion oder Immundefizienz scheiden aus, da die Welpen gesund waren.

Bei der Reflektion der Gründe einer derartigen Veränderung der Lymphozytenproduktion stellt sich die grundsätzliche Frage, ob Lactoferrin ursächlich, oder durch Einflussnahme auf bestimmte immunologischen Mechanismen möglicherweise die Produktion der Lymphozyten beeinflusste. Da die Lymphozytenzahlen bei jungen Tieren sehr variabel sind und die Standardabweichung v.a. in der Kontrollgruppe hoch ist, ist auch die Möglichkeit eines Zufallsbefundes nicht auszuschließen.

Bekanntermaßen spielen Lymphozyten bei der Abwehr von Infektionskrankheiten, in erster Linie solcher mit viraler Genese, eine Rolle. Man nimmt an, dass Lactoferrin bei oraler Applikation die Fähigkeit besitzt, über intestinale Zellen und das GALT-Gewebe auch systemische Wirkungen zu entfalten, bzw. direkt die Leukozyten im GALT zu stimulieren, die anschließend systemisch aktiv werden (Tomita et al. 2002). In der Literatur förderte Lactoferrin, im Gegensatz zu den von uns erzielten Ergebnissen, beim Menschen (Zimecki 1998) und bei Mäusen (Zimecki et al. 1991, Iigo et al. 1999, Wang et al. 2000, Kuhara et al. 2001) die Bildung von Lymphozyten im Darm und im Blut, wobei bei den oben genannten Experimenten deutlich kürzere Untersuchungszeiträume als in unserer Untersuchung angesetzt wurden.

Möglicherweise führt Lactoferrin bei einem kurzen Applikationszeitraum bzw. zu Beginn einer Verabreichung zur Proliferation der Lymphozyten, bei Langzeitbehandlung jedoch zum gegenteiligen Effekt.

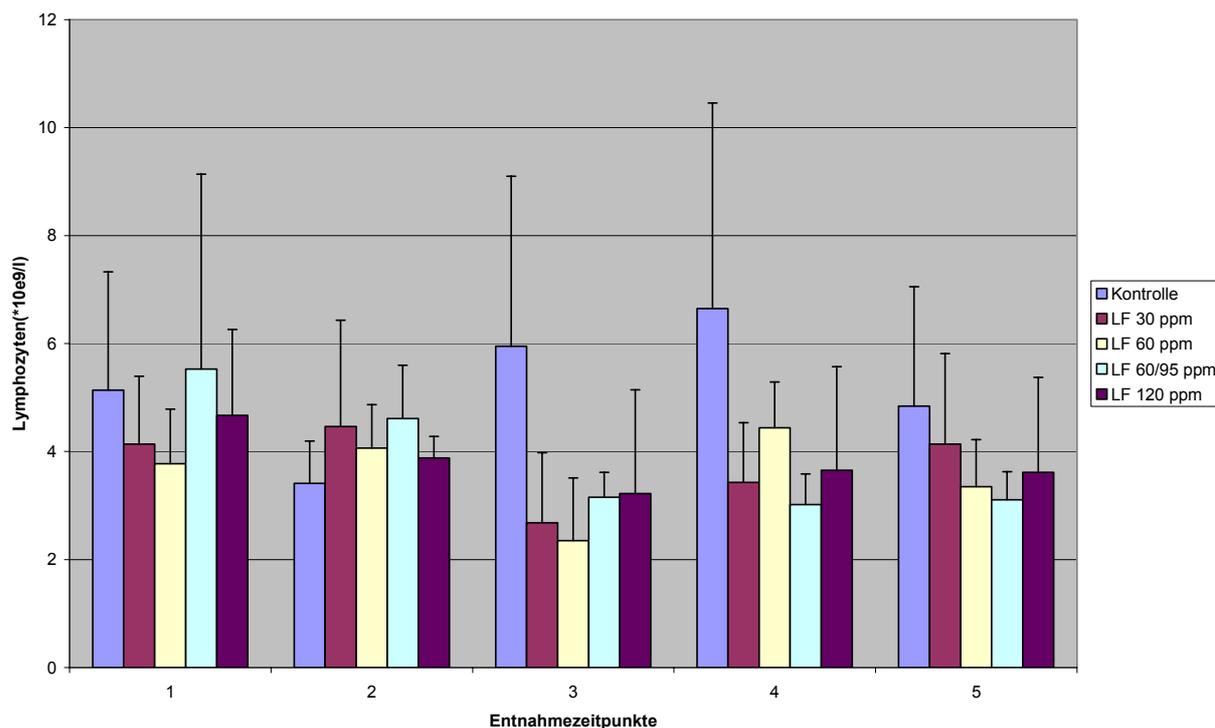


Abbildung 9: Mittlere Anzahl Lymphozyten der Versuchsgruppen (*10e9/l) während des Versuchs unter Berücksichtigung der Standardabweichung

Mit der Reduktion der Lymphozytenzahlen ist in den Lactoferringruppen - wie aus der Abbildung 10 hervorgeht - eine Steigerung des relativen Anteils neutrophiler Granulozyten an den Leukozyten um durchschnittlich 14% und damit ein vergleichsweise langsamer relativer Anstieg dieser Blutzellen in der Kontrollgruppe zwischen der 8. und 12. Woche verbunden. Die absolute Anzahl neutrophiler Granulozyten wurde jedoch von Lactoferrin nicht signifikant beeinflusst.

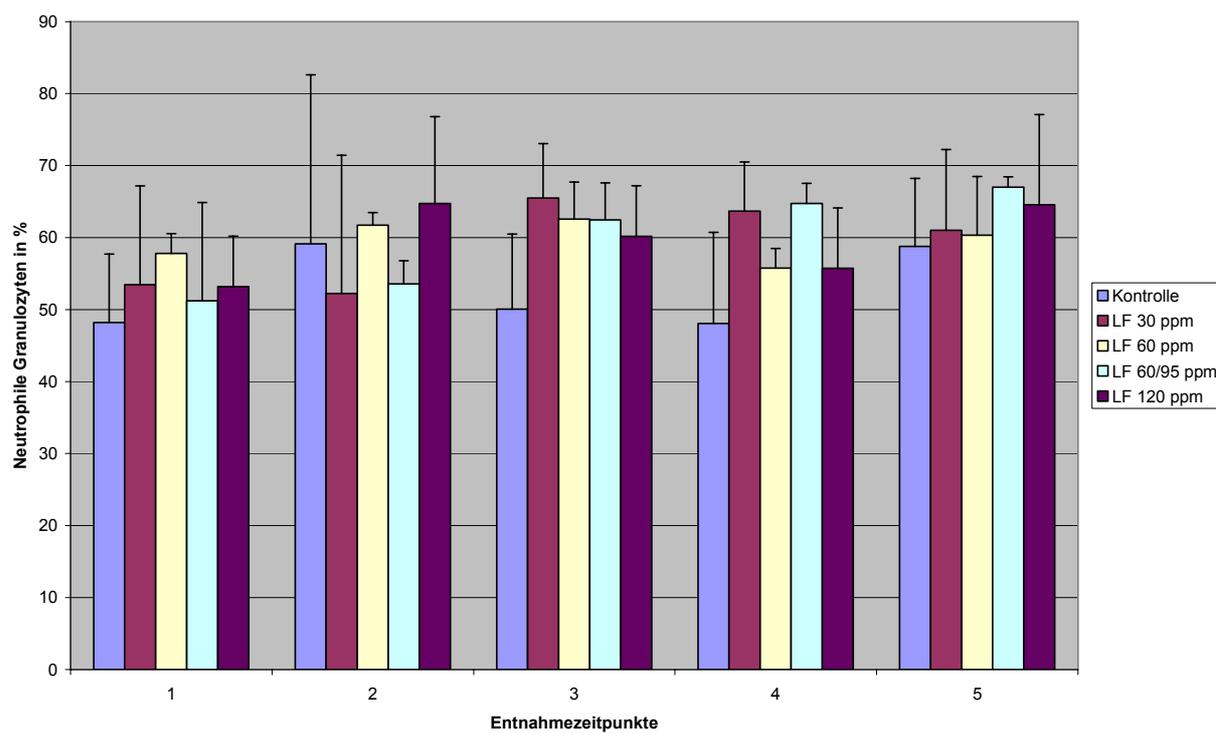


Abbildung 10: Mittlere Anzahl neutrophiler Granulozyten der Versuchsgruppen in % während des Versuchs unter Berücksichtigung der Standardabweichung

F Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einsatz der prebiotisch wirksamen Substanz Lactoferrin am Modell der mutterlosen Aufzucht von neonatalen Beagle-Welpen geprüft. In einem 14 Wochen langen Fütterungsversuch wurden dazu 23 Welpen am 3. Lebenstag von der Mutter getrennt und in eine Kontroll- und 4 Lactoferringruppen mit den Dosierungen 30, 60 und 120 ppm im Futter aufgeteilt. Sie wurden mutterlos, anfangs mit Milchaustauscher und später mit Trockenfutter aufgezogen. Die Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme wurde täglich ermittelt. Der Kot jedes Welpen wurde in der 1., 4., 8. und 14. Lebenswoche mikrobiologisch untersucht, Lactat- und Ammoniakwerte im Kot bestimmt, sowie der Kot-pH ermittelt. Die Trockensubstanz des Kotes wurde wöchentlich untersucht. Das rote und weiße Blutbild wurde in der 4., 8., 10., 12. und 14. Woche bestimmt.

Bei allen Tieren konnten durch die Gabe von Lactoferrin signifikante Veränderungen des weißen Blutbildes festgestellt werden. Die Lymphozytenzahlen der Lactoferringruppen waren insbesondere zwischen der 10. und 12. Lebenswoche, teilweise auch noch in der 14. Woche geringer als die der Kontrollgruppe. Diese Reduktion könnte möglicherweise auf einer direkten oder indirekten Einflussnahme auf deren Proliferation beruhen. Die Möglichkeit eines Zufallsbefundes ist jedoch nicht auszuschließen.

Eine signifikante Reduktion des Kot-Ammoniakgehaltes um durchschnittlich ein Drittel konnte ab dem Alter von 8 Wochen in allen Lactoferringruppen festgestellt werden. Ein möglicher Grund dafür könnten die antimikrobiellen Fähigkeiten des Lactoferrins sein, die eine Hemmung und Reduktion proteolytisch aktiver Bakterien im Darm, und damit eine Verringerung der Ammoniakproduktion durch den bakteriellen Proteinabbau bewirken könnten. Da es sich hier um einen potentiell schädlichen Metaboliten handelt, könnte eine Verringerung der im Darm gebildeten Ammoniakmengen insbesondere für den neonatalen Organismus, dessen Entgiftungsmöglichkeiten noch nicht vollständig entwickelt sind, möglicherweise eine Entlastung darstellen. Zudem wird der unangenehme Geruch der Faeces durch die Ammoniakdämpfe reduziert.

Bei der bakteriologischen Untersuchung des Kotes war tendenziell ein reduzierender Effekt des Lactoferrins auf die aeroben Gesamtkeimzahlen und Enterococcen zu erkennen, der jeweils bei der 4. Entnahme als signifikant eingestuft werden konnte.

Auch die Lactatkonzentrationen im Kot stiegen durch den Einfluss von Lactoferrin an; auch hier jedoch nur bei der 4. Entnahme signifikant.

Eine derartige Modifikation der Darmflora des Welpen könnte die Eubiosis, die eine grundlegende Voraussetzung für die Gesunderhaltung des Neugeborenen darstellt, möglicherweise unterstützen.

Die Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung blieb durch Lactoferrin unbeeinflusst; auch dies ist positiv zu beurteilen, da beim Hund natürlich eine beschleunigte Gewichtszunahme wegen der resultierenden Skelett- und Adipositasprobleme unerwünscht wäre.

G Summary

Petra Laur

Influence of lactoferrin on the organism of neonatal puppies

In the present study we investigated for the first time the influence of the prebiotic substance Lactoferrin on the model of orphan-reared neonatal beagle-puppies. In a trial lasting 14 weeks, 23 puppies were separated from their mothers at day 3 and divided in one control- and 4 lactoferrin groups with the lactoferrin concentrations 30, 60 and 120 ppm in the food. At the beginning, they were raised with formula, and later on with dogfood. Their weight and feed intake were recorded every day. The feces of every puppy were examined microbiologically in the 1st, 4th, 8th and 14th week, and pH, lactate and ammonium concentrations were determined. The fecal dry matter substance was investigated every week. Red and white blood cell examinations have taken place in week 4, 8, 10, 12 and 14.

All animals had a significant change in the white blood cell count. The lymphocyte counts of puppies receiving lactoferrin were lower than those of the control puppies, especially at weeks 10, 12 and less so at week 14. This reduction could possibly be explained by a direct or indirect influence on their proliferation. There is a certain possibility that this effect took place by chance.

At week 8, a significant reduction in ammonium concentration by one third, probably due to the inhibition of proteolytic bacteria by lactoferrin, could be detected in the feces of all lactoferrin groups. A reason could be the antimicrobiological activities of lactoferrin, which could inhibit proteolytic bacteria in the intestine, and therefore reduce the production of ammonium by protein degeneration. As ammonium is a potentially toxic metabolite, a reduction of ammonium produced in the intestine could possibly be beneficial for the neonatal organism, because its possibilities for detoxication are not fully developed yet. The bad fecal smell provoked by ammonium is being reduced as well.

In the microbiological exam, reduced numbers of aerob bacteria and enterococcaceae were seen in lactoferrin treated puppies (significant in sample 4).

The l-lactate concentration was increased in the feces of lactoferrin treated puppies (primarily in sample 4). This modification of the intestinal microbiological flora may be beneficial for developing neonatal puppies.

There was no adverse effect of lactoferrin on food intake and weight gain. This is important. Too rapid weight gain has a detrimental effect on developing skeletal and adipose tissue.

H Literaturverzeichnis

Abrink, M., Larsson, E., Gobl, A., Hellman, L. (2000)

Expression of lactoferrin in the kidney: implications for innate immunity and iron metabolism.
Kidney Int. 57: 2004-2010.

Ahrens, F. (1990)

Zur Wirkung von Toyocerin.
Lohmann-Information: 1-7.

Ainscough, E. W., Brodie, A. M., Plowman, J. E., Bloor, S. J., Loehr, J. S., Loehr, T. M. (1980)

Studies on human lactoferrin by electron paramagnetic resonance, fluorescence, and resonance Raman spectroscopy.
Biochemistry 19: 4072-4079.

Amtsberg, V. G., Stock, V., Treschnak, E., Ringel, U. (1995)

Untersuchungen zur Zusammensetzung der Darmflora des Hundes unter dem Einfluß verschiedener Futterrationen und zur Dekontamination des Darmkanals mit verschiedenen antibakteriell wirksamen Substanzen.
Der praktische Tierarzt 65: 1097-1104.

Andersen, J. H., Osbakk, S. A., Vorland, L. H., Traavik, T., Gutteberg, T. J. (2001)

Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts.
Antiviral Res. 51: 141-149.

Anderson, B. F., Baker, H. M., Dodson, E. J., Norris, G. E., Rumball, S. V., Waters, J. M., Baker E. N. (1987)

Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1769-1773.

Anderson, B. F., Baker, H. M., Norris, G. E., Rice, D. W., Baker, E. N. (1989)

Structure of human lactoferrin: crystallographic analysis and refinement at 2.8 Å resolution.
J. Mol. Biol. 209: 711-734.

Arnold, R. R., Cole, M. F., McGhee, J. R. (1977)

A bactericidal effect for human lactoferrin.
Science 197: 281-286.

- Baggiolini, M., De Duve, C., Masson, P. L., Heremans, J. F. (1970)
Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes.
J. Exp. Med. 131: 559-570.
- Baker, E. N. (1994)
Structure and reactivity of transferrins.
Adv. Inorg. Chem. 41: 389-463.
- Baker, E. N., Baker, H. M., Kidd, R. D. (2002)
Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework.
Biochem. Cell Biol. 80: 27-34.
- Beeson, W. M., Perry, T. W. (1952)
Balancing the nutritional deficiencies of roughages for beef steers.
J. Anim. Sci. 11: 501-515.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M. (1992)
Identification of the bactericidal domain of lactoferrin.
Biochim. Biophys. Acta 1121: 130-136.
- Bennett, R. M., Kokocinski, T. (1978)
Lactoferrin content of peripheral blood cells.
Br. J. Haematol. 39: 509-521.
- Bennett, R. M., Davis, J. (1981)
Lactoferrin binding to human peripheral blood cells: an interaction with B enriched population of adherent mononuclear cells.
J. Immunol. 127: 1211-1216.
- Benno, Y., Mitsouka T. (1992)
Evaluation of the anaerobic method for the analysis of fecal microflora in dogs.
J. Vet. Med. Sci. 54: 1039-1041.
- Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., Mitsuoka, T. (1992a)
Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle-dogs.
J. Vet. Med. Sci 54: 703-706.
- Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., Mitsuoka T. (1992b)
Individual and seasonal variations in the composition of fecal miroflora of beagle dogs.
Bifidobact. Microfl. 11: 69-76.

Birgens, H. S. (1985)

Lactoferrin in plasma measured by and ELISA technique: evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover.

Scand. J. Haematol. 34: 326-331.

Birgens, H. S., Hansen, N. E., Karle, H., Kristensen, L. O. (1983)

Receptor binding of Lactoferrin by human monocytes.

Br. J. Haematol. 54: 383-391.

Bishop, J. G., Schanbacher, F. L., Ferguson, L. C., Smith, K. L. (1976)

In vitro growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apo-lactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apo lactoferrin.

Infect. Immun. 14: 911-918.

Boldt, E. (1993)

Untersuchungen zum Einfluß des Probiotikums Toyocerin auf Futteraufnahme und Lebendmassezunahme bei Mastbullen.

In: Flachowsky, G., Schubert, R. (Edit.).

Vitamine und weitere Zusatzstoffe bei Mensch und Tier.

4. Symposium 30.09./01.10.1993 in Jena: 339-341.

Brady, L. J., Gallaher, D. D., Busta, F. F. (2000)

The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer.

J. Nutr. 130: 410-414.

Bullen, J. J. (1981)

The significance of iron in infection.

Rev. Infect. Dis. 3: 1127-1138.

Busch, A., Herrmann, H. H., Kühn, I., Simon, O., Struck, J., Süphke, E. (1999)

Probiotika in der Tierernährung.

Agri Media, Bonn (Edit: Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung e. V. (AWT)).

Chierici, R., Sawatzki, G., Tamisari, L., Volpato, S., Vigi, V. (1992)

Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin.

2. Effects on serum iron, ferritin and zinc levels.

Acta Paediatr. 81: 475-479.

Chimura, T., Hirayama, T., Nakahara, M. (1993)

In vitro antimicrobial activities of lactoferrin, its concomitant use with cefpodoxime proxetil and clinical effect of cefpodoxime proxetil.

Jpn. J. Antibiot. 46: 482-485.

Cironi, O., Giacometti, A., Barchiesi, F., Scalise, G. (2000)

Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in combination with pyrimethamine, clarithromycin and minocycline.

J. Antimicrob. Chemother. 46: 577-582.

Collins, F. M., Carter, P. B. (1978)

Growth of salmonellae in orally infected germfree mice.

Infect. Immun. 21: 41-47.

Conway, P. L., Gorbach, S. L., Goldin, B. R. (1997)

Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells.

J. Dairy Sci. 70: 1-12.

Cox, T. M., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J., Peters, T. J. (1979)

Iron-binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border.

Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human small intestine.

Biochim. Biophys. Acta 588: 120-128.

Cumberbatch, M., Dearman, R. J., Uribe-Luna, S., Headon, D. R., Ward, P. P., Conneely, O. M., Kimber, I. (2000)

Regulation of epidermal Langerhans cell migration by lactoferrin.

Immunology 100: 21-28.

Daenicke, R., Lebzien P. (1994)

Zum Einfluß von Toxocerin und Monensin-Na auf die Mast- und Schlachtleistung von Bullen.

Kongreßband VDLUFA, Tagung Jena.

zit. nach P. Hartjen.

Damiens, E., Mazurier, J., El Yazidi, I., Masson, M., Duthille, I., Spik, G., Boilly-Marer, Y. (1998)

Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumor cells.

Biochim. Biophys. Acta: 1402: 277-287.

Debbabi, H., Dubarry, M., Rautureau, M., Tome, D. (1998)

Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice.

J. Dairy Res. 65: 283-293.

De Simone, C., Vesely, R., Bianchi Salvadori, B., Jirillo, E. (1993)

The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals.

J. Immunol. 9: 23-28.

Dial, E. J., Hall, L. R., Serna, H., Romero, J. J., Fox, J. G., Lichtenberger, L. M. (1998)

Antibiotic properties of bovine lactoferrin on *Helicobacter pylori*.

Dig. Dis. Sci. 43: 2750-2756.

Dial, E. J., Lichtenberger, L. M. (2002)

Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis.

Biochem. Cell Biol. 80: 113-117.

Eda, S., Kikugawa, K., Beppu, M. (1997)

Characterization of lactoferrin-binding proteins of human macrophage membrane: multiple species of lactoferrin-binding proteins with polylactosamine-binding ability.

Biol. Pharm. Bull. 20: 127-133.

Eidelsburger, U. (1991)

Untersuchungen zur nutritiven Wirksamkeit von Säuren, Puffern, Antibiotika und Probiotika in der Ferkelaufzucht.

Diss. TU München.

Eidelsburger, U., Kirchgessner M., Roth F. X. (1992)

Zum Einfluß von Fumarsäure, Salzsäure, Natriumformiat, Tylosin und Toxocerin auf tägliche Zunahmen, Futteraufnahme, Futterverwertung und Verdaulichkeit.

11. Mitteilung. Untersuchungen zur nutritiven Wirksamkeit von organischen Säuren in der Ferkelaufzucht.

Fortschr. Tierphysiol. Tierernähr. 68: 82-92.

Ellison, R. T., Giehl, T. J. (1991)

Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme.

J. Clin. Invest. 88: 1080-1091.

Ellison, R. T., Giehl, T. L., LaForce, F. M. (1998)

Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin.

Infect. Immun. 56: 2774-2781.

Elrod, K. C., Moore, W. R., Abraham, W. M., Tanaka, R. D. (1997)

Lactoferrin, a potent tryptase inhibitor, abolishes latephase airway responses in allergic sheep.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156: 375-381.

Enk, A. H., Katz, S. I. (1992)

Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 1398-1402.

Erdei, J., Forsgren, A., Naidu, A. S. (1994)

Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 62: 1236-1240.

Erhard, M., Lösch, U., Stangassinger, M. (1995)

Untersuchungen zur intestinalen Absorption von homologen und heterologem Immunglobulin G bei neugeborenen Kälbern.
Z. Ern. Wiss. 34: 160-163.

Fairweather-Tait, S. J., Balmer, S. E., Scott, P. H., Minski, M. J. (1987)

Lactoferrin and iron absorption in newborn infants.
Pediatr. Res. 22: 651-654.

Filho-Lima J. V., Vieira E. C., Vicoli, J. R. (2000)

Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *Typhimurium* in gnotobiotic mice.
J. Appl. Microbiol. 88: 365-370.

Freter, R. (1955)

The fatal enteric cholera infection in the guinea pig achieved by inhibition of normal enteric flora.
J. Inf. Dis. 97: 57-65.

Fuller, R. (1989)

Probiotics in man and animals.
J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.

Gedek, B. R. (1993)

Probiotika zur Regulierung der Darmflora.
Tierärztl. Umsch. 48: 97-104.

Ghio, A. J., Richards, J. H., Dittrich, K. L., Samet, J. M. (1998)

Metal storage and transport proteins increase after exposure of the rat lung to an air pollution particle.
Toxicol. Pathol. 26: 388-394.

Giansanti, F., Rossi, P., Massucci, M. T., Botti, D., Antonini, G., Valenti, P., Seganti, L. (2002)
Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin.

Biochem. Cell Biol. 125-130.

Gibson, R. R., Roberfroid, M. B. (1995)

Dietary modulation of the human colonic microbiol. introducing the concept of prebiotics.

J. Nutr. 125: 1401-1412.

Goldin, B. R. (1990)

Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens.

Ann. Med. 22: 43-48.

Goldin, B. R., Swenson, L., Dwyer, J., Sexton, M., Gorbach, S. L. (1980)

Effect of diet and Lactobacillus acidophilus supplements on human fecal bacterial enzymes.

J. Nat. Cancer Inst. 64: 255-261.

Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakta, S., Gualtieri, L., Salminen, S. (1992)

Survival of Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract.

Dig. Dis. Sci. 37: 121-128.

Gordon, D., Macra, J., Wheeler, D. M. (1957)

A lactobacillus preparation for use with antibiotics.

Lancet: 899-891.

Gray-Owen, S. D., Schryvers, A. B. (1996)

Bacterial transferrin and lactoferrin receptors.

Trends Microbiol. 4: 185-191.

Grover, M., Giouzeppos, O., Schnagl, R. D., May, J. T. (1997)

Effect of human milk prostaglandins and lactoferrin on respiratory syncytial virus and rotavirus.

Acta. Pediatr. 86: 315-316.

Groves, M. L. (1960)

The isolation of a protein from milk.

J. Am. Chem. Soc. 83: 402-410.

Guarner, F., Schaafsman, G. J. (1998)

Probiotics.

Int. J. Food Microbiolog. 39: 237-238.

- Guillén, C., McInnes, I. B., Vaughan, D., Speekenbrink, A. B., Brock, J. H. (2000)
The effects of local administration of lactoferrin on inflammation in murine autoimmune and infectious arthritis.
Arthritis Rheum. 43: 2073-2080.
- Guillot, J. M. (1990)
Qu'est-ce qu'un probiotique ?
Bull. G. T. V. 6: 15-19.
- Ha, C. L., Lee, J. H., Zhou, H. R., Ustunol, Z., Pestka, J. J. (1999)
Effects of yogurt ingestion on mucosal and systemic cytokine gene expression in the mouse.
J. Food Prot. 62: 181-188.
- Harmsen, M. C., Swart, P. J., De Bethune, M. P., Pauwels, R., De Clercq, E., The, T. H., Meijer, D. K. (1995)
Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro.
J. Infect. Dis. 172: 380-388.
- Harris, W. R. (1986)
Thermodynamics of gallium complexation by human lactoferrin.
Biochemistry 25: 803-808.
- Harris, B., Van Horn, H. H., Manookian, K. E., Marshall, S. P., Taylor, M. J., Wilcox, C. J. (1983)
Sugar cane silage, sodium hydroxide and steam pressure treated sugar cane bagasse, corn silage, dottonseed hulls, sodium bicarbonate and Aspergillus oryzae product in complete rations for lactating cows.
J. Dairy Sci. 66: 1474-1485.
- Hartjen, P. (1994)
Aktuelle Daten zum Einsatz von Toxocerin.
Lohmann Information: 23-25.
- Hasegawa, K., Motsuchi, W., Tanaka, S., Dosako, S. (1994)
Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus.
Jpn. J. Med. Sci. Biol. 47: 73-85.

Havenaar, R., Huis in't Veld, J. H. H. (1992)

Probiotics: a general view.

In: The lactic acid bacteria, Vol 1: The lactic acid Bacteria in health and disease.

Chapman & Hall, NY. (Edit: Wood, B. J. B): 209-224.

Hoskins, J. D. (1990)

The hematopoietic system.

In: Veterinary pediatrics.

W.B. Saunders Company: 293-325.

Iigo, M., Kuhara, T., Ushida, Y., Sekine, K., Moore, M. A., Tsuda, H. (1999)

Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice.

Clin. Exp. Metastasis 17: 35-40.

Ikeda, M., Nozaki, A., Sugiyama, K., Tanaka, T., Naganuma, A., Tanaka, K., Sekihara, H., Shimotono, K., Saito, M., Kato, N. (2000)

Characterization of antiviral activity of Lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells.

Virus Res. 66: 51-63.

Isamida, T., Tanaka, T., Omata, Y., Yamauchi, K., Shimazaki, K., Saito, A. (1998)

Protective effect of lactoferricin against Toxoplasma gondii infection in mice.

J. Vet. Med. Sci. 60: 241-244.

Iyer, S., Lönnerdal, B. (1993)

Lactoferrin, lactoferrinreceptors and iron metabolism.

Eur. J. Clin. Nutr. 47: 232-241.

Johansson, B. (1960)

Isolation of an iron-containing red protein from milk.

Acta Chem. Scan. 14: 510-512.

Jørgensen, J. H. (1988)

Probiotika till svin. En literaturoversigt og en afprøvning at 2 probiotikas effectt under forskellige produktionformer.

Dansk Vet. Tidsskr. 71: 1211-1221.

Jöst, M., Bracher A. (1992)

Utilisation des probiotiques Yea-sacc et Lacto-sacc comme stimulateurs de performance dans l'élevage des porcelets.

Rev. Suisse Agr. 24: 21-24.

Kawakami, H., Dosako, S., Lönnerdal, B. (1991)

Iron uptake from transferrin and lactoferrin by rat intestinal brush-border membrane vesicles.

Am. J. Physiol. 258: 535-541.

Kienzle, E. (1999)

Aufzucht von Jungtieren ohne Muttermilch.

Handlexikon der Tierärztlichen Praxis (Edit: Ekkehard Wiesner): 205.

Kienzle, E., Meyer, H., Dammer, C., Lohrie, H. (1985)

Milchaufnahme, Gewichtsentwicklung, Milchverdaulichkeit sowie Energie- und Nährstoffretention bei Saugwelpen.

Adv. Anim. Phys. Nutr. 16: 26-50.

Kienzle, E., Landes, E. (1995a)

Aufzucht verwaister Jungtiere Teil 1: Indikationsstellung und Zusammensetzung der Muttermilch.

Kleintierpraxis 40: 681-685.

Kienzle, E., Landes, E. (1995b)

Aufzucht verwaister Jungtiere Teil 2: Herstellung von Milchaustauschern und praktische Durchführung der mutterlosen Aufzucht.

Kleintierpraxis 40: 687-700.

Kimber, I., Dearman, R. J., Cumberbatch, M., Huby, R. J. (1998)

Langerhans cells and chemical allergy.

Curr. Opin. Immunol. 10: 614-619.

Kimura, N., Yoshikane, M., Kobayashi, A., Mitsuoka, T. (1983)

An application of dried Bifidobacteria preparation to scouring animals.

Bifidobact. Microflora 2: 41-55.

King, J. O. L. (1968)

Lactobacillus acidophilus as a growth stimulant for pigs.

The Veterinarian 5: 273-280.

Kishore, A. R., Erdei, J., Naidu, S. S., Flasen, E., Forsgren, A., Naidu, A. (1991)

Specific binding of lactoferrin to Aeromonas hydrophila.

FEMS Microbiol. Lett. 67: 115-119.

- Kleesen, B., Bunke, H., Tovar, K., Noack, J., Sawatzki, G. (1995)
Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants.
Acta Paediatr. 84: 1347-1356.
- Kluber, E. T., Pollman, D. S., Belcha, F. (1985)
Effect of feeding *Streptococcus faecium* to artificially reared pigs on growth, haematology, and cell-mediated immunity.
Nutr. Rep. Intern. 32: 57-66.
- Kornegay, E. T., Thomas, H. R. (1973)
Bacterial and yeast preparations for starter and grower rations.
Virginia Polytechnic Institute and State University Research Division Report: 151.
- Krarup, L. T. (1987)
Forebyggelse af diarre hos spaedgrise.
Dansk Vet. Tidstr. 70: 324-328.
- Kruzel, M. L., Harari, Y., Chen, C. Y., Castro, G. A. (2000)
Lactoferrin protects gut mucosal integrity during endotoxemia induced by lipopolysaccharide in mice.
Inflammation 24: 33-44.
- Kuhara, T., Iigo, M., Ito, T., Ushida, Y., Sekine, K., Terada, N., Okamura, H., Tsuda, H. (2001)
Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium.
Nutr. Cancer 38: 192-199.
- LaForce, F. M., Boose, D. S., Ellison, R. T. (1986)
Effect of aerosolized *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on iron and iron-binding proteins in lung lavage fluid.
J. Infect. Dis. 154: 959-965.
- Lee, W. J., Farmer, J. L., Hilty, M., Kim, Y. B. (1998)
The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets.
Infect. Immun. 66: 1421-1426.
- Lerche, A., Bisgaard, H., Christensen, J. D., Venge, P., Dahl, R., Sondergaard, J. (1988)
Lactoferrin, myeloperoxidase, lysozyme and eosinophil cationic protein in exudate in delayed type hypersensitivity.
Allergy 43: 139-145.

- Lewis, L. A., Rohde, K., Gipson, M., Behrens, B., Gray, E., Toth, S. I., Roe, B. A., Dyer, D. W. (1998)
Identification and molecular analysis of LbpBa, which encodes the two-component meningococcal lactoferrin receptor.
Infect. Immun. 66: 3017-3023.
- Lund, C., Kuhl, S., Mischke, R., Gunzel-Apel, A. R. (2000)
Reference values of the red blood profile in beagle, German shepherd and golden retriever puppies.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 113: 447-53.
- Machnicki, M., Zimecki, M., Zagulski, T. (1993)
Lactoferrin regulate the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo.
Int. J. Exp. Pathol. 74: 433-439.
- Maeng, W. J., Kim, C. W., Shin, H. T. (1989)
Effects of feeding lactic acid bacteria concentrate (LBC, streptococcus faecium cernelle 68) on growth rate and prevention of scouring in piglets.
Korea J. Anim. Sci. 31: 318-323.
- Mann, D. M., Romm, E., Migliorini, M. (1994)
Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin.
J. Biol. Chem. 269: 23661-23667.
- Marchetti, M., Longhi, C., Conte, M. P., Pisani, S., Valenti, P., Seganti, L. (1996)
Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to vero cells.
Antiviral. Res. 29: 221-231.
- Marin, M. L., Tejada-Simon, M. V., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunol, Z., Pestka, J. J. (1998)
Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by Streptococcus thermophilus: comparison with Bifidobacterium sp. and Lactobacillus bulgaricus.
J. Food Prot. 61: 859-864.
- Masson, P. L., Heremans, J. F., Prignot, J. J., Wauters, G. (1966)
Immunohistochemical localization and bacteriostatic properties of an iron-binding protein from bronchial mucus.
Thorax 21: 538-544.
- Masson, P. L., Heremans, J. F. (1968)
Metal-combining properties of human lactoferrin (red milk protein).
1. The involvement of bicarbonate in the reaction.
Eur. J. Biochem. 6: 579-584.

Mattsby-Baltzer, I., Roseanu, A. (1996)

Lactoferrin or a fragment inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells.

Pediatr. Res. 40: 257-262.

McIntosh, G. H. (1993)

Colon Cancer: dietary modifications required for a balanced protective diet.

Prev. Med. 22: 767-774.

Metchnikoff, E. (1907)

Prolongation of Life.

G. P. Putman & Sons, N.Y. (Edit: William Heinemann).

Meyer, H., Heckötter, E. (1986)

Futterwerttabellen für Hunde und Katzen.

Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei, Hannover.

Miettinen, M., Matikainen, S., Vuopio-Varkila, J., Pirhonen, J., Varkila, K., Kurimoto, M. Julkunen, I. (1998)

Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells.

Infect. Immun. 66: 6058-6062.

Mitsuoka, T. (1992)

Intestinal flora and aging.

Nutr. Rev. 50: 438-446.

Mitsuoka, T., Kimura, N., Kobayashi, A. (1976)

Untersuchungen über die Zusammensetzung der Faecalflora gesunder Hunde unter besonderer Berücksichtigung der Laktobazillen- und Bifidobakterienflora.

Zentralbl. Bakteriol. Abt. I Orig. A: 235-493.

Miyazawa, K., Mantel, C. L. L., Morrison, D. C., Broxmeyer, H. E. (1991)

Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions.

Effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage-differentiated HL-60 cells.

J. Immunol. 146: 723-729.

Moen, J. H. (1982)

Streptococcus faecium mot spedgrisdiane.

Norsk Vet. Tidsskr. 94: 629-631.

Molitor, D. (1996)

In vitro- und in vivo-Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) als Futterzusatz bei Hunden.
Diss. TiHo Hannover.

Morrill, J. L., Dayton, A. D., Mickelsen, R. (1977)

Cultured milk and antibiotics for young calves.
J. Dairy Sci. 60: 1105-1109.

Murphy, M. E., Kariwa, H., Mizutani, T., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takshima, I. (2000)

In vitro antiviral activity of Lactoferrin and ribavirin upon hantavirus.
Arch. Virol. 145: 1571-1582.

Naidu, A. S., Arnold, R. R. (1994)

Lactoferrin interaction with salmonellae potentiates antibiotic susceptibility in vitro.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 20: 69-75.

Nakajima, M., Iwamoto, H., Shirasawa, T., Miyauchi, H., Takatsu, Z., Yamazaki, N., Teraguchi, S.,
Hayasawa, H. (1999)

Oral administration of lactoferrin enhances the production of IFN-gamma and IL-10 in spleen cells
cultured with concanavalin A or lipopolysaccharide.
Biomed. Res. 20: 27-33.

Neumann, E., Oliveira, M. A., Cabral, C. M., Moura, L. N., Nicoli, J. R., Vieira, E. C., Cara, D. C.,
Podoprigora, G. I., Vieira, L. Q. (1998)

Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense
mechanisms of germfree mice (in Process Citation).
Braz J. Med. Biol. Res. 31: 1565-1573.

Newbold, C. J. (1990)

Probiotics as feed additives in ruminant diets.
51st Minnesota Nutrition Conference: 102-118.

Newbold, C.J., McKain, N., Wallace, R. J. (1993)

Combined effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract and monensin on fermentation in the
rumen simulation technique (Rusitec).
J. Agric. Sci., Camb. 121: 241-246.

Nibbering, P. H., Ravensbergen, E., Welling, M. M., Van Berkel, L. A., Van Berkel, P. H., Pauwels, E. K., Nuijens, J. H. (2001)

Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic resistant bacteria.

Infect. Immun. 69: 1469-1476.

Nicaise, P., Gleizes, A., Forestier, F., Quero, A. M., Labarre, C. (1993)

Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF-alpha) production by mouse peritoneal macrophages.

Eur. Cytokine Netw. 4: 133-13.

Nielen, A. L., Van de Gaag, I., Knol, B. W., Schukke, Y. H. (1998)

Investigation of mortality and pathological changes in a 14 month birth cohort of boxer puppies.

Vet. Rec. 142: 602-606.

Norris, G. E., Anderson, B. F., Baker, E. N., Baker, H. M., Gartner, A. L., Ward, J., Rumbull, S. V. (1986)

Preliminary crystallographic studies on bovine Lactoferrin.

J. Mol. Biol. 191: 143-145.

Nousiainen, J., Suomi, K. (1991)

Comparative observations on selected probiotics and olaquinox used as feed additives for piglets around weaning. 1. Effect on the bacterial metabolites along the intestinal tract, blood values and growth.

Fortschr. Tierphysiol. Tierernähr. 66: 212-223.

Oftedal, O. T. (1984)

Lactation in the dog: milk composition and intake by puppies.

J. Nutr. 114: 803-812.

Omata, Y., Satake, M., Maeda, R., Saito, A., Shimazaki, K., Yamauchi, K., Uzuka, Y., Tanabe, S., Sarashina, T., Mikami, T. (2001)

Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferricin.

J. Vet. Med. Sci. 63: 187-190.

Parker, R. B. (1974)

Probiotics, the other half of the antibiotic story.

Anim. Nutr. Health. 29: 4-8.

Peo, E. R. Jr. (1987)

Alternatives exist to antibiotic use in swine nutrition.

Feedstuffs 59: 13-18.

Peterson, N. A., Anderson, B. F., Jameson, G. B., Tweedie, J. W., Baker, E. N. (2000)

Crystal structure and iron-binding properties of the R210K mutant of the N-lobe of human lactoferrin: implications for iron release from transferrins.

Biochemistry 39: 6625-6633.

Perdigon, G., Alvarez, S., Pesce de Ruiz Holgado, A. (1991)

Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*; influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections.

J. Dairy Res. 58: 485-496.

Pollmann, D. S., Johnston, M. E., Alee, G. L., Hines, R. H. (1984)

Effect of *Bacillus subtilis* addition to carbadox medicated starter pig diets.

J. Anim. Sci. 59: 275.

Portelli, J., Gordon, A., May, J. T. (1998)

Effect of compounds with antibacterial activities in human milk on respiratory syncytial virus and cytomegalovirus in vitro.

J. Med. Microbiol. 47: 1015-1018.

Qiu, J., Hendrixson, D. R., Baker, E. N., Murphy, T. F., St. Geme, J. W., Plaut, A. G. (1998)

Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*.

Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 12641-12644.

Rado, T. A., Wie, X. P., Benz, E. J. (1987)

Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis.

Blood 70: 989-993.

Rainard, P. (1996)

Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria.

Vet. Microbiol. 11: 387-392.

Reiter, B., Brock, J. H., Steel, E. D. (1975)

Inhibitions of *E. coli* by bovine colostrum and post colostrum milk.

II. The bacteriostatic effect of lactoferrin on a serum susceptible and serum resistant strain.

Immunology 28: 83-95.

Renz, F. (1954)

Milk production with the active yeast concentrate "Astrol".

Züchtungskunde 26: 228-304.

Ringel, U. (1998)

Bakteriologische Untersuchungen zur Zusammensetzung der Ileum- und Fäkalflora des Hundes unter dem Einfluß verschiedener Futterrationen.

Diss. TiHo Hannover.

Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehand, A. C. (2003)

Interaction between probiotics lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?

Vet. Microbiol. 92: 111-119.

Risley, C. R., Kornegay, E. T., Lindemann, M. D., Weakland, S. M. (1991)

Effects of organic acids with and without a microbial culture on performance and gastrointestinal tract measurements of weanling pigs.

Anim. Feed Sci. Technol. 35: 259-270.

Roberfroid, M. B. (1998)

Probiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties.

Br. J. Nutr. 80: 197-202.

Roberts, A. K., Chierici, R., Sawatzki, G., Hill, M. J., Volpato, S., Vigi, V. (1992)

Supplementation of an adapted formula with bovine Lactoferrin:

1. Effect on the infant faecal flora.

Acta Paediatr. 81: 119-124.

Roth, F. X. , Kirchgessner, M. (1986)

Zur nutritiven Wirksamkeit von *Streptococcus faecium* (Stamm M 74) in der Ferkelaufzucht.

Landwirtsch. Forsch. 39: 198-205.

Roth, F. X. , Kirchgessner, M. (1988a)

Nutritive Wirksamkeit von Toxocerin. 1. Mitteilung: Ferkelaufzucht

Landwirtsch. Forsch. 41: 58-62.

Roth, F. X., Kirchgessner, M. (1988 b)

Nutritive Wirksamkeit von Toxocerin. 2. Mitteilung: Kälbermast.

Landwirtsch. Forsch. 41: 63-71.

Roth, F. X., Eidelsburger, U., Kirchgessner, M. (1992)

Zum Einfluß von Fumarsäure, Salzsäure, Natriumformiat, Tylosin und Toxocerin auf pH-Wert, Trockenmassegehalt, Konzentration an Carbonsäuren und Ammoniak in verschiedenen Segmenten des Gastrointestinaltraktes.

12. Mitteilung. Untersuchungen zur nutritiven Wirksamkeit organischer Säuren in der Ferkelaufzucht. *Forsch. Tierphysiol. Tierernähr.* 68: 93-103.

Salamah, A. A., Al-Obaidi, A. S. (1995a)

In vivo and in vitro effects of lactoferrin on *Yersinia pseudotuberculosis*. *New Microbiol.* 18: 267-274.

Salamah, A. A., Al-Obaidi, A. S. (1995b)

Effect of some physical and chemical factors on the bactericidal activity of human lactoferrin and transferrin against *Yersinia pseudotuberculosis*.

New Microbiol. 18: 275-281.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M-C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M. B., Rowland, I. R. (1998)

Functional food science and gastrointestinal physiology and function.

Br. J. Nutr. 80: 147-171.

Schryvers, A. B., Morris, L. J. (1988)

Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun* 56: 1144-1149.

Schryvers, A. B., Lee, B. C. (1989)

Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family Neisseriaceae.

Can. J. Microbiol. 35: 409-415.

Schünemann, C., Mühlum, A., Junker, S., Wilfarth, H., Meyer, H. (1989)

Praececäle und postileale Verdaulichkeit verschiedener Stärken sowie pH-Werte und Gehalte an organischen Säuren in Darmchymus und Faeces.

Fortschr. Tierphysiol. Tierernähr. 19: 44-58.

Shimizu, K., Matzuzawa, H., Okada, K., Tazume, S. (1996)

Lactoferrin-mediated protection of the host from murine cytomegalovirus infection by a T-cell-dependant augmentation of natural killer cell activity.

Arch. Virol. 141: 1875-1889.

- Siciliano, R., Rega, B., Marchetti, M., Seganti, L., Antonini, G., Valenti, P. (1990)
Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of herpes simplex virus type 1 infection.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 264: 19-23.
- Silva, A. M., Bambilra, E. A., Oliveira, A. L., Souza, P. P., Gomess, D. A., Vieira, E. C., Vicoli, J. R. (1999)
Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with Salmonella enteritidis subsp. Typhimurium in conventional and gnotobiotic mice.
J. Appl. Microbiol. 86: 331-336.
- Simoës-Nunes, C. (1994)
Probióticos microbianos e criação intensiva de animais.
Rev. Port. Cienc. Vet. 89: 166-174.
- Slater, K., Fletcher, J. (1987)
Lactoferrin derived from neutrophils inhibits the mixed lymphocyte reaction.
Blood 69: 1328-1333.
- Slyter, L. L. (1976)
Influence of acidosis on rumen function.
J. Anim. Sci. 43: 910-929.
- Sorensen, M., Sorensen, M. P. L. (1939)
The proteins in whey.
C. R. Trav. Lab. Carlsberg 23: 55-59.
- Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., Van Halbeek, H., Vliegthart, J. F. G. (1982)
Primary structure of glycans from human lactotransferrin.
Eur. J. Biochem. 121: 413-419.
- Stewart, C. S., Hillman, K., Maxwell, F., Kelly, D., King, T. P. (1995)
Die neuesten Fortschritte in der Probiöse beim Schwein: Beobachtungen zur Mikrobiologie des Schweinedarms.
Obers. Tierernähr. 23: 1-26.
- Strøm, M. B., Rekda, Ø., Svendsen, J. S. (2000)
Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives.
J. Peptide Res. 56: 265-274.

- Superti, F., Ammendolia, M. G., Valenti, P., Seganti, L. (1997)
Antiviral activity of milk proteins: Lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29.
Med. Microbiol. Immunol. 186: 83-91.
- Swass, A., Sjolín, S., Trottestam, V., Aransson, B. (1984)
Relapsing *Clostridium difficile* enterocolitis cured by rectal infusion of normal faeces.
Scand. J. Infect. Dis. 16: 211-215.
- Tejada-Simon, M. V., Lee, J. H., Ustunol, Z., Pestka, J. J. (1999a)
Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin responses to cholera toxin in mice.
J. Dairy Sci. 82: 649-660.
- Tejada-Simon, M. V., Ustunol, Z., Pestka, J. J. (1999b)
Effects of lactic acid bacteria ingestion on basal cytokine mRNA and immunoglobulin levels in the mouse.
J. Food Prot. 62: 287-291.
- Teraguchi, S., Shin, K., Ogata, T., Kingaku, M., Kaino, A., Miyauchi, H., Fukuwatari, Y., Shimamura, S. (1995)
Orally administered bovine Lactoferrin inhibits bacterial translocation in mice fed bovine milk.
Appl. Environ. Microbiol. 61: 4131-4134.
- Tigyi, Z., Kishore, A. R., Maeland, J. A., Forsgren, A., Naidu, A. S. (1992)
Lactoferrin-binding proteins in *Shigella flexneri*.
Infect. Immun 60: 2619-2626.
- Tizard, I. R. (2000)
Veterinary Immunology: An Introduction. Sixth edition.
(Edit: W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania).
- Tomita, S., Shirasaki, N., Hayashizaki, H., Matsuyama, J., Benno, Y., Kiyosawa, I. (1998)
Binding characteristics of bovine lactoferrin to the cell surface of *Clostridium* species and identification of the lactoferrin-binding protein.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 1476-1482.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H. (2002)
Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: Production and applications.
Biochem. Cell Biol. 80: 109-112.

Tournut, J. (1989)

Applications of probiotics to animal husbandry.

Rev. Sci. Tech. O. I. E. 8: 551-566.

Treschnak, E. (1984)

Bakteriologische Untersuchungen über den Einfluß der Ernährung auf die Zusammensetzung der Darmflora des Hundes.

Diss. TiHo Hannover.

Trif, M., Guillen, C., Vaughan, D. M., Telfer, J. M., Brewer, J. M., Roseanu, A., Brock, J. H. (2001)

Liposomes as possible carriers for lactoferrin in the local treatment of inflammatory diseases.

Exp. Biol. Med. 226: 559-564.

Tsuda, H., Sekine, K., Nakamura, J., Ushida, Y., Kuhara, T., Takasuka, N., Kim, D. J., Asamoto, M., Baba-Toriyama, H., Moore, M. A., Nishino, H., Kakizoe, T. (1999)

Inhibition of azoxymethane initiated colon tumor and aberrant crypt foci development by bovine lactoferrin administration in F344 rats.

Adv. Exp. Med. Biol. 443: 273-284.

Tsuda, H., Sekine, K., Takasuka, N., Toriyama-Baba, H., Iigo, M. (2000)

Prevention of colon carcinogenesis and carcinoma metastasis by orally administered bovine lactoferrin in animals.

Biofactors 12: 83-88.

Unsöld, E (2003)

Modell der mutterlosen Aufzucht zur Wirksamkeitsprüfung probiotischer Substanzen.

Diss., Inst. f. Tierernähr., LMU München.

Ushida, Y., Sekine, K., Kuhara, T., Takasuka, N., Iigo, M., Tsuda, H. (1998)

Inhibitory effects of bovine lactoferrin on intestinal polyposis in the Apc(Min) mouse.

Cancer Lett. 134: 141-145.

Van Berkel, P. H. C., Geerts, M. E. J., Van Heen, H. A., Mericskay, M., De Boer, H. A., Nuijens, J. H. (1997)

N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA.

Biochem. J. 328: 145-151.

Van de Graaf, E. A., Out, T. A., Kobesen, A., Jansen, H. M. (1991)

Lactoferrin and secretory IgA in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with a stable asthma.

Lung 169: 275-283.

- Van Horn, H. H., Harris, B., Taylor, M. J., Bachman, K. C., Wilcox, C. J. (1994)
Byproduct feeds for lactating dairy cows: effects of cottonseed hulls, sunflower hulls, corrugated paper, peanut hulls, sugarcane bagasse and whole cottonseed with additives of fat, sodium bicarbonate and *Aspergillus oryzae* product on milk production.
J. Dairy Sci. 67: 2922-2938.
- Vince, A., Killingley, M., Wrong, O. M. (1978)
Effect of lactulose on ammonia production in a fecal incubation system.
Gastroenterology 74: 544-549.
- Vorland, L. H., Ulvatne, H., Andersen, J., Haukland, H., Rekdal, O., Svendsen, J. S., Gutteberg, T. J. (1998)
Lactoferrin of bovine origin is more active than lactoferrins of human, murine and caprine origin.
Scand. J. Infect. Dis 30: 513-517.
- Wallace, R. J., Newbold, C. J. (1993)
Rumen fermentation and its manipulation: the development of yeast cultures as feed additives.
Biotechnology in the Feed Industry (Edit: Lyons, T.P.).
Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky: 173-192.
- Walser, K., Bostedt, H. (1990)
Anatomische und physiologische Grundlagen des Neugeborenen.
In: Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere. (Edit: Von Kurt).
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart: 13-15.
- Wang, D., Papst, K. M., Aida, Y., Pabst, M. J. (1995)
Lipopolysaccharide-inactivating activity of neutrophils is due to lactoferrin.
J. Leukoc. Biol. 57: 865-874.
- Wang, W. P., Iigo, M., Sato, J., Kazuhiro, K., Adachi, I., Tsuda, H. (2000)
Activation of intestinal mucosal immunity in tumorbearing mice by lactoferrin.
Jpn. J. Cancer Res. 91: 1022-1027.
- Wang, X., Hirno, S., Willen, R., Wadstrom, T. (2001)
Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a Balb/cA mouse model.
J. Med. Microbiol. 50: 430-435.
- Ward, P. P., Uribe-Luna, S., Conneely, O. M. (2002)
Lactoferrin and host defense.
Biochem. Cell Biol. 80: 95-102.

- Ward, P. P., Mendoza-Meneses, M., Cunningham, G. A., Conneely, O. M. (2003)
Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin.
Mol. Cell Biol. 23: 178-185.
- Wharton, B. A., Balmer, S. E., Scott, P. H. (1994)
Faecal flora in the newborn. Effect of Lactoferrin and related nutrients.
In: Lactoferrin: Structure and function. (Edit: T. W. Hutchens).
Plenum Press, NY.
- Wieczorek, B. (1993)
Effekte tierischer und pflanzlicher Eiweißfuttermittel auf die postprandiale H₂-Exhalation beim Hund.
Diss. TiHo Hannover.
- Williams, P. E. V., Newbold, C. J. (1990)
Rumen probiosis: The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity.
Rec. Adv. Anim. Nutr.: 211-227.
- Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J., Ellison, R. T. (1993)
Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment.
Infect. Immun 61: 719-728.
- Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Hashimoto, S., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Tomita, M. (1998)
Effects of orally administered bovine lactoferrin on the immune system of healthy volunteers.
Adv. Exp. Med. Biol. 443: 261-265.
- Yamauchi, K., Hiruma, M., Yamazaki, N., Wakabayashi, H., Kuwata, H., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Suegara, N., Yamaguchi, H. (2000)
Oral administration of bovine Lactoferrin for treatment of tinea pedis. A placebo-controlled, double-blind study.
Mycoses 43: 197-202.
- Yennie, B. F., Vandijk, H. J., Collins, J. A. (1991)
Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate.
J. Dairy Sci. 74: 1968-1873.
- Yoo, Y. C., Watanabe, R., Koike, Y., Mitobe, M., Shimazaki, K., Watanabe, S., Azuma, I. (1997)
Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 237: 624-628.

Yu, R. -H., Schryvers, A. B. (2002)

Bacterial lactoferrin receptors: insight from characterizing the *Moraxella bovis* receptors.
Biochem. Cell Biol. 80: 81-90.

Zagulski, T., Lipinski, P., Zagulska, A., Broniek, S., Jarzabek, Z. (1989)

Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection in vivo.
Br. J. Exp. Pathol. 70: 697-704.

Zentek, J. (1993)

Untersuchungen zum Einfluß der Fütterung auf den mikrobiellen Stoffwechsel im Intestinaltrakt des Hundes.

Habil.-Schr. TiHo Hannover.

Zentek, J., Molitor, D., Kamphues, J. (1998)

Prüfung intestinaler Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) bei Hunden.
Kleintierpraxis 43: 187-197.

Zhang, P., Sawicki, V., Lewis, A., Hansen, L., Nuijens, J. H., Neville, M. C. (2001)

Human Lactoferrin in the milk of transgenic mice increases intestinal growth in ten-day-old suckling neonates.

Adv. Exp. Med. Biol. 501: 107-113.

Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wieczorek, Z., Montreuil, J., Spik, G. (1991)

Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4-CD8- murine thymocytes.
Immunol. Lett. 30: 119-123.

Zimecki, M., Mazurier, J., Spik, G., Kapp, J. A. (1995)

Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells.
Immunology 86: 122-127.

Zimecki, M., Wlaszczyk, A., Cheneau, P., Brunel, A. S., Mazurier, J., Spik, G., Kubler, A. (1998)

Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals.

Arch. Immunol. Ther. Exp. 46: 231-240.

Zweiman, B., Kucich, U., Shalit, M., Von Allmen, C., Moskovitz, A., Weinbaum, G., Athins, P. C. (1990)

Release of lactoferrin and elastase in human allergic skin reactions.
J. Immunol. 144: 3953-3960.

I Danksagung

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Rambeck für die hervorragende Betreuung unter extremen persönlichen Einsatz.

Ebenso danke ich herzlich meinem Betreuer Herrn Dr. Ulrich Wehr.

Ein riesiges Dankeschön an meine Mitdoktoranden Eva und Marco, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Die fantastische Zusammenarbeit und uneigennützigte Hilfe von eurer Seite werde ich nie vergessen.

Ein ganz dickes Dankeschön an Joseph, dessen Hilfsbereitschaft großartig war und an Jeanette für die regelmäßige Mithilfe.

Mein besonderer Dank gilt auch dem Oberwiesefeldteam, das mich in jeder Situation tatkräftig unterstützte: Frau Stadler für ihr nie endendes Verständnis, Frau Dr. Britta Dobenecker, Walter, Uli, Nadja, Gabi und Adrian.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Hesselbach, Frau Wetzel, Elke und Herrn Kuchler für die immer freundliche Unterstützung im Labor bedanken.

Vielen herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Erhard für die freundliche Bereitstellung der Wohnmöglichkeiten und die Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Danke auch an Herrn Prof. Osterkorn und Herrn J. Stanglmeier für die Mithilfe an der statistischen Auswertung.

Und noch ein Dankeschön an die Damen des unteren Labors der 1. MTK für die Auswertungen zu jeder Tageszeit.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Zentek und Dr. Ute Buscher für die Unterstützung bei der Biopsie.

Nicht zuletzt ein riesiges Dankeschön für die Unterstützung der Studienstiftung des Deutschen Volkes!