

**Wirkung von *Enterococcus faecium*
auf den Organismus neonataler Hundewelpen**

Marco Weiß

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Prof. Dr. W. Rambeck
Koreferent: Dr. M. Rinder

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Diese Dissertation wurde gefördert von der H.-Wilhelm-Schaumann Stiftung.

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

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

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

Wirkung von *Enterococcus faecium*
auf den Organismus neonataler Hundewelpen

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

Vorgelegt von
Marco Weiß
aus München

München 2003

Für Nelson

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	7
2. Schrifttum	9
2.1. Definition des Begriffs „Probiotikum“	9
2.2. Einsatz von Probiotika beim Hund	10
2.3. Enterococcus faecium als Probiotikum	15
2.3.1. Taxonomische Einordnung und Speziescharakteristika	15
2.3.2. Überlebensfähigkeit im Verdauungstrakt	18
2.3.3. Anwendungssicherheit	20
2.3.4. Adhäsionsverhalten an der Darmwand	21
2.3.5. Effekte an der Darmwand und im Darmlumen	23
2.3.6. Effekte auf das Immunsystem	26
2.3.7. Effekte auf das Wachstum und die Futterverwertung	27
2.3.8. Schutz gegen spezifische Krankheiten	29
3. Eigene Untersuchungen	31
3.1. Versuchsaufbau	31
3.2. Material und Methoden	33
3.2.1. Tiere und Tierhaltung	33
3.2.2. Fütterung	34
3.2.3. Futtermittel und ihre Zusammensetzung	35
3.2.3.1. Milchaustauscher	35
3.2.3.2. Beifutter	37
3.2.4. Probiotikum	38
3.2.4.1. Qualitative und quantitative Zusammensetzung nach Herstellerangaben	38
3.2.4.2. Spezifizierung des Wirkstoffs	38
3.2.4.3. Technologische Angaben	39
3.2.5. Allgemeine Aufzuchtdate	40

	Seite
3.2.6. Klinische Parameter	41
3.2.7. Routinemäßige Entwurmung	42
3.2.8. Immunisierung	42
3.2.9. Tätowierung	43
3.2.10. Blutgewinnung	43
3.2.11. Blutuntersuchungen	44
3.2.11.1. Blutbild	44
3.2.11.2. Immunglobuline	44
3.2.11.3. Antioxidativer Status	49
3.2.12. Kotuntersuchungen	49
3.2.12.1. Trockensubstanz im Kot	49
3.2.12.2. Mikrobiologische Kotuntersuchung	50
3.2.12.3. Bestimmung von L-Laktat aus dem Kot	53
3.2.12.4. Bestimmung von Ammoniak aus dem Kot	56
3.2.13. Statistische Methoden	58
3.3. Ergebnisse	60
3.3.1. Aufzuchtparameter und ernährungsphysiologische Daten	60
3.3.1.1. Allgemeinbefinden	60
3.3.1.2. Körpertemperatur	60
3.3.1.3. Zeitpunkt der Augenöffnung	61
3.3.1.4. Gewichtsentwicklung	61
3.3.1.5. Futteraufnahme	62
3.3.1.6. Futtermittelverwertung	63
3.3.2. Blutparameter	64
3.3.2.1. Rotes Blutbild und Thrombozyten	64
3.3.2.2. Weißes Blutbild	67
3.3.2.3. Immunglobuline	72
3.3.3. Kotparameter	74
3.3.3.1. Kottrockensubstanz	74
3.3.3.2. Mikrobiologische Untersuchung	75
3.3.3.3. L-Laktat im Kot	82
3.3.3.4. Ammoniak im Kot	83

	Seite
4. Diskussion	83
4.1. Diskussion des Versuchaufbaus	84
4.2. Diskussion der Methoden	85
4.3. Diskussion der Ergebnisse	86
4.3.1. Aufzuchtparameter und ernährungsphysiologische Daten	86
4.3.2. Rotes Blutbild und Thrombozyten	89
4.3.3. Weißes Blutbild und Immunglobuline	90
4.3.4. Kottrockensubstanz	96
4.3.5. Mikrobiologische Untersuchung	97
4.3.5.1. Aerobe Gesamtkeimzahl	98
4.3.5.2. Nachweis von Escherichia coli	99
4.3.5.3. Nachweis von Clostridium perfringens	100
4.3.5.4. Nachweis von Enterokokken	101
4.3.5.5. Nachweis von Laktobazillen	103
4.3.5.6. Spezifische nachgewiesene Keime	104
4.3.6. L-Laktat im Kot	105
4.3.7. Ammoniak im Kot	106
5. Zusammenfassung	108
6. Summary	110
7. Literaturverzeichnis	112
8. Anhang	123
9. Danksagung	126
10. Lebenslauf	127

Verzeichnis der Abkürzungen

Cl.	Clostridium
DNA	Desoxyribonucleic acid
E.	Escherichia
Ec.	Enterococcus
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Hb	Hämoglobin
hSa	humanes Serumalbumin
I.E.	Internationale Einheiten
KbE	Kolonie bildende Einheiten
kDA	Kilo-Dalton
Lb.	Lactobacillus
Leuc.	Leuconostoc
MIC	minimum inhibitory concentration
NCIMB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd.
PBS	phosphate buffered saline solution
PCR	polymerase chain reaction
PCSL	Pam ₃ Cys-Ser-(Lys) ₄ ·3HCl
Prov.	Providencia
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
rRNA	ribosomal Ribonucleinacid
Sc.	Streptococcus
subsp.	Subspezies
var.	variatio

1. Einleitung

Der Einsatz von Probiotika in der Ernährung von Mensch und Tier hat in den letzten Jahren kontinuierlich an Bedeutung gewonnen.

Beim Nutztier werden Probiotika zunehmend zur Steigerung der Futtermittelverwertung, zur Verbesserung der Zunahmen und der Reduzierung von Aufzuchtverlusten eingesetzt. Der Grund hierfür ist, dass die klassischerweise zur Leistungsförderung eingesetzten Antibiotika einer zunehmenden Reglementierung bzw. einem Verbot unterliegen. So ist in der Europäischen Union beispielsweise seit 1999 der Einsatz von Tylosin, Virginiamycin, Spiramycin und Zink-Bacitracin zur Wachstumsförderung beim Schwein verboten. Es stehen seitdem nur noch 4 Leistungsförderer beim Nutztier zur Verfügung. Davon sind drei Substanzen für die Anwendung bei Ferkeln und Mastschweinen, zwei für Broiler und eine für Legehennen zugelassen. Ab 2006 soll die Anwendung von Antibiotika zur Leistungsförderung beim Nutztier innerhalb der Europäischen Union ganz verboten werden. Auch aufgrund der zunehmend problematischen Resistenzlage bei der therapeutischen Anwendung von Antibiotika bietet der Einsatz von Probiotika bei bestimmten Indikationen eine sinnvolle Alternative. Dabei sind die Kosten der Probiotikabehandlung oft niedriger als beim Einsatz von Antibiotika (Franz et al. 1999).

Beim Kleintier stehen keine wirtschaftlichen Faktoren im Vordergrund, hier erscheint der Einsatz von Probiotika hauptsächlich zur Förderung einer gesunden Verdauung, der Steigerung des Wohlbefindens oder einer positiven Beeinflussung des Immunsystems sinnvoll zu sein.

Auch beim Menschen werden Probiotika als gesundheitsfördernder Zusatz in Joghurts und anderen Milchprodukten kommerziell vermarktet. Der Verbraucher nimmt erfahrungsgemäß Innovationen beim Heimtierfutter gut an, wenn diese bereits im Lebensmittelbereich etabliert sind. Der Nachweis positiver Wirkungen von Probiotika beim Heimtier würde somit sicherlich einen neuen, wirtschaftlich interessanten Sektor für die Futtermittelindustrie eröffnen.

In vorliegendem Versuch sollte die Wirkung eines Probiotikums bestehend aus *Enterococcus faecium* erstmals am Modell der mutterlosen Aufzucht von Hundewelpen untersucht werden. Im Vordergrund stand dabei die Frage, ob das Probiotikum den Gesundheits- und Immunstatus der Welpen signifikant verbessern kann, dies sollte durch Bestimmung von Blut- und Kotparametern sowie allgemeiner klinischer Parameter evaluiert werden. Eine positive Wirkung des Probiotikums könnte außerdem in der Senkung der beim Hund natürlicherweise recht hohen Aufzuchtverluste bestehen, wodurch diesem Nahrungszusatz zukünftig eine wichtige Rolle in der Ernährung von Hundewelpen zukommen könnte.

2. Schrifttum

2.1. Definition des Begriffs „Probiotikum“

Für Probiotika existieren mehrere Definitionsansätze, die durch das Verständnis ihres Wirkungsmechanismus und ihrer Wirkung auf Gesundheit und Wohlbefinden des Organismus geprägt sind.

Bereits 1908 schrieb Metchnikoff den milchsäurebildenden Mikroorganismen die Fähigkeit zu, „abträgliche Keime“ im Darm zurückzudrängen und die Belastung des Organismus durch deren schädliche Stoffwechselprodukte zu vermindern. Lilly und Stillwell verwendeten 1965 den Begriff „Probiotikum“ erstmals, um durch Mikroorganismen produzierte Substanzen zu beschreiben, die das Wachstum anderer Mikroorganismen stimulieren, und somit das Gegenteil von Antibiotika bewirken. Parker definierte 1974 Probiotika als Substanzen und Organismen, die zum Gleichgewicht der Darmflora beitragen, schloss also somit Antibiotika nicht konkret aus. Oft gebraucht wird heute die Begriffsbestimmung von Fuller (1989), der Probiotika als lebende mikrobielle Futterzusätze sieht, die den Organismus positiv beeinflussen, weil sie das Gleichgewicht seiner Darmflora verbessern. Havenaar und Huis in't Veld (1992) erweiterten diese Definition, um außer Nahrungsmitteln auch andere Stoffgruppen und außer einzelnen Bakterien auch gemischte Kulturen im Gebrauch einzuschließen. Salminen et al. bezeichnen 1998 Probiotika als lebende mikrobielle Nahrungsbestandteile, die positive Effekte auf die menschliche Gesundheit haben und erweitern 1999 ihre Definition: „Probiotika sind mikrobielle Zellzubereitungen oder Bestandteile von mikrobiellen Zellen, die positive Effekte auf Gesundheit und Wohlbefinden des Wirtes haben.“ Sie schließen somit auch nicht lebende Mikroorganismen und deren Zellbestandteile ein, bei denen ebenfalls eine gesundheitsfördernde Wirkung beobachtet wurde (Bernardeau et al. 2002; Ouwehand und Salminen, 1998).

2.2. Einsatz von Probiotika beim Hund

Der Einsatz von Probiotika beim Hund ist unter gesundheitsfördernden Aspekten vor allem in größeren Hundehaltungen sinnvoll, und dort insbesondere zur Welpenaufzucht, aber auch bei der Fütterung von Hunden, die längerfristig mit intestinal wirksamen Antibiotika behandelt werden müssen (Zentek et al. 1998).

Ein Bakterium muss über bestimmte funktionelle Eigenschaften verfügen, um eine positive Wirkung auf den Organismus entfalten zu können und somit den Probiotika zugeordnet zu werden. Für Probiotika relevante Selektionskriterien beim Hund sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Selektionskriterien für Probiotika (nach Ouwehand et al. 1999).	
Selektionskriterien	Bemerkungen
Stabilität gegen Säure- und Galleinwirkung	Wichtig für orale Anwendung, um die Passage durch den Intestinaltrakt zu überleben und somit Zellintegrität, Adhäsionsfähigkeit und metabolische Aktivität zu bewahren.
Adhäsion an die Schleimhaut	Wichtig für Immunmodulation, kompetitive Hemmung pathogener Keime, Verhinderung der Adhäsion von pathogenen Keimen, vorübergehende Ansiedlung im Darm.
Anwendungssicherheit	Erfordert Identifikation und Charakterisierung des probiotischen Stammes, Dokumentation der Sicherheit. Kein Abbau der intestinalen Muzinschicht oder Eindringen in den gesunden Organismus.
Klinisch geprüfte und dokumentierte gesundheitsfördernde Effekte	Erfordert Dosis-Wirkungs Daten für die minimale effektive Dosis verschiedener Stämme und verschiedener Produkte. Erfordert randomisierte, placebo-kontrollierte Doppelblindstudien.
Geeignete technologische Eigenschaften	Stabilität des probiotischen Stammes, Phagen-Resistenz, Haltbarkeit im Produkt (wenn lebende Mikroorganismen benötigt), in großem Umfang kultivierbar.

Tabelle 2:
Wichtige postulierte Eigenschaften von Probiotika (nach Ouwehand et al. 1999).

Probiotischer Effekt auf	Art des Effektes
Cholesterinmetabolismus	Senkung des Serum-Cholesterins. Allerdings sind entstehende dekonjugierte Gallensäuren Tumor-fördernd und beschädigen möglicherweise die intestinale Schleimhaut. Daher kontrovers diskutiert.
Bioverfügbarkeit von Vitaminen und Mineralien	Senkung des pH-Wertes im Kolon könnte die Bioverfügbarkeit von Calcium erhöhen. Einige Probiotika produzieren B-Vitamine, andere konsumieren diese.
Menge von Karzinogenen und Mutagenen im Fäzes	Bindung der Mutagene, Reduktion der fäkalen Enzymaktivität, Stimulation xenobiotisch metabolisierender Enzyme.
Intestinale Motilität und Konsistenz des Fäzes	Behebung von Obstipationen. Verkürzung der Inzidenz bzw. Dauer von Durchfallerkrankungen.
Laktosemetabolismus	Für β -Galaktosidase defiziente Organismen.
Anti-Karies-Aktivität	Reduktion der Bindung, Anzahl und Aktivität von Karies-auslösenden Mikroorganismen.
Produktion antimikrobieller Substanzen	Inaktivierung von Pathogenen, Risiko der Schädigung förderlicher Mikroorganismen der normalen Darmflora. Es ist unbekannt, ob die Produktion auch in-situ im Darm stattfindet.
Koaggregation mit Pathogenen	Erweiterte antimikrobielle Aktivität gegen Pathogene. Kompetitive Hemmung.

Je nachdem welcher Effekt gewünscht wird, gibt es zusätzliche Eigenschaften, auf die ein Probiotikum untersucht werden kann. Die in diesem Zusammenhang am häufigsten postulierten Eigenschaften von Probiotika sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Grundsätzlich muss ein Probiotikum jedoch nicht sämtliche

aufgeführten Eigenschaften inne haben, um die Selektionskriterien zu erfüllen. (Ouwehand et al. 1999).

Bisher existieren erst wenige Untersuchungen zum Einsatz von Probiotika beim Hund, die wichtigsten sind in folgendem zusammengefasst.

Biourge et al. untersuchten 1998 inwieweit das Probiotikums Bacillus CIP 5832 (PaciflorTM, Prodeta, Vannes, Frankreich) in Trockenfutter für Hunde eingemischt werden kann. Der technologische Prozess der Expansion-Extrusion und des Trocknens bewirkte den Verlust von über 99% des in sporulierter Form vorliegenden Probiotikums im Futter, so dass bei Futterherstellung das Probiotikum erst nach diesen Prozessen zugegeben werden sollte. Wurde Bacillus CIP 5832 in Form eines Überzuges auf das Futter aufgebracht, wurden Sporenmengen gemessen, die bis zu 60% von der erwarteten Menge abwichen, trotzdem sehen die Autoren das Überziehen des Futters als praktische und effektive Methode zur Integration des Probiotikums an. Ein Haltbarkeitstest über 12 Monate ergab einen Verlust von <25% der Sporen im Vergleich zur Menge, die direkt nach Herstellung des Futters gemessen wurden. Außerdem untersuchten die Autoren die Überlebensfähigkeit von Bacillus CIP 5832 im Gastrointestinaltrakt von Hunden und seine Nachweisbarkeit im Kot. Nach Beginn der Gabe von Futter mit Probiotikazusatz konnten Sporen und vegetative Formen von Bacillus CIP 5832 innerhalb von 24 Stunden im Kot nachgewiesen werden, die Menge erreichte nach 2 bis 4 Tage ein Plateau. Nach Absetzen von Bacillus CIP 5832 konnte es nicht länger als 3 Tage im Kot nachgewiesen werden, vermag also nicht im Darm zu persistieren. 30% der Keime waren in sporulierter Form, 70% in vegetativer Form nachweisbar. Die Verdaulichkeit des Futters wurde durch Zugabe von Bacillus CIP 5832 nicht signifikant verändert.

Molitor (1996) untersuchte die Wirkung von *Ec. faecium* (LBC ME 10, Fa. Bioferment SA) auf adulte Hunde und früh abgesetzte Hundewelpen in einer Dosierung von 10^6 bzw. 10^7 KbE/g Futter und fand keine für die Fütterungspraxis vorteilhaften Wirkungen des Probiotikums. Ebenso wie bei einer ähnlichen Untersuchung mit *Ec. faecium* von Zentek et al. (1998) beobachtete Molitor eine Erhöhung der Enterokokkenzahl in Fäzes und Chymus der Hunde, die nach Ende der Probiotikagabe wieder absank, was gegen eine Ansiedlung der Keime im Intestinum

spricht. Außerdem fanden die Autoren beider Untersuchungen im Ileumchymus der fistulierten Hunde eine tendenzielle Zunahme des Laktatgehaltes, sowie eine Reduktion des pH-Wertes. Den Einfluss des Probiotikums auf andere untersuchte Keime bezeichnen Molitor und Zentek als uneinheitlich, die Verträglichkeit der unterschiedlichen eingesetzten Rationstypen bei Molitor wurde durch *Ec. faecium* Gabe nicht beeinflusst.

Weese und Anderson (2002) konnten bei Anwendung von *Lb. rhamnosus* GG bei Beagles keine negativen Wirkungen feststellen. Außer einer Kontrollgruppe supplementierten die Autoren Hunde mit vier unterschiedlichen Dosierungen des Probiotikums (1×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} und 5×10^{11} KbE pro Tag). Sie konnten zeigen, dass das Bakterium die Passage durch das Intestinum des Hundes überlebt, da bei allen Versuchsgruppen viable *Lb. rhamnosus* GG im Kot nachgewiesen werden konnten (Abb. 1). In der Gruppe mit der höchsten Dosierung war die Menge an nachgewiesenen *Lb. rhamnosus* GG signifikant höher als in allen anderen Gruppen.

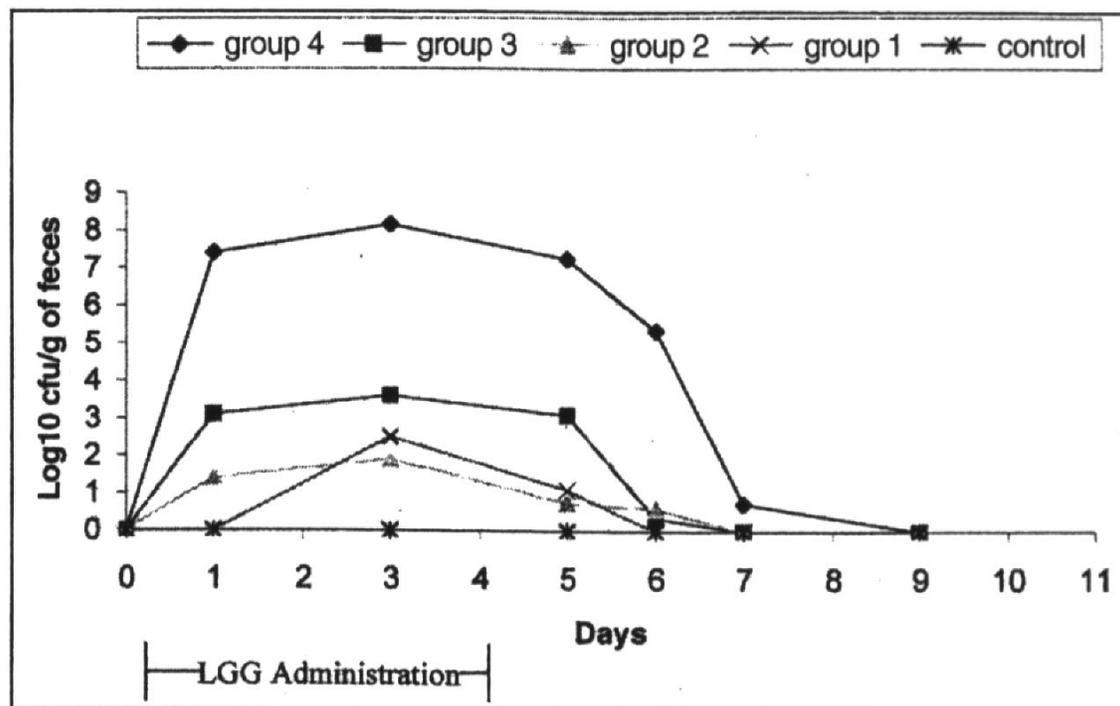


Abb. 1 (aus Weese und Anderson 2002): *Lb. rhamnosus* GG im Kot von Hunden nach oraler Applikation. Control= ohne Probiotikum, Group 1= 1×10^9 , Group 2= 1×10^{10} , Group 3= 5×10^{10} , Group 4= 5×10^{11} KbE pro Tag.

Eine Ansiedlung des Probiotikums im Intestinum fand nicht statt, da 72 Stunden nach Absetzen des Probiotikums dieses nicht mehr im Kot nachgewiesen werden konnte.

Rinkinen et al. (2003) untersuchten in-vitro an immobilisiertem Muzin, das aus jejunalem Chymus von Beagles gewonnen wurde, die Fähigkeit verschiedener Probiotika, kompetitiv die Adhäsion bestimmter caniner Pathogene an die Muzinschicht des Darmes zu hemmen. Dabei konnten alle getesteten Probiotika die Adhäsion des pathogenen Bakteriums *Cl. perfringens* signifikant reduzieren. Andererseits wurde durch den Einsatz der beiden Probiotika *Ec. faecium* M74 und *Ec. faecium* SF273 die Adhäsion von *Campylobacter jejuni* signifikant erhöht. (Tabelle 3).

Tabelle 3: Kompetitive Hemmung caniner Pathogene durch Probiotika (aus: Rinkinen et al. 2003).				
	Clostridium perfringens	Staphylococcus intermedius	Salmonella Typhimurium	Campylobacter jejuni
	Durchschnittliche Veränderung (%) der Adhäsion ± Standardabweichung			
Lactobacillus rhamnosus GG	79,1 ± 6,5*	112,3 ± 31,2	131,7 ± 36,5	101,9 ± 34,1
Bifidobacterium lactis Bb12	75,1 ± 7,2*	90,2 ± 22,5	97,7 ± 24,7	94,4 ± 22,8
Lactobacillus pentosus UK1A	57,0 ± 6,3*	101,8 ± 21,4	103,4 ± 26,9	109,8 ± 22,2
Lactobacillus pentosus SK2A	53,7 ± 17,2*	87,5 ± 24,6	99,9 ± 27,9	127,0 ± 34,3
Enterococcus faecium M74	69,8 ± 9,6*	91,8 ± 23,5	97,1 ± 22,3	134,6 ± 17,4**
Enterococcus faecium SF273	78,1 ± 3,0*	82,4 ± 21,2	107,7 ± 29,2	205,5 ± 75,0**

* = Signifikante Reduktion der Adhäsion von Pathogenen.
** = Signifikante Erhöhung der Adhäsion von Pathogenen.

Zwischen den Probiotika *Lb. rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* Bb12 und *Lb. pentosus* UK1A und dem pathogenen Bakterium *Campylobacter jejuni* war die ebenfalls untersuchte Fähigkeit zur Co-Aggregation zwischen diesen beiden Gruppe gegeben. Co-Aggregation erlaubt es einem Probiotikum mit pathogenen Keimen in engem Kontakt zu interagieren und so besser antimikrobiell wirksam zu werden (Reid et al. 1988).

2.3. Enterococcus faecium als Probiotikum

60% aller auf dem Markt befindlichen Probiotika enthalten Enterokokken (Jin et. al. 2000). *Ec. faecium* ist Bestandteil der normalen Darmflora vieler Tierarten. Beim Menschen finden sich beispielsweise 10^4 bis 10^5 KbE *Ec. faecium* pro Gramm Kot (Noble, 1978 ; Chenoweth und Schaberg, 1990). Bei Großtieren, wie Schweinen, Rindern und Schafen ist die Prävalenz dieser Bakterien niedriger (Leclerk et al. 1996). In Kotproben von Schweinen ist *Ec. faecium* die dominierende Enterokokkenart (Devriese et al. 1994 ; Leclerc et al. 1996). Außerdem lässt sich *Ec. faecium* zwar bei prä-ruminierenden Kälbern isolieren, nicht aber bei Milchkühen und anderen ruminierenden Rindern (Devriese et al. 1992b).

Für die mannigfaltigen probiotischen Wirkungen, die durch *Ec. faecium* hervorgerufen werden, sind unter anderem dessen Speziescharakteristika entscheidend, die in Folgendem beschrieben werden.

2.3.1. Taxonomische Einordnung und Speziescharakteristika

Enterokokken gehören zusammen mit den Genera *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Lactococcus* zur Gruppe der Milchsäure-produzierenden Bakterien, im englischen Sprachraum werden sie als „lactic acid bacteria“ oder kurz LAB bezeichnet (Carr et al. 2002).

Die Enterokokken wurden als Gruppe erstmals von Thiercelin (1899) erwähnt. Thiercelin und Jouhaud schlugen dann 1903 für gram-positive Diplokokken

intestinalen Ursprungs die Bezeichnung „Enterococcus“ vor. Das Genus *Enterococcus* wurde von Killper-Bälz und Schleifer (1984) erstmals beschrieben. Sie bewiesen durch DNA:DNA und DNA:rRNA Hybridisation, dass sich *Sc. faecium* und *Sc. faecalis* genug von anderen Streptokokken unterscheiden um ihre Einteilung in ein eigenes Genus zu rechtfertigen. Seit 1984 resultierten phylogenetische und taxonomische Studien in der Zuordnung von 19 Spezies zum Genus *Enterococcus* (Devriese et al. 1993). Innerhalb des Genus wurden außerdem 4 „Speziesgruppen“ etabliert. *Ec. faecium* wurde dabei zusammen mit *Ec. durans*, *Ec. hirae* und *Ec. mundtii* der „Faecium-Gruppe“ zugeordnet. Eine klassische taxonomische Einordnung ist nur vage möglich, da es keine phänotypischen Charakteristika gibt, die die Enterokokken von anderen gram-positiven, Katalase-negativen kokkenförmigen Bakterien eindeutig abgrenzen (Devriese et al. 1993).

So gehören die Enterokokken zu den grampositiven Kokken, werden aufgrund ihrer Gruppenantigene in die Lancefield Gruppe D eingeordnet und lassen sich innerhalb dieser Gruppe von anderen Gattungen durch bestimmte phänotypische Kriterien unterscheiden (Tabelle 4). Allerdings reichen diese Kriterien nicht für eine Abgrenzung von den Streptokokken aus, hierfür sind als Wachstums- und Toleranzkriterien die sogenannten „Sherman-Kriterien“ entscheidend. Sie beinhalten das Wachstum der Bakterien in einem Bereich von 10-45°C, bei einem pH-Wert von 9,6, in Anwesenheit von 6,5% NaCl und 40% Galle. Außerdem kann zur Abgrenzung von den Streptokokken ein Galle-Äsculin-Agar zur Isolierung und der Nachweis der Pyrrolodonyl-Peptidase (PRYase) der Enterokokken dienen (Mayr und Rolle, 2002). *Ec. faecium* ist ein fakultativer Anaerobier (Carr et al. 2002).

Als Unterscheidungskriterien von *Ec. faecium* zu anderen Enterokokkenspezies werden angegeben (Mundt, 1986): Bildung von Ammoniak aus Arginin, Wachstum in 0,1% Methylenblau-Milch, keine Reduktion von Tetrazolium, keine Dekarboxylierung von Tyrosin, Säurebildung aus Arbutin, Melibiose und Sorbose, keine Säurebildung aus Melizitose. Devriese et al. (1987) fanden hingegen auch *Ec. faecium* Stämme, die keine Säure aus Melibiose, aber aus Melizitose bilden. Außerdem ergaben ihre Untersuchungen von 76 aus dem Darm unterschiedlicher Tierarten isolierter *Ec. faecium* Stämme, dass die meisten der Isolate von Säugetieren keine D-Raffinose bilden. 12 von 15 bei Rindern, 4 von 5 bei Hunden und 2 von 39 beim Geflügel

isolierte Stämme reagierten Xylose-positiv, während der Rest der Proben Xylose negativ war.

Tabelle 4:
Abgrenzung der wichtigsten Gattungen gram-positiver Kokken
 (aus Mayr und Rolle, 2002).

Gattung	Lagerung im mikroskopischen Bild	Koagulase	Katalase	Anaerobe Glucose-verwertung	Furazolidon Empfindlichkeit
Staphylococcus (S. aureus u.a.)	unregelmäßig bzw. in Haufen	+	+	+	sensitiv
Staphylococcus (S. epidermidis u.a.)	unregelmäßig bzw. in Haufen	-	+	+	sensitiv
Streptococcus	Ketten unterschiedlicher Länge	-	-	+	sensitiv
Enterococcus	paarweise bzw. oft in kurzen Ketten	-	-	+	sensitiv
Micrococcus	unregelmäßig	-	+	-	resistent

Viele Stämme von *Ec. faecium* sind gegen das Antibiotikum Vancomycin und andere Glykopeptidantibiotika resistent. Es sind 3 Phänotypen von Resistenzen bekannt, die dem Namen der codierenden Gene entsprechen: vanA, vanB und vanC. Klein et al. (2000) fassten die Eigenschaften dieser drei Phänotypen folgendermaßen zusammen:

VanA ist hochgradig gegen Vancomycin resistent (MIC>512mg/l), außerdem weist er eine Kreuzresistenz gegen Teicoplanin auf (MIC>8 mg/l). Das vanA Gen ist auf einem Plasmid lokalisiert und übertragbar. Der vanB Phänotyp besitzt eine nicht übertragbare Resistenz gegen niedrigere Konzentrationen von Vancomycin (MIC>128 mg/l) und bleibt sensitiv für Teicoplanin (MIC<4mg/l). Der vanC Phänotyp besitzt eine niedrige Resistenz gegen Avoparcin (MIC>8-16 mg/l) und ist sensitiv

gegenüber Teicoplanin. Es existieren außerdem noch andere Gene, die sekundär bei der Resistenz eine Rolle spielen (z.B. vanH, vanR, vanS, vanX, vanY, vanZ).

2.3.2. Überlebensfähigkeit im Verdauungstrakt

Ein Probiotikum ist nach seiner oralen Verabreichung im Gastrointestinaltrakt des Tieres mannigfaltigen Einflüssen ausgesetzt, durch die es in seiner Viabilität beeinträchtigt werden kann. Der niedrige pH-Wert des Magens, der u.a. eine natürliche Abwehrbarriere gegen Keime darstellt, tötet viele Mikroorganismen ab. Ebenso stellen die zahlreichen Enzyme des Verdauungskanal, wie das Pepsin im Magen oder Trypsin, Chymotrypsin, Peptidasen, Lipase und Amylase im Dünndarm, sowie die aus Fett, Fettsäuren, Gallensalzen, Pigmenten und Cholesterin bestehende Galle eine Bedrohung für die Viabilität probiotischer Mikroorganismen dar.

Für oral eingesetzte Probiotika ist es laut einigen Autoren wichtig, diesen Einflüssen standzuhalten und die Passage durch den Magen-Darm-Trakt zu überleben, um eine positive Wirkung entfalten zu können (Collins et al. 1998, Weese und Anderson 2002). Andere Autoren schreiben auch nicht-viablen Mikroorganismen bzw. deren Bestandteilen eine probiotische Wirkung zu. (Bernardeau et al. 2002, Gill und Rutherford 2001, Salminen et al. 1999).

Laut Ouwehand und Salminen (1998) sind beispielsweise auch nicht-viable Laktobazillen fähig an intestinale Zellen zu binden und die Bindung von pathogenen Keimen zu verhindern. Außerdem besteht der Vorteil der Anwendung von abgetöteten Mikroorganismen als Probiotika in einer längeren Haltbarkeit und geringeren Anforderungen an Transport und Lagerung. Die Autoren werteten verfügbare Studien über die Wirkung von lebenden und abgetöteten probiotischen Bakterien aus und kamen zu dem Schluss, dass bei einigen Indikationen auch abgetötete Bakterien eine Wirkung erzielen, bei anderen wiederum viable Bakterien unabdingbar sind (Tabelle 5).

Tabelle 5: Effekt von lebenden und abgetöteten probiotischen Mikroorganismen auf einige Krankheitszustände (nach Ouwehand und Salminen 1998).		
	lebenden Mikroorganismen	abgetötete Mikroorganismen
Klinische Symptome der Laktose-Intoleranz	+	+
Durchfall	+	+ ¹
Immunstimulation und Anti-Tumor-Aktivität: oral/parenteral	+/+	-/+
Aktivität gegen Mutagene	+	-
Infektion mit Candida Albicans	+	-
+ = Effekt, - = kein Effekt, ¹ = kein Immuneffekt		

Um also das volle Wirkungsspektrum eines Probiotikums ausschöpfen zu können, müssen die darin enthaltenen Mikroorganismen die Passage durch den Verdauungstrakt überleben.

Netherwood et al. (1999) konnten die Überlebensfähigkeit von *Ec. faecium* NCIMB 11508 in Gastrointestinaltrakt von Eintagsküken feststellen.

Ec. faecium ist gegenüber niedrigen pH Werten und Gallensalzen resistent. (Lewenstein et al., 1979; Bellomo et al. 1980; Canganella et al. 1996). Lebende *Ec. faecium* sind außerdem bei vielen Tierarten wie Mensch, Schwein, Rind, Fohlen, Schaf, Hund, Katze, Ente, Hase, Meerschweinchen, Hamster, Ratte und Maus im Kot nachweisbar (Noble, 1978; Chenoweth und Schaberg, 1990; Leclerc et al. 1996; Devriese et al. 1992b, 1994). Somit ist anzunehmen, dass *Ec. faecium* die Passage durch den Verdauungstrakt der meisten Säugetiere überlebt.

2.3.3. Anwendungssicherheit

Obwohl einige Milchsäure produzierenden Bakterien bereits seit Jahrhunderten in fermentierten Milchprodukten angewendet werden und generell als sicher gelten („generally recognised as safe“, GRAD), sollten vor allem bei als Probiotikum neu angewendeten Stämmen immer mögliche negative Effekte im Auge behalten werden und die Anwendungssicherheit dieser Bakterien im Tierfutter und Lebensmittel sorgfältig überprüft werden. Dies gilt vor allem für *Ec. faecium* enthaltende Probiotika, da dieses Bakterium auf Grund seiner übertragbaren Glykopeptidresistenz problematisch sein kann und sich unter den Enterokokken außerdem einige opportunistische Krankheitserreger finden.

Da *Ec. faecium* bei den meisten Säugetieren im Kot nachweisbar ist (Noble, 1978; Chenoweth und Schaberg, 1990; Leclerc et al. 1996; Devriese et al. 1992b, 1996) und somit als normaler Bestandteil der Darmflora angesehen werden kann, ist eine Translokation dieses Bakteriums in den gesunden Organismus sehr unwahrscheinlich.

Etwas problematisch ist die Anwendungssicherheit von *Ec. faecium* im Bezug auf die Übertragung von Antibiotikaresistenzen. McConnel et al. (1991) zeigten, dass im Gastrointestinaltrakt der Maus das Plasmid pAM1, das für Makrolid-Resistenz codiert, von *Lb. reuterii* auf *Ec. faecium* und weiterhin von *Ec. faecium* auf *Ec. faecalis* übertragen werden konnte. Ebenso können *Ec. faecium* eine Vancomycinresistenz akquirieren und diese weitergeben, da diese Resistenz Plasmid-codiert ist. Infektionen mit Vancomycin-resistenten *Ec. faecium* gelten als besonders gefährlich (Marteau und Salminen 1999), vor allem weil dieses Antibiotikum eines der wenigen ist, das noch effektiv gegen bestimmte multiresistente Keime wirkt (Salminen et al. 1998) . Deshalb sollten *Ec. faecium* vor ihrem Einsatz als Probiotikum auf jeden Fall auf eine Vancomycinresistenz getestet werden, vor allem Stämme des Phänotypes vanA, vanB oder vanC (siehe auch 2.3.1.2.) sind als Probiotika ungeeignet.

Rinkinen et al. (2003) konnten zeigen, dass die beiden Probiotika *Ec. faecium* M74 und *Ec. faecium* SF273 in-vitro beim Hundemodell die Adhäsionsfähigkeit des pathogenen Keims *Campylobacter jejuni* an die Muzinschicht des Darmes signifikant steigerte (Tabelle 3). Eine damit verbundene vermehrte Kolonisation des Hundedarms mit diesem pathogenen Bakterium macht den Autoren zufolge den Hund zu einem potentiellen Träger von *C. jejuni* und somit zu einer möglichen Quelle für humane *Campylobakteriose*. Diese Gefahrenquelle sollte somit bei Anwendung von *Ec. faecium* als Probiotikum beim Hund nicht aus den Augen verloren werden.

2.3.4. Adhäsionsverhalten an der Darmwand

Viele Autoren sehen eine Adhäsion von Probiotika an die Darmmukosa als Grundvoraussetzung für eine Kolonisation des Darmes (Alander et. al. 1999), antagonistische Aktivität gegen enteropathogene Keime (Coconnier et al. 1993), Modulation des Immunsystems (Schiffrin et. al. 1997 , O´Halloran et al. 1998) und eine Heilungsbeschleunigung von geschädigter Darmmukosa (Elliott et. al 1998) an.

Es existieren mehrere Orte im Verdauungstrakt, wo Mikroorganismen adhäreren können und somit die Voraussetzung für eine Kolonisation gegeben ist. In Dünndarm wird eine Adhäsion grundsätzlich durch die dort herrschende kräftige Peristaltik erschwert, der gesunde Dünndarm beherbergt nur eine geringe Anzahl von Bakterien (beim Menschen 10^3 bis 10^5 pro Gramm Chymus). Dies sind meist aerobe und fakultativ anaerobe, säurefeste Bakterien, wie etwas Laktobazillen und Streptokokken, die das saure Milieu des Magens überleben. Im Dickdarm findet sich durch die dort herrschende wesentlich langsamere Peristaltik eine größere Bakterienpopulation als im Dünndarm (10^{11} pro g Kot). Diese Bakterienpopulation kann sich außerdem als residente Mikroflora etablieren, weil sie der kontinuierlichen Peristaltik durch eine schnelle Vermehrungsrate bzw. Adhäsion entgegenwirkt (Fuller 1989, Fox 1988).

Die Muzinschicht des Darmes bedeckt dessen Epithel und enthält sowohl Glykoproteine, als auch abgestoßene Darmepithelzellen und bildet somit ein ausgezeichnetes Substrat für bakterielles Wachstum. In der Muzinschicht herrscht eine vergleichsweise hohe Sauerstoffspannung und sie bietet einen gewissen Schutz

vor oral applizierten Antibiotika. Die Adhäsion von Bakterien an die Glykoproteine der Muzinschicht erfolgt hauptsächlich über eine Sauerstoffbindung. Erhöhte Kortikosteroidwerte im Organismus, wie sie beispielsweise bei Stress vorkommen, können die Menge an in das Darmlumen abgegebenem Muzin verringern. Dieser Substratmangel führt anschließend zu einer Verminderung der anaeroben Mikroflora (Fox, 1988).

Im Dickdarm können Bakterien auch direkt an die Rezeptoren der intestinalen Epithelzellen binden. Diese Rezeptoren befinden sich an Membranproteinen, Glykoproteinen, Glykolipiden oder der Glykocalyx der Epithelzellwand, die Adhäsion erfolgt dabei hauptsächlich über eine Stickstoffbindung. Das Bakterium selbst besitzt dafür sogenannte Adhäsine, dies sind Proteine, die eine Bindung an spezifische Kohlenhydratsequenzen eines Rezeptors möglich machen. Bei gram-negativen Bakterien sind die Adhäsine oft auf aus der Bakterienwand hervorstehenden Fortsätzen, wie Fimbrien, Fibrillen oder Curli lokalisiert. Bei gram-positiven Bakterien, wie Laktobazillen oder Enterokokken sitzen die Adhäsine hingegen meist in der Zellwand oder auf der Zelloberfläche. Ein Bakterium kann ein oder mehrere Adhäsine besitzen, deren Produktion es abhängig von den Umweltbedingungen an- oder abschaltet. Diesen Vorgang bezeichnet man mit dem englischen Terminus „phase variation“. Das Phänomen, dass Zielrezeptoren der Adhäsine auf der Darmepithelzelle, oft auch auf Erythrozyten der selben Spezies zu finden sind, macht einen Nachweis von bakteriellen Adhäsinen durch die Hämagglutinationsreaktion möglich.

Die molekularen Adhäsionsmechanismen und Adhäsine sind bis heute am besten bei *E. coli* untersucht und sind wegen der bedeutenden Rolle bestimmter Stämme des Bakteriums als Auslöser von Durchfallerkrankungen von besonderem Interesse. Außerdem wurden die meisten Untersuchungen zur Adhäsionsfähigkeit von Probiotika an die Darmschleimhaut und deren Muzinschicht bis heute an in-vitro Modellen durchgeführt. Dabei stellt sich natürlich die Frage inwiefern sich diese Ergebnisse auf die tatsächlichen in-vivo Adhäsionseigenschaften übertragen lassen. So sehen Tuomola et al. (1999) im Fall von *Lactobacillus GG* aufgrund ähnlicher Ergebnisse von in-vivo Studien das in-vitro Modell für dieses Bakterium als geeignet

an, im Falle von *Lb. casei* Shirota jedoch zum Beispiel nicht. Außerdem gibt es bis heute noch für keine Tierart ein Standard in-vitro Modell für Adhäsionsstudien.

Im Gegensatz zu den umfangreichen Untersuchungen über das Adhäsionsverhalten von Laktobazillen, gibt es über die Anheftungseigenschaften von Enterokokken bis jetzt nur sehr wenige Studien, und das obwohl in mehr als 60% der am Markt befindlichen probiotischen Mittel diese Bakterien enthalten ist. (Franz et al. 1999).

Jin et al. (2000) untersuchten das Adhäsionsverhalten von *Ec. faecium* 18C23 in-vitro an porzinem Muzin. Sie konnten zeigen, dass ca. 9% dieses Stammes sich an das Muzin banden. Eine Behandlung des Substrats mit Trypsin reduzierte die Bindungsfähigkeit, was ein Hinweis auf die Proteinnatur des Bindungsrezeptors ist. Eine Behandlung mit Metaperiodat hatte denselben Effekt, so dass an der Bindung wohl auch ein Kohlenhydrate beteiligt ist. Der Bindungsrezeptor scheint somit ein Glykoprotein zu sein.

Rinkinen et al. (2000) evaluierten die Bindungsfähigkeit der beim Tier als Probiotikum angewendeten *Ec. faecium* Stämme Biobak (Biofarm OY) und Tehobakt (Orion) in-vitro an Muzin von Hunden. Tehobakt wies eine Bindungsfähigkeit von ca. 3 % auf, Biobak von ca. 2 %. Eine Behandlung der Bakterien mit Dünndarmchymus der Hunde reduzierte die Bindungsfähigkeit von Biobak signifikant, Tehobakt hingegen tendierte lediglich zu einer verminderten Adhäsion.

2.3.5. Effekte an der Darmwand und im Darmlumen

Jin et al. (2000) konnten zeigen, dass die Bindungsfähigkeit der enterotoxischen *E. coli* Stämme K88ab und K88MB an Muzin des Darmes durch *Ec. faecium* 18C23 signifikant gehemmt werden kann. So banden in-vitro an porzines Muzin bis zu 97% weniger *E. coli* im Anwesenheit von *Ec. faecium* 18C23. Die Autoren vermuten als Mechanismus eine sterische Behinderung der Bindung von *E. coli* durch an das Muzin gebundene *Ec. faecium*, die aber wohl nicht denselben Rezeptor besetzen. Außerdem konnten sie zeigen, dass die Hemmung nicht lediglich auf einem pH-Effekt des Probiotikums beruhte, wie es beim inhibitorischen Effekt von *Lactobacillus*

GG auf die Bindungsfähigkeit von *Salmonella typhimurium* der Fall ist (Lehto et al. 1997).

Netherwood et al. (1999) untersuchten den Einfluss von *Ec faecium* NCIMB 11508 Gabe auf die Bakterienpopulation im Gastrointestinaltrakt von Hühnern. Sie setzten dabei einen nativen und einen genetisch veränderten *Ec. faecium* Stamm ein. Der Einsatz des nativen Stammes führte zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl von Keimen in der Bakterienpopulation des Darmes, die Verwendung des genetisch veränderten Stammes (Integration eines Plasmides für Erythromycin-Resistenz, das ein β -1,4- Glucanase Gen enthält) bewirkte eine Abnahme der *Ec. faecalis* Anzahl. Die Autoren vermuten, dass *Ec. faecium* und *Ec. faecalis* ähnliche Nischen im Verdauungstrakt besetzen oder evtl. sogar eine synergistische Beziehung haben. Die Autoren konnten ansonsten keinen Einfluss der *Ec. faecium* Gabe auf die Gesamtanzahl der Laktobazillen, Enterokokken, Coliformen oder Salmonellen im Verdauungstrakt feststellen.

Eine weitere Wirkung im Darmlumen können Enterokokken dadurch entfalten, dass sie zur Produktion sogenannter Bakteriozine fähig sind. Sie können durch diese antimikrobiellen Peptide das Wachstum anderer Keime hemmen, und somit probiotisch wirksam werden. Allerdings gibt es bis heute noch keine in-vivo Untersuchungen über die Produktion und Wirksamkeit von Bakteriozinen, so dass bisher durchgeführte in-vitro Studien lediglich einen Hinweis auf die Wirkung und Effektivität von Bakteriozinen im Darm lebender Organismen geben können (Ouwehand et al. 1999).

Bakteriozine werden nach Nes et al. (1996) in 3 Klassen eingeteilt :

Klasse 1 Bakteriozine sind die sogenannten „lantibiotics“. Dies sind kleine, membranaktive und die beiden seltenen Aminosäuren Lanthionin und β -Methyllanthion enthaltende Peptide.

Klasse 2 Bakteriozine sind klein (4-5 kDa), hitzestabil und enthalten kein Lanthionin.

Klasse 3 Bakteriozine sind hitzelabile Proteine mit einem Gewicht von über 30 kDa.

Du Toit et al. (2000) untersuchten die Bakteriozinproduktion verschiedener aus Schweinekot isolierter Enterokokken. Sie fanden drei *Ec. faecium* Stämme, die hitzestabile Typ 2-Bakteriozine mit breitem Wirkungsspektrum produzierten (Tabelle 6) und dabei vor allem andere Enterokokken-Stämme, aber auch pathogene Keime wie Clostridien oder Listerien hemmten.

Tabelle 6: Inhibitorische Aktivität von drei <i>Ec. faecium</i> Stämmen aus Schweinekot bei neutralem pH Wert auf verschiedene Indikatorkeime mit Agar-Spot Test (nach Du Toit et al. 2000)			
Indikatorkeim	Inhibitorische Aktivität von		
	<i>Ec. faecium</i> BFE 1072 mit Enterocin L50A und/oder L50B	<i>Ec. faecium</i> BFE 1170 mit Enterocin A	<i>Ec. faecium</i> BFE 1228 mit Enterocin A
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 13550	(+)	-	-
<i>Lactobacillus curvatus</i> LMG 13553	-	-	(+)
<i>Lactobacillus helveticus</i> LMG 13555	+	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i> LMG 13558	+	-	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LMG 13560	(+)	+	+
<i>Leuconostoc cremoris</i> LMG 13563	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 13566, RK	+/(+)	+/(+)	+/(+)
<i>Enterococcus faecium</i> RK	+	(+)	(+)
<i>Enterococcus durans</i> DSM 20633, RK	(+)	(+)	(+)
<i>Enterococcus avium</i> DSM 20679	(+)	(+)	(+)
<i>Enterococcus dispar</i> DSM 6630	+	(+)	(+)
<i>Enterococcus cecorum</i> DSM 20682	(+)	(+)	(+)
<i>Enterococcus gallinarum</i> DSM 20628	(+)	(+)	(+)
<i>Enterococcus mundtii</i> DSM 4838	(+)	(+)	(+)
<i>Listeria monocytogenes</i> WS 2247, WS 2249, WS 2250	+	+	+
<i>Listeria ivanovii</i> WS 2255, SLCC 4769	+	+	+
<i>Listeria innocua</i> LMG 13568, WS 2257, WS 2258	+	+	+
<i>Listeria seeligeri</i> WS 2253	+	+	+
<i>Listeria welshimeri</i> WS 2254	+	+	+
<i>Clostridium sporogenes</i> LMG 3570	+	+	+
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> LMG 13571	+	+	+
<i>Propionibacterium acidopropionici</i> LMG 13572	+	-	-
<i>Propionibakterium</i> sp. LMG 13573, LMG 13574	+	+	+

+, klare Hemmzone >1mm; (+), schwache Hemmung 0,5-1mm; - keine Hemmzone.

Die Bakteriozine konnten durch alpha-Chymotrypsin, Proteinase K, Trypsin, Pronase, Pepsin und Papain inaktiviert werden, nicht jedoch durch Lipase, Lysozym und Katalase. Die höchste Aktivität zeigten die Bakteriozine bei neutralem pH.

2.3.6. Effekte auf das Immunsystem

Um das Immunsystem von der Darmwand aus zu beeinflussen, muss ein probiotischer Mikroorganismus die lymphatischen Zellen des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes (engl. „gut-associated lymphatic tissue“ oder GALT) aktivieren. Diese Zellen sind zwischen den Epithelzellen der Darmschleimhaut verteilt und auch in der Lamina propria und Submukosa zu finden (Madara 1997). Bei der Aufnahme des Antigens in die Darmwand spielt der Weg durch die sogenannten m-Zellen eine große Rolle (Abb. 2, 2), die neben säulenartigen Epithelzellen.

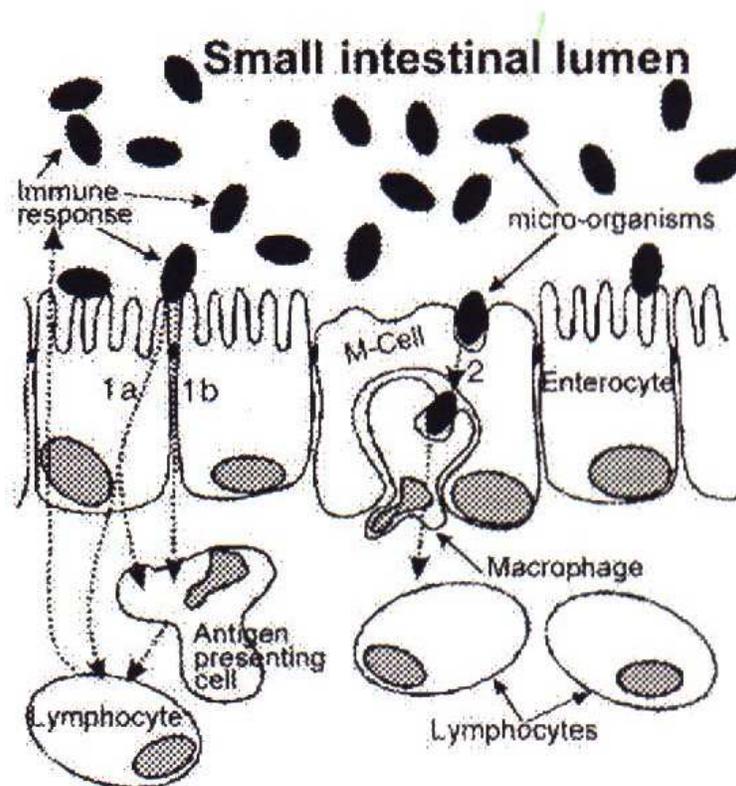


Abb. 2 (nach Ouwehand 1999): Mögliche Wege der Stimulation des Immunsystems durch aufgenommene Probiotika.

Bestandteile des Follikel-assoziierten Epithels (engl. „follicle associated epithelium“ oder FAE) in den Peyerschen Platten der Darmwand sind. Außer durch die m-Zellen kann die Aufnahme kleinerer Antigene auch transzellulär durch normale Epithelzellen (Abb. 2, 1a), oder parazellulär durch tight junctions (Abb. 2, 1b) dieser Zellen erfolgen

Daraufhin können die Antigene mit Antigen-präsentierenden Zellen, T-Zellen und Makrophagen mit Gal/GalNAc Rezeptoren zur Erkennung von Galaktoseresten auf der Bakterienoberfläche in Kontakt kommen und damit eine Immunantwort auslösen.

Über immunologische Effekte von *Ec. faecium* als Probiotikum gibt es kaum Literaturangaben, sodass zu diesem Themenkomplex lediglich eine Literaturquelle ausgewertet werden konnte. Mikes et al. (1995) verabreichten zwölf erwachsenen Menschen eine Dosis von 5×10^9 *Ec. faecium* M-74 über einen Zeitraum von sechs Wochen und stellten bei den Probanden unter anderem eine erhöhte IgG Produktion durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes fest, welche sie auf einen immunstimulierenden Effekt des Probiotikums zurückführten.

2.3.7. Effekte auf das Wachstum und die Futtermittelverwertung

Ebenso wie die positive Wirkung von niedrig dosierten Fütterungsantibiotika auf die Zunahme von Nutztieren, ist auch die Wirkung von Probiotika vom Hygienestatus, den das jeweilige Tier umgibt, abhängig. Bei Tieren, die im Rahmen unzureichender Haltungsbedingungen durch eine wachstumshemmende Keimflora gestresst sind, sind positive Wirkungen auf das Wachstum durch Probiotika zu erwarten (Fuller, 1989; Fox, 1988), unter optimierten Haltungsbedingungen ist dies unter Umständen nicht der Fall.

Ec. faecium wurde in seiner Wirkung in mehreren Studien mit Antibiotika als Wachstumsförderer verglichen. *Ec. faecium* scheint dabei grundsätzlich denselben positiven Effekt auf das Wachstum zu besitzen wie gängige Antibiotika (Tabelle 7), zusätzlich steigt die Futtermittelverwertung und außerdem eignet sich *Ec. faecium* zur Durchfallprophylaxe (Fox, 1988). In mehreren Studien wurde *Ec. faecium*

Tabelle 10: Gegenüberstellung bestimmter Effekte von Antibiotika und Ec. faecium					
Species	Antibiotika- behandlung	Probiotika- behandlung	Ergebnis Antibiotikum	Ergebnis Ec. faecium	Referenz
Kalb	80 mg Virginiamycin pro kg Milch	1,5 g Ec. faecium M 74 pro kg Milch	3,8 medizinische Be- handlungen pro Gruppe	3,1 medizinische Be- handlungen pro Gruppe	Hefel (1980)
Kalb	40 mg Avoparcin pro kg Futter	20 mg Ec. faecium	-	16% weniger Sarcop- tose im Vergleich zur Antibiotika Gruppe	Kirchgessner (1985)
Kalb	80 ppm Bacitracin Zink	10 ⁵ Ec. faecium pro kg MAT pro kg Milch- austauscher	Futtermwertung 1,722 Tageszunahme 1236 g	Futtermwertung 1,713 Tageszunahme 1229 g	Burgstaller (1983)
Kalb	Bacitracin	Ec. faecium 68	gleiche Futteraufnahme, Tageszunahmen und Schlachtgewicht		Burgstaller et al. (1984)
Schwein	10 ppm Virginiamycin	Ec. faecium	3,18 kg Futter pro kg Zunahme	3,10 kg Futter pro kg Zunahme	Swedish Farmer Asso- ciation (1984)
Schwein	Avoparcin	Ec. faecium	3,06 kg Futter pro kg Zunahme	3,00 kg Futter pro kg Zunahme	Swedish Farmer Asso- ciation (1985)

supplementierte Tiere außerdem mit Kontrollgruppen ohne Probiotikagabe verglichen. Die resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Effekte der Supplementierung von <i>Ec. faecium</i> bei verschiedenen Nutztieren im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.			
Spezies	Probiotika- behandlung	Ergebnis	Referenz
Schwein	<i>Ec. faecium</i>	15,6% niedrigere Sterblichkeit	Moen (1982)
Schwein	<i>Ec. faecium</i> 68	53% geringere Sterblichkeit und 10% höheres Gewicht	Untersuchung aus Ne- braska für Joosten´s
Schwein	<i>Ec. faecium</i>	23% weniger Räude; 50% weniger MME (Mastitis-Metritis-Agalaktie)	Swedish Farmers Association (1985)
Schwein	<i>Ec. faecium</i> 68	64,3% weniger Räude	Untersuchung Univ. von Belgrad für Joosten´s
Huhn	<i>Ec. faecium</i> M74	3,53% bessere Futtermittelverwertung	Kumprecht (1985)

2.3.8. Schutz gegen spezifische Krankheiten

Die Anwendung von *Ec. faecium* SF68 stellt bei Durchfall von Kindern und Erwachsenen eine Alternative zur Antibiotikabehandlung dar (Lewenstein et al., 1979; Bellomo et al., 1980). In Doppelblindstudien konnte durch Behandlung mit *Ec. faecium* SF68 die Dauer des Durchfalls und die Zeit bis zur Normalisation des Stuhls signifikant verringert werden (Bellomo et al. 1980).

Loguercio et al. (1987) konnten durch *Ec. faecium* SF68 genauso effektiv wie durch Laktulose den Blutammoniak von Patienten mit hepatischer Enzephalopathie

senken. Außerdem verbesserte sich der geistige Zustand und die psychometrischen Daten der Patienten. *Ec. faecium* SF68 schien durch die Veränderung der Mikroflora des Darmes die für einen hohen Blutammoniakgehalt verantwortlichen Fäulnisbakterien zurückzudrängen.

Die von De Roos und Katan (2000) ausgewerteten Studien zum Einsatz von *Ec. faecium* bei der Senkung des Blutcholesterinspiegels beim Menschen brachten keinen eindeutigen Beweis für die Wirkung des Probiotikum in diesem Zusammenhang.

Underdahl et al. (1982) infizierten in ihrer Studie gnotobiotische Schweine mit zwei *E. coli* Stämmen, die schweren Durchfall und Tod verursachen, und einem *E. coli* Stamm der lediglich Durchfall hervorruft. Mit dem weniger virulenten Stamm infizierte Schweine, die außerdem das Probiotikum *Ec. faecium* cernelle 68 erhielten, entwickelten weniger Durchfall, erholten sich schneller und zeigten höhere Gewichtszunahmen. Die mit den anderen beiden Stämmen infizierten Tiere entwickelten zwar einen geringgradigen Durchfall, aber sie überlebten und nahmen an Gewicht zu, während in der dazugehörigen Kontrollgruppe schwerer Durchfall zu beobachten war und einige Tiere starben.

Spieler (1995) stellte bei seinen Untersuchungen zum Einfluss von *Ec. faecium* cernelle 68 auf die Keimflora beim Schwein eine direkte Verdrängung enteropathogener *E. coli* Stämme durch Konkurrenz um Rezeptorstellen in Frage, postuliert aber die Möglichkeit einer synergistischen Verdrängung der enteropathogenen *E. coli* durch *Ec. faecium* und Typ-I-Fimbrien tragenden *E. coli*.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Versuchsaufbau

Ziel der Versuche war es festzustellen, inwiefern sich die orale Applikation eines Probiotikums bestehend aus *Ec. faecium* auf die Entwicklung und den Gesundheitsstatus von Hundewelpen auswirkt.

Der Versuch wurde mit 12 Beaglewelpen an einem Modell der mutterlosen Aufzucht durchgeführt, das Unsöld (2003) zur Evaluierung der Wirkung probiotischer Substanzen an Hundewelpen besprochen hat.

Die Versuchsdauer betrug für jeden Welpen 14 Wochen. Um die Aufnahme von Kolostrum zu gewährleisten, verblieben die neugeborenen Welpen in den ersten 3 Lebenstagen (Tag 0, 1 und 2) beim Muttertier. Zwei Welpen wurden auch weiterhin zur Mastitisprophylaxe bei der Mutter belassen. Die anderen Welpen wurden am Tag 3 von den Muttertieren getrennt und randomisiert nach Gewicht und Geschlecht den zwei Versuchsgruppen zugeteilt (n=6):

Gruppe 1: Kontrolle, ohne orale Gabe von *Ec. faecium*

Gruppe 2: Orale Gabe von *Ec. faecium* (Konzentration 10^8 KbE pro 100 g Futterrockensubstanz).

Ab Tag 4 erfolgte die Aufzucht mutterlos, es wurde selbsthergestellter Milchersatz gefüttert. Ab der 4. Woche wurde ein kommerzielles Welpenfutter zugefüttert. In der 8. Woche wurden die Welpen abgesetzt, so dass nur noch festes Welpenfutter gefüttert wurde.

Es wurden fortlaufend folgende allgemeine Aufzuchtparameter festgehalten: Gewicht, Futteraufnahme pro Fütterung, Häufigkeit, Menge und Konsistenz des Kotabsatzes.

Folgende klinische Parameter wurden täglich festgehalten: Allgemeinbefinden, Körpertemperatur, auskultatorischer Befund am Atmungsapparat, Farbe der Schleimhäute, kapilläre Füllungszeit, palpatorischer Befund an den Lnn. mandibulares, Befund an Haut und Fell. Außerdem wurde auf sonstige klinische Auffälligkeiten geachtet.

Den Tieren wurde in der 8. und 12. Woche zur Bestimmung einer spezifischen Immunantwort humanes Serumalbumin subkutan appliziert.

Zu folgenden Zeitpunkten wurde von den Tieren Blut für die Bestimmung von Gesamt-IgG und IgA und des antioxidativen Status gewonnen: Tag 3, Tag 7, Tag 14, Tag 28, Tag 56, Woche 10, Woche 12, Woche 14. Ab Tag 56 wurde Blut zur Bestimmung eines roten und weißen Blutbildes gewonnen, ab Woche 10 auch zur Bestimmung der Antikörper gegen hSa.

In folgenden Zeiträumen wurden je eine Kotprobe für die Bestimmung von Laktat und Ammoniak im Kot und eine Probe zur mikrobiologischen Untersuchung gewonnen:

Tag 3-8: Probe zu Versuchsbeginn.

Tag 20-28: Probe im Zeitraum der Fütterung mit Milchaustauscher („Milchaustauscherperiode“)

Tag 48-56: Probe im Zeitraum der Fütterung mit Milchaustauscher und Beifutter („Beifütterung“)

Tag 90-98: Probe im Zeitraum der Fütterung mit Beifutter („Absatzperiode“).

Es wurde Kot für die Bestimmung der Trockensubstanz im Zeitraum von Tag 3 bis Tag 12, danach in wöchentlichen Zeiträumen bis zum Versuchsende asserviert.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Tiere und Tierhaltung

Die Genehmigung zur Durchführung des Tierversuchs wurde von der Regierung von Oberbayern erteilt. Die Untersuchungen wurden an insgesamt 12 Hundewelpen durchgeführt. Davon wurden 6 Welpen der Kontrollgruppe und 6 Welpen der Versuchsgruppe randomisiert nach Gewicht und Geschlecht zugeteilt. Für jede Gruppe waren je 3 männliche und 3 weibliche Tiere Gegenstand der Untersuchungen. Es wurden Welpen aus 4 Würfen in den Versuch genommen, die in Tabelle 9 aufgeführt sind:

Tabelle 9: Daten der Versuchswelpen					
Wurf Nr.	Name	Geschlecht	Gruppe	geboren am	Gewicht Versuchsbeginn (Tag 3)
1	Alina	weiblich	Kontrolle	12.04.02	594
1	Blizzi	weiblich	Kontrolle	12.04.02	626
2	Chiaro	männlich	Kontrolle	29.04.02	544
2	Dingo	männlich	Kontrolle	29.04.02	538
2	Ruffy	männlich	Probiotikum	29.04.02	503
2	Snoopy	männlich	Probiotikum	29.04.02	545
3	Tinka	weiblich	Probiotikum	01.07.02	526
3	Ulyssa	weiblich	Probiotikum	01.07.02	525
4	Merlin	männlich	Kontrolle	03.09.02	528
4	Carmen	weiblich	Kontrolle	03.09.02	471
4	Hannibal	männlich	Probiotikum	03.09.02	526
4	Larissa	weiblich	Probiotikum	03.09.02	476

Die Welpen stammten aus der Zucht der Versuchshundehaltung der Abteilung Vergleichende Medizin des GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg. Die Hunde wurden auf dem Gelände der GSF in einem separaten Hundestall gehalten. Der Hundestall bestand aus 4 separaten Boxen mit

je 8 qm und einem jeweils daran angeschlossenen Auslauf mit 16 qm Fläche. Kontrolltiere und Versuchstiere wurden in separaten Boxen gehalten, so dass ein Kontakt zwischen den Gruppen nicht möglich war. So wurde sichergestellt, dass die Kontrollwelpen weder durch direkten Kontakt, noch durch Futter, Trinkwasser oder Kot mit dem Probiotikum in Kontakt kommen konnten, was zu einer Verfälschung der Untersuchungsergebnisse geführt hätte. Aus selbigem Grund wurden auch Welpen verschiedener Altersgruppen getrennt gehalten. Aus Tierschutzgründen wurden die Welpen mindestens zu zweit gehalten.

Vom Versuchsbeginn bis Tag 14 wurden die Welpen in Wurfkisten mit 0,5 qm Bodenfläche gehalten. Über den Wurfkisten waren Wärmelampen installiert, die eine Umgebungstemperatur von 30° Celsius für die Welpen gewährleisteten. Bis zum Tag 28 wurden die Welpen anschließend innerhalb der Stallboxen gehalten und die Wärmelampen weiterhin beibehalten. Ab Tag 29 war auch der Auslauf für die Tiere zugänglich.

Die Stallboxen wurden außerdem mit Hundedecken und Spielzeug, wie etwa Tennisbällen, Stofftieren, Kartons etc. ausgestattet, um den Welpen ein Ausleben ihres Spiel- und Entdeckungstriebes zu ermöglichen. Außerdem war eine regelmäßige tägliche Beschäftigung der Welpen, auch außerhalb der Fütterungszeiten, durch die betreuenden Doktoranden gewährleistet.

Die Betreuungspersonen hatten außerdem strikt darauf zu achten, dass durch sie keine Keime von außerhalb in die Haltung eingeschleppt wurden und dass es auch zwischen den Gruppen nicht indirekt zu Kontakt über Hände, Kleidung etc. kam.

3.2.2. Fütterung

Es wurde ab einem Alter von 3 Tagen ein selbst hergestellter, bilanzierter Milchersatz gefüttert. Der Milchaustauscher wurde täglich frisch hergestellt. Dazu wurden die Zutaten (beim Milchaustauscher der Versuchsgruppe zusammen mit dem Probiotikum) mit einer Mettler Pk 30 Waage abgewogen, zusammen in das Mischgefäß eines Mixers gegeben (Waring Commercial Blendor 8011 Modell

32BL80, U.S. Pat. 1.89.0436) und mit diesem Gerät so lange gemischt, bis eine homogene Durchmischung der Zutaten gegeben war. Der Milchaustauscher wurde anschließend im Kühlschrank aufbewahrt und zur Fütterung in einem Babykostwärmer (electric® petra Babykost Wärmer Typ BF-1) bis auf 35° erwärmt.

Ab Tag 3 wurden die Welpen alle drei Stunden mit einer Saugflasche für Kleintiere von Karlie® Heintierbedarf GmbH, Haaren, gefüttert, also 8 mal in 24 Stunden. Die Fütterungsfrequenz wurde dann je nach Entwicklungszustand und Befinden der Welpen bis zum Tag 28 kontinuierlich bis auf 4 mal täglich reduziert.

Ab Tag 29 wurde ein kommerzielles Welpenfutter (Pedigree® mit 5 Sorten Geflügel von Masterfoods GmbH, Verden) in zunehmender Menge beigefüttert. Ab diesem Zeitpunkt war es auch möglich die Fütterung aus der Saugflasche durch die Tellerfütterung zu ersetzen.

Ab Tag 57 wurden die Welpen abgesetzt und dann nur noch mit Pedigree® aus Näpfen gefüttert, wobei bei der Versuchsgruppe das Futter mit dem Probiotikum versetzt wurde. Außerdem wurden den Welpen regelmäßig Kauknochen und andere Kauartikel aus Rinderhaut angeboten, um Ihnen eine Befriedigung des natürlichen Kautriebes zu ermöglichen.

3.2.3. Futtermittel und ihre Zusammensetzung

3.2.3.1. Milchaustauscher

Verwendete Zutaten für den Milchaustauscher:

Speisequark Magerstufe „Milchland“ von Milch-Handel und Transport Elbe-Weser GmbH, 27404 Zeven. EU-Betr. Nr.:

D-NI010-EWG 40 %

Eigelb roh aus Eiern von Eierhof Hennes GmbH, 53881 Euskirchen 10 %

H-Milch „Smartprice“ mit 1,5% Fett, homogenisiert, ultrahechoerhitzt, von Wal-Mart Germany GmbH & Co. KG, 42209 Wuppertal, EU-Betr. Nr.:D-RP247-EWG	43 %
Reines Sonnenblumenöl „Smartprice“ von Wal-Mart Germany GmbH & Co. KG, 42209 Wuppertal.	6 %
Mineral- und Vitaminmischung (mit bzw. ohne Probiotikum)	1 %

Zusammensetzung von 100 g der Mineral- und Vitaminmischung:

Mineralien:

CaCO ₃	34,000 g	(entspricht 13,6 g Ca)
Viehsalz	16,200 g	(entspricht 6,2 g Na und 9720 mg Cl)
K-Citrat	11,800 g	(entspricht 4,5 g K)
Mono-Ca(H ₂ PO ₄)+H ₂ O	9,000 g	(entspricht 1,4 g Ca, 2,04 g P)
Mg-oxid	0,5000 g	(entspricht 0,3 g Mg)
Fe-II-Fumarat	0,0610 g	(entspricht 20,13 mg Fe)
KJ	0,0150 g	(entspricht 11,40 mg J)
Cu-acetat	0,1150 g	(entspricht 40,25 mg Cu)
MnSO ₄ +1H ₂ O	0,0065 g	(entspricht 2,11 mg Mn)
Zn-acetat	0,1950 g	(entspricht 70,20 mg Zn)

Vitamine:

Vitamin A, 500000 IE/g	0,0600 g	(entspricht 30 000 IE Vitamin A)
Vitamin B ₂ , 80%	0,0650 g	(entspricht 52,0 mg Vitamin B ₂)
Vitamin B ₆ , 99%	0,0850 g	(entspricht 69,7 mg Vitamin B ₆)
Biotin, 2%	0,0250 g	(entspricht 500 µg Biotin)
Nikotinsäure, 100%	0,1000 g	(entspricht 100,0 mg Nikotinsäure)
Ca-Panthothenat	0,0050 g	(entspricht 5 mg Panthothensäure)

Stärke	27,7675 g
--------	-----------

Nährstoffgehalt des Milchaustauschers pro 100 g uS berechnet aus den Angaben über die Inhaltsstoffe der Zutaten (Meyer und Heckötter, 1986):

Trockensubstanz 21,80 g ; Rohasche 1,676 g; Rohprotein 9,562 g; Rohfett 7,343 g; N-freie Extraktstoffe 3,214 g; Rohfaser 0 g; Bruttoenergie 0,4945 MJ; verdauliches Rohprotein 7,376 g; verdauliche Energie 0,526 MJ; Linolsäure 0,672 g; verdauliches Rohprotein / verdauliche Energie 21,67 g/MJ.

3.2.3.2. Beifutter

Zusammensetzung von Pedigree®, 5 Sorten Geflügel laut Herstellerangaben:

Fleisch und tierische Nebenerzeugnisse vom Geflügel und Schwein (5 Sorten Geflügel à jeweils: mindestens 4%), Getreide, Öle und Fette, Mineralstoffe, pflanzliche Nebenerzeugnisse, pflanzliche Eiweißextrakte, Zucker.

Inhaltsstoffe (%): Rohprotein: 8,0; Rohfett: 6,0; Rohasche: 3,0; Rohfaser: 0,4; Feuchtigkeit: 80,0.

Zusatzstoffe: Vitamin D: 150 IE/kg, Vitamin E: 100 mg/kg, Kupfer: 2,5 mg/kg, Biotin: 450 µg/kg

Zusammensetzung von Pedigree®, 5 Sorten Geflügel nach Eigenanalyse:

Inhaltsstoffe (Weender Analyse, Angaben in % uS):

TS (lyophilisiert): 21,0 %; TS (gemahlen): 20,0 %; Rohprotein: 7,6; Rohfett 5,8; Rohasche: 2,8; Rohfaser: 0,24.

Analyse von Mineralien und Spurenelementen (Angaben pro kg Trockensubstanz):

Ca: 21,59 g; P: 15,24 g; K: 9,63 g; Na: 11,38 g; Zn: 182,72 mg; Cu: 15,30 mg; Mg: 945,18 mg; Fe: 125,19 mg; Mn: 30,42 mg.

3.2.4. Probiotikum

3.2.4.1. Qualitative und quantitative Zusammensetzung nach Herstellerangaben

Wirkstoff: Enterococcus faecium DSM 7134: 21%,
entsprechend einer minimalen Aktivität von 1×10^{10}
KbE/g.

Sonstige Bestandteile: Süßmolkenpulver 35 %
Lactose 35 %

Verunreinigungen: E. coli nicht nachweisbar, Pilze nicht nachweisbar.

Unerwünschte Stoffe: maximale Gehalte an Schwermetallen in µg/kg:
Arsen: nicht nachweisbar
Blei: 60 ± 3
Cadmium: 7 ± 2
Chrom: 58 ± 5
Quecksilber: 10 ± 1

3.2.4.2. Spezifizierung des Wirkstoffes

Bezeichnung und taxonomische Beschreibung:

Enterococcus faecium (DSM 7134): Familia Streptococcaceae, Genus Enterococcus,
Spezies Enterococcus faecium.

Stammsammlung und Hinterlegungsnummer:

DSZM, D-Braunschweig

Enterococcus faecium GHR 017 DSM 7134

genetische Veränderungen: Die Stämme wurden genetisch nicht verändert.

3.2.4.3. Technologische Angaben

Stabilität des Erzeugnisses:

Gegenüber atmosphärischen Einwirkungen ist der Zusatzstoff bei 4°C über mindestens 12 Monate und bei 20°C über mindestens 6 Monate stabil. Die Wirkstoffe sind im sauren pH-Bereich stabil. Gemessen im flüssigen Medium pH-Bereich 3,6 – 6,8.

Bei der Herstellung von Vormischungen und Futtermitteln sowie beim Einmischen im Milchaustauscher, im Mineralfutter, im Ergänzungsfuttermittel und im Alleinfuttermittel tritt kein Aktivitätsverlust auf. Das Anrühren mit warmem Wasser (Anrührtemperatur 40°C) hat keinen Einfluss auf die Aktivität. Das Probiotikum ist nicht geeignet zur Pelletierung.

Bei der Lagerung von Vormischung, im Milchaustauscher sowie im Mineralfutter ist bei einer vorgegebenen Lagertemperatur von 20°C eine Stabilität von mindestens 6 Monaten, im Ergänzungsfuttermittel von mindestens 4 Monaten sowie im Alleinfuttermittel von mindestens 2 Monaten gegeben.

Herstellungsprozess und Qualitätskontrolle:

Durch das Zurückgreifen auf eine master cell bank und eine working cell bank wird ein hoher Reinheitsgrad gewährleistet bzw. ist durch eine Reduktion der Anzahl der Generationen eine Voraussetzung für die genetische Stabilität des Produktes während der Fermentation gegeben. Die master cell bank wird in regelmäßigen Abständen überprüft (alle 6 Monate). Die working cell bank wird alle 6 Monate erneuert.

Überwachung:

Die Überwachung erfolgt in Form einer Bestimmungsmethode für *Ec. faecium*. Diese Methode hat zum Ziel, nicht nur eine sichere Keimzählung von Milchsäurebakterien unter Eliminierung des schädlichen Einflusses von Spurenelementen, sondern auch eine Differenzierung der beiden Stämme vornehmen zu können. Intraspezifisch werden beide Stämme von anderen Stämmen durch die Resistenzsituation gegenüber Antibiotika, mit Hilfe einer Aufspaltung der chromosomalen DNA mit Pulsfeldgelelektrophorese sowie mit der Gensondentechnik im RAPD- Verfahren unterschieden.

3.2.5. Allgemeine Aufzuchtdata

Das Gewicht der Welpen wurde täglich durch Wiegen auf einer Mettler PK 30 Waage festgestellt. Die aufgenommene Futtermenge wurde bis zum Absetzen durch Wiegen der Welpen vor und nach der Fütterung bestimmt, nach dem Absetzen wurde dies durch Abwiegen der entsprechenden Futtermenge bewerkstelligt.

Es wurde versucht Häufigkeit, Menge und Konsistenz des Kotabsatzes bis zum Tag 28 für jeden Welpen einzeln zu notieren, was wegen der eingeschränkten Bewegungsfähigkeit der Tiere auch gut möglich war, trotzdem konnte nicht jeder Kot dem jeweiligen Welpen zugeordnet werden. Ab Tag 29 war es nur noch möglich für die jeweilige Gruppe die Kotparameter zu notieren, da eine Zuordnung des Kotes zum einzelnen Welpen wegen der Fähigkeit der Welpen sich in diesem Alter beliebig fortzubewegen nicht mehr möglich war. Die Menge des Kotes wurde in g angegeben, die Konsistenz wurde in 4 Kategorien eingeteilt: geformt (1), dickbreiig (2), dünnbreiig (3), suppig/wässrig (4).

Außerdem wurde der Zeitpunkt notiert, zu dem die Welpen die Augen erstmals öffneten.

3.2.6. Klinische Parameter

Im folgenden aufgeführte klinische Parameter wurden täglich bei den Welpen bestimmt und notiert.

Das Allgemeinbefinden wurde bis Tag 28 durch Beurteilung von Muskeltonus, Sauglust, Bewegungsverhalten und Habitus bestimmt. Ab Tag 29 waren Aufmerksamkeit, Laufaktivität und Fresslust ausschlaggebend. Das Allgemeinbefinden wurde mit „gut“, „mäßig“ oder „schlecht“ bewertet.

Die Körpertemperatur wurde rektal mit einem Digital Classic Thermometer von Hartmann bestimmt und mit dem physiologischen Sollwerten der jeweiligen Altersgruppen verglichen.

Die Lunge wurde mit einem Littmann™ Pediatric Stethoskop von 3M auskultiert, um eine eventuelle Aspiration von Milchaustauscher, wie sie bei Flaschenfütterung vorkommen kann, rechtzeitig zu erkennen und damit einer Pneumonie vorzubeugen. Ein fein vesikuläres Lungengeräusch mit bronchialem Anteil wurde als physiologisch bewertet, rasseln, giemen oder gurgeln wären Hinweise auf eine pathologische Veränderung der Lunge gewesen.

In den ersten 10 Lebenstagen wurde die Farbe der Haut und die kapilläre Füllungszeit an den Ballen der Pfoten beurteilt. Später wurden beide Parameter an den Schleimhäuten des Zahnfleisches bestimmt. Eine rosa Haut- bzw. Schleimhautfarbe wurde als physiologisch angesehen, und sprach für eine ausreichende Menge an roten Blutkörperchen im Zirkulationssystem, eine ausreichende Sauerstoffversorgung und einen funktionierenden Metabolismus. Ebenso wurde eine kapilläre Füllungszeit unter 2 Sekunden, die für einen stabilen Kreislaufzustand spricht, als physiologisch angesehen. Farbabweichungen an Haut und Schleimhaut bzw. eine erhöhte kapilläre Füllungszeit waren als pathologisch zu bewerten.

Die Lymphonodi mandibulares wurden palpatorisch auf ihre Größe hin untersucht. Vergrößerte Lymphknoten in diesem Bereich gaben Hinweise auf eine verstärkte Immunreaktion des Körpers auf Antigene.

Haut und Fell wurden adspektorisch untersucht. Eine glatte, rosa Haut und ein glattes, glänzendes Fell wurden als physiologisch beurteilt. Veränderungen der Hautfarbe und des Hautbildes sowie struppiges, glanzloses Fell und Alopezie wären Hinweise auf pathologische Vorgänge gewesen.

Es wurden außerdem auf sonstige klinische Auffälligkeiten an den Welpen geachtet und diese notiert.

3.2.7. Routinemäßige Entwurmung

Die Entwurmung erfolgte mit Banminth® Paste (Wirkstoff:Pyrantel) von Pfizer GmbH, Karlsruhe in der Dosierung 5 mg Pyrantel-Base pro kg Körpergewicht.

Zusammensetzung der Banminth-Paste:

Pyrantelemonat	21,62 mg	(entspricht 7,5 mg Pyrantel)
Methyl-4-hydroxybenzoat	0,80 mg	
Propyl-4-hydroxybenzoat	0,20 mg	
Bronopol	0,10 mg	

Die Welpen wurden ab einem Alter von 14 Tagen in wöchentlichen Abständen und ab einem Alter von 10 Wochen in 14-tägigen Abständen entwurmt.

3.2.8. Immunisierung

Die Tiere wurden an Tag 56 und Tag 84 mit hSa 97-99%, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim immunisiert. Eine Impfdosis wurde wie folgt hergestellt: 10 µg gefriergetrocknetes hSa wurde mit einer SARTORIUS Waage bis auf 4

Kommastellen genau abgewogen. Daraufhin wurde es mit 250 µl des Adjuvans PCSL (0,1%-ige Lösung in PBS mit ph 7,4) versetzt und darin durch Vermischung mit einem Vortex Schüttler gelöst. Anschließend wurden dazu noch 750 µl PBS mit ph 7,4 gegeben. Die Impfdosis wurde in einer 2 ml Einwegspritze aufgezogen. Mit einer auf die Spritze aufgesetzten Kanüle (Neolus 0,7 x 30 mm, steril, 6% Luer REF: NN-2232R35 von TERUMO®) wurde die Haut an der rechten Brustwand durchstoßen und die Impfdosis subkutan appliziert.

Die Tiere wurden außerdem zum Infektionsschutz an Tag 56 und Tag 84 mit dem Impfstoff Virbagen®-Canis SH_{A2}P von VIRBAC, Bad Oldesloe immunisiert. Der Impfstoff enthält attenuierte Erreger der caninen Staupe, der Parvovirose und der Hepatitis contagiosa canis. Die Applikation erfolgte subkutan an der linken Brustwand.

3.2.9. Tätowierung

Die für Versuchstiere vorgeschriebene Tätowierung an beiden Ohren wurde bei den Welpen im Alter von acht Wochen durchgeführt.

3.2.10. Blutgewinnung

Das Blut wurde grundsätzlich zu den unter Punkt 3.1. erwähnten Zeitpunkten aus der Vena cephalica antebrachii entnommen, die Blutgewinnung war dabei immer ohne Probleme durchführbar. Es konnten bei den 3 Tage alten Welpen immer mindestens 60 µl Blut gewonnen werden, mit steigendem Alter stieg auch die Menge des zu gewinnenden Blutes an, maximal wurden 5 ml Blut pro Entnahme gewonnen.

Zuerst wurden in der Entnahmeregion dorsomedial am Unterarm mittels Schermaschine (Oster® Golden A5, Modell 5-50C, Scherblatt Oster® Cryotech TM 1/20 mm Size 50), die Haare gekürzt. Anschließend wurde der Unterarm mittels eines mit Wasser befeuchteten Tupfers gesäubert. Eine Reinigung mit desinfizierenden Mitteln wurde vermieden, da ein Kontakt des Desinfektionsmittels

mit Blut zur Hämolyse geführt hätte, und somit die Proben zur Serumgewinnung unbrauchbar gewesen wären.

Die Vene wurde mit einem Schlauch in der Ellenbeuge gestaut und mit einer Kanüle (Neolus 0,7 x 30 mm, steril, 6% Luer REF: NN-2232R35 von TERUMO®) punktiert. Bis zum Tag 28 wurde das aus dem Konus der Kanüle austretende Blut mit einem System zur Kapillarblutgewinnung (Microvette® 200 LH, No./REF 20.1292 von Sarstedt AG, Nürnberg) aufgefangen.

Ab Tag 56 war es möglich das Blut dann mit einem Blutröhrchen (Röhre 4 ml, 75x12 mm, No./REF 36.336 von Sarstedt AG, Nürnberg) aus der mit der Kanüle punktierten Vene aufzufangen, da ab diesem Zeitpunkt ein ausreichender Blutfluss aus der Vene gegeben war.

Ab Tag 56 wurde außerdem eine zusätzliche Probe EDTA-Blut zur Bestimmung des Blutbildes gewonnen. Dazu wurde Blut in einem Blutröhrchen (Röhre 2 ml, 55x12 mm, Kalium-EDTA, 1,6 mg EDTA/ml Blut, No. REF 38.346 von Sarstedt AG, Nürnberg) aufgefangen.

3.2.11. Blutuntersuchungen

3.2.11.1. Blutbild

Die EDTA-Blutproben wurden mittels eines Celdyn® Automaten (Adaptierter Programmmodus für Hundeblood) an der 1. Medizinischen Tierklinik der Universität München ausgewertet. Folgende Parameter wurden gemessen: Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), Thrombozyten, Leukozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten.

3.2.11.2. Immunglobuline

3.2.11.2.1. Aufbereitung und Verarbeitung der Proben

Im Rahmen der Serumgewinnung für die Immunologie wurde das gewonnene Blut 10 Minuten stehen gelassen und daraufhin 10 Minuten bei 3000 U/min. in einer Heraeus Sepatech® Zentrifuge zentrifugiert. Aus dem so gewonnenen Überstand wurden 1:100 verdünnte Serumproben für die Immunologie gewonnen:

Es wurden 990 µl PBS mit pH 7,2 in Eppendorf Cups vorgelegt. Anschließend wurden 10 µl Serum dazu pipettiert. Die Eppendorf Cups wurden anschließend bei –80°C bis zur Auswertung eingefroren. Einschließlich Tag 56 wurden pro Tier und Blutentnahmezeitpunkt 2 Proben hergestellt, bei den Proben ab Woche 10 wurden pro Tier und Blutentnahmezeitpunkt 6 Proben hergestellt.

Überschüssiges Serum wurde in Eppendorf Cups bei –80° C eingefroren, um eine Reserve für die Probenauswertung zu besitzen.

3.2.11.2.2. Analyse der Immunglobuline mittels ELISA

Alle zu den Blutentnahmezeitpunkten entnommenen Proben wurden auf ihren Gesamtgehalt an Immunglobulin G und Immunglobulin A untersucht. Hierzu wurde die von Erhard et al. (1995) beschriebene Methode zur Konzentrationsbestimmung von bovinem IgG für Hunde modifiziert angewandt. Außerdem wurden die Proben ab Woche 10 auf ihren spezifischen Antikörpergehalt gegen hSa untersucht. Da ein Standard für hSa Antikörper beim Hund nicht verfügbar war, erfolgte lediglich ein Vergleich der Extinktionen, die mit der Konzentration an hSa proportional waren.

Herstellung von Puffern und Lösungen:

PBS: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit folgender Zusammensetzung:

8,00 g Natriumchlorid

1,45 g	Di-Natriumhydrogenphosphat – Dihydrat
0,20 g	Kaliumdihydrogenphosphat
0,20 g	Kaliumchlorid
ad 1000 ml	Aqua bidest.

Zur Herstellung von PBS-Tween (pH 7,2) wurde zusätzlich 500 µl Tween 20 zugesetzt.

Beschichtungspuffer: Carbonatpuffer pH 9,6 mit folgender Zusammensetzung:

3,11 g	Natriumcarbonat
6,00 g	Natriumhydrogencarbonat
ad 1000 ml	Aqua bidest.

Waschpuffer: PBS-Tween

TMB-Puffer: Natriumacetat-Citrat-Puffer pH 5,0 mit folgender Zusammensetzung:

8,20 g	Natriumacetat
3,15 g	Citronensäure
ad 1000 ml	Aqua bidest.

Stammlösung: Tetramethylbenzidin-Lösung mit folgender Zusammensetzung:

0,06 g	Tetramethylbenzidin
10 ml	Dimethylsulfoxid

Substratlösung mit folgender Zusammensetzung:

332 µl	Stammlösung
10,0 ml	TMB-Puffer
3,00 µl	30% H ₂ O ₂

Stoppreagenz: 1-molare Schwefelsäure pH 1 mit folgender Zusammensetzung:

472 ml	Aqua bidest.
28 ml	96%ige Schwefelsäure

Soweit nicht anders aufgeführt sind alle Chemikalien von der Fa. Merck, Darmstadt.

Durchführung der immunologischen Bestimmungen:

a.) Beschichtung (Tag 1):

An 96-Loch-ELISA-Platten aus Polystyrol (Maxisorb, Nunc®, Wiesbaden) wurden die Antikörper gegen IgA (caprine IgG-Antikörper Aal gegen Hunde-IgA in PBS, 1mg IgG/ml von Serotec, Kidlington, Oxford, UK) bzw. IgG (caprine IgG-Antikörper Aal gegen Hunde-IgG in PBS, 1mg IgG/ml von Serotec, Kidlington, Oxford, UK) fixiert. Die Konzentration betrug 5 µg Antikörper pro ml Beschichtungspuffer. In jede Kavität der Platte wurden 100 µl pipettiert, die Platten wurden mit Parafilm überzogen und anschließend über Nacht (18 h) bei + 4 °C inkubiert.

b.) Waschvorgang (Tag 2):

Nach zweimaligem Waschen der Platten mit PBS-Tween in einem mechanischen Wascher (EL_x 405 Auto Plate Washer, Bio-Tek Instruments Inc.), wurden diese anschließend auf Zellstoff zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft.

c.) Blockierung:

0,5%ige Gelatine (100 mg in 20 ml PBS (pH=7,2), Serva Heidelberg) wurde zur Herstellung einer 0,5%igen Lösung auf der Heizplatte in PBS gelöst. Um die freien Bindungsstellen der Platten zu blockieren, wurden in jede Kavität 200 µl dieser Lösung pipettiert und die Platte danach bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

d.) Waschvorgang: wie unter Punkt 2 beschrieben

e.) Auftragen der Proben:

Die 1:100 vorverdünnten Serumproben wurden mit PBS-Tween auf die Endverdünnungen 1:5000 bei IgG, 1:1000 bei hSa und 1:200 bei IgA verdünnt und 100 µl je einer Probe in die oberste Kavität (Kavität A) der Spalten 2-5 und 7-12 der Platten aufgetragen. Kavität A der Spalte 6 wurde als Standard für die IgG und IgA Bestimmung mit Canine Immunoglobulin Reference Serum (Cat Nr. RS10-105, Lot Number: RS10-105-3, von Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) in einer Konzentration von 2 µg/ml beschickt. Für die hSa-Bestimmung war kein Referenzserum verfügbar. In jeder Spalte wurde daraufhin eine zweierlogarithmische

Verdünnungsreihe so angelegt, dass am Ende jede Vertiefung mit 50 µl beladen war (Vorlegevolumen 50 µl). Danach wurden die Platten mit Parafilm abgedeckt. Es folgt wiederum 1 Stunde Inkubation bei 37°C.

f.) Waschvorgang: wie unter Punkt 2 beschrieben

g.) Hinzufügen des Konjugats:

Als Konjugat wurde an Peroxidase gekoppeltes Ziegen-anti-Hund-IgA (Aal 31P goat-anti-canine-AgA: HRP, purified IgG conjugated to horseradish peroxidase, 1,0 mg/ml) bzw. Kaninchen anti-Hund IgG (rabbit-anti-dog IgG, whole molecule, peroxidase conjugate, affinity isolated antibody, A6792) von Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri in einer Konzentration von 1:50 000 verwendet. Davon wurden je 100 µl in jede Kavität pipettiert. Die Platten wurden wiederum mit Parafilm überzogen und 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

h.) Waschvorgang: wie unter Punkt 2 beschrieben

i.) Hinzufügen des Substrats:

100 µl der oben beschriebenen Substratlösung wurde in jede Kavität der Platte pipettiert und diese anschließend für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

j.) Stoppen der Reaktion:

Die Reaktionsvorgänge wurden durch Zugabe von 50 µl einer 1-molaren Schwefelsäure beendet.

k.) Auswertung:

Im ELISA-Reader (EAR 400 AT, SLT-Labinstruments, Overath) wurde die Farbintensität bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten gemessen. Mit Hilfe eines Computerprogramms (Easyfit, SLT) wurde die Standardkurve bestimmt und die Ergebnisse der einzelnen Verdünnungen im linearen Bereich der Standardkurve auf die Ursprungskonzentration zurückgerechnet. Der Mittelwert der

Einzelkonzentrationen ergab dann die Endkonzentration in mg Immunglobulin pro ml Serum. Bei der Bestimmung der Antikörper gegen hSa fehlte der genormte Standard. Es wurden lediglich die mit der Konzentration an hSa proportionalen Werte der im ELISA-Reader gemessenen Extinktionen verglichen.

3.2.11.3. Antioxidativer Status

Der antioxidative Status wurde durch Charakterisierung der Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), sowie der antioxidativ wirksamen Vitamine E und C und der Metaboliten Harnsäure und Bilirubin, sowie freies Eisen, Laktat, CK und GOT im Blut am Institut für Physiologie und Physiologische Chemie, Veterinärstr. 13, München, unter der Leitung von Herrn Dr. Stohrer bestimmt. Die Untersuchungen und Auswertungen wurden von Frau Julia Schwarzer durchgeführt und werden im Rahmen ihrer Inaugural-Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München (2003) veröffentlicht.

3.2.12. Kotuntersuchungen

3.2.12.1. Trockensubstanz im Kot

Bis Tag 28 war es möglich von den Einzeltieren getrennt Kot zu sammeln. Danach machte es die Tatsache dass die Tiere sich viel fortbewegen und an unterschiedlichsten Stellen Kot absetzen notwendig, die Kotproben zu Sammelproben der jeweiligen Versuchs- und Altersgruppe zusammenzufassen, da eine Zuordnung des abgesetzten Kotes zu einem Hund kaum mehr möglich war. Es wurde in den Zeiträumen eine repräsentative Kotmenge gesammelt und nicht die vollständige Kotmenge asserviert. Die Kotproben wurden bei -20° C eingefroren.

Die gefrorenen Proben wurden in offene Plastikbecher, deren Leergewicht vorher bestimmt wurde, gegeben. Anschließend wurde das Gesamtgewicht von Becher und Kotprobe notiert. Die Becher wurden anschließend in einen Trockenschrank gegeben, der mit einer Temperatur von 100° beheizt wurde, und dort bis zur

vollständigen Verdunstung des Wassers aus dem Kot für 48 Stunden belassen. Darauf wurden die Proben für 60 Minuten in einen Exsikkator verbracht und anschließend gewogen und der prozentuale Anteil Trockensubstanz am Kot ermittelt.

3.2.12.2. Mikrobiologische Kotuntersuchung

3.2.12.2.1. Aufbereitung und Verarbeitung der mikrobiologischen Kotproben

Eine mikrobiologische Kotuntersuchung wurde in den unter Punkt 3.1. genannten Zeiträumen bei jedem Welpen am Institut für Tierhygiene, Schwere-Reiter-Str. 9, München durchgeführt. Die Kotproben wurden auf ihre aerobe Gesamtkeimzahl und sowohl qualitativ als auch quantitativ auf *E. coli*, Enterokokken, Laktobazillen und Clostridien untersucht.

Der frisch abgesetzte Kot wurde sofort in sterilen Kotröhrchen asserviert und folgendermaßen nach spätestens 60 Minuten für die mikrobiologische Untersuchung aufgearbeitet:

Es wurden 1,00 g Kot in einer sterilen Petrischale abgewogen und anschließend darin mit 2 ml steriler Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Darauf wurde die Kotsuspension mit einer sterilen Pipette in ein steriles Glasröhrchen mit weiteren 7 ml steriler Kochsalzlösung pipettiert wodurch eine Verdünnung von 1:10 entstand. Für weitere Verdünnungsschritte wurde je ein Milliliter aus der niedrigeren Verdünnungsstufe in ein mit 9 ml steriler Kochsalzlösung beschicktes Röhrchen pipettiert und vermischt.

Abhängig von der erwarteten Keimzahl wurden für die einzelnen Untersuchungen je folgende Verdünnungen verwendet:

Gesamtkeimzahl	1:100.000 bis 1:10 Milliarden
<i>E. coli</i>	1:10.000 bis 1:1 Milliarde
Enterokokken	1:10.000 bis 1:1 Milliarde
Laktobazillen	1:1000 bis 1:100 Millionen

Clostridien

1:1 Millionen bis 1:10 Milliarden

3.2.12.2.2. Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl

Je 0,1 ml der oben genannten Verdünnungsstufen wurden unter sterilen Bedingungen auf Casein-Pepton-Sojamehl-Platten verbracht, dort ausgestrichen und bei 38° unter aeroben Bedingungen für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und aus deren Anzahl die KbE pro g Kot bestimmt.

3.2.12.2.3. Qualitative und quantitative Bestimmung von Escherichia coli

MacKonkey Platten (Fleischpepton, Casein, Lactose, Agar-Agar, Gallensalze, Neutralrot, Kristallviolett) wurden mit je 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungen beschickt. Die ausgestrichenen Platten wurden bei 38° für 24 Stunden bebrütet und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um E. coli Kolonien handelt wurden außerdem noch folgende Untersuchungen durchgeführt:

Die Kolonien wurden nach Gram gefärbt, die gramnegativ reagierenden Stäbchen anschließend auf Standard-I-Agar verimpft und bei 38° für 24 Stunden inkubiert. Die aus dieser Bebrütung hervorgegangenen Kolonien wurden anschließend auf Oxidasebildung untersucht (Oxidasestäbchen Baktident®, Oxidase von Merck, Darmstadt). Anschließend wurde ein Enterotube II BBL (Becton Dickison, Reutlingen) mit einer oxidasenegativen Kolonie beschickt und wiederum für 24 Stunden bei 38° inkubiert. Für die Indolreaktion musste dem Enterotube das Kovacs-Reagenz zugegeben werden, für die Volges-Proskauer-Reaktion VPI (KOH) und VPI2 (alpha-Naphtol), alle anderen Reaktionen liefen im Enterotube spontan ab. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des beiliegenden Differenzierungsschemas, das positive Reaktionen im Enterotube mit einer bestimmten Zahl bewertet, welche addiert zur Identifikation des Keimes führen.

3.2.12.2.4. Qualitative und quantitative Bestimmung von Clostridien

Mit den jeweiligen Verdünnungen beschickte RCM Platten (Pepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt, Stärke, Glucose, Salz, Natriumacetat, Cysteiniumchlorid, Agar-Agar und Polymyxin B) wurden bei 38°C im Anaerobiertopf mit Anaerocult A (Merck® Darmstadt) für 48 Stunden inkubiert. Wie bei den Enterokokken wurde auf Katalaseaktivität untersucht, da Clostridien ebenfalls Katalase-negativ sind. Die auf den RCM-Platten gewachsenen Kolonien wurden zur Vorbereitung auf das API-20A-System (Biomérieux, Nürtingen) auf zwei Blutplatten verimpft und sowohl aerob als auch anaerob für 24 Stunden bebrütet. Anhand dieser Methode lassen sich Bazillen unter den gewachsenen Keimen identifizieren, die im Gegensatz zu Clostridien auch unter aeroben Bedingungen wachsen.

Alle ausschließlich auf der anaerob bebrüteten Platte gewachsenen Keime wurden auf das API-20A-System übertragen, dort 24 Stunden bebrütet, anschließend mit den vorgeschriebenen Reagenzien versehen und mittels eines Computerprogramms ausgewertet.

3.2.12.2.5. Qualitative und quantitative Bestimmung von Enterokokken

Die Verdünnungen wurden jeweils auf CNA-Medium (Pepton, Herzpeton, Hammelblut, Hydrolysat pflanzlicher und tierischer Proteine, Maisstärke, Agar-Agar, NaCl, Antibiotikummischung) aufgebracht. Nach Bebrütung für 24 Stunden bei 44°C wurde zur sicheren Identifikation der Kolonien ebenfalls eine Gramfärbung angefertigt, die grampositiven Bakterien auf Standard-I-Agar verimpft und 24 Stunden bei 38° inkubiert. Beim anschließenden Katalasetest wurde eine Kolonie mit einem Tropfen 3%iger H₂O₂ auf einem Objektträger verrieben. Eine Blasenbildung darf bei den katalasenegativen Enterokokken nicht beobachtet werden.

Weiterhin wurden die Kolonien nun ausgezählt und zur weiteren Identifikation für das API-20-Strep-System (Biomérieux, Nürtingen) vorbereitet. Dazu wurde eine Kolonie

in 300 µl sterilem Wasser suspendiert und die Suspension auf eine Hammelblutplatte gegossen, die anschließend für 24 Stunden bei 44°C bebrütet wurde. Die gewachsenen Kolonien wurden mit einem Tupfer, in sterilem Wasser suspendiert und (partiell erst nach Übertragung in ein API-GP-Medium) auf das API-System verbracht. Nach vierstündiger aerober Bebrütung erfolgte die Auswertung durch ein computergestütztes API-Auswertungsprogramm. Wenn diese Auswertung kein eindeutiges Ergebnis lieferte, wurde nach weiterer 20-stündiger Bebrütung eine zweite vorgenommen.

3.2.12.2.6. Qualitative und quantitative Bestimmung von Laktobazillen

Rogosa-Agar (Pepton, Glucose, Hefeextrakt, Ammoniumcitrat, Kaliumhydrogenphosphat, Tween® Natriumacetat, Eisensulfat, Magnesiumsulfat, Mangansulfat) wurde mit den jeweiligen Verdünnungen der mikroaerophilen Laktobazillen beschickt und anschließend 72 Stunden lang im Anaerobiertopf mit Anaerocult C® (Merck, Darmstadt) bei 38°C bebrütet. Sämtliche gewachsenen Kolonien wurden dann mit einem Tupfer abgenommen und in 2 ml sterilem Aqua. dest. suspendiert. Von dieser Suspension wurden einige Tropfen in eine Ampulle Suspensionsmedium übertragen. Die Trübung entsprach Mc Farland 2. Die doppelte Anzahl der oben verwendeten Tropfen wurde in eine Ampulle API 50 CHL Medium verbracht und dieses anschließend auf ein mit Paraffinöl überschichtetes API-50-System verimpft. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 38°C wurde mittels eines Computerprogramms die Keimzahl bestimmt.

3.2.12.3. Bestimmung von L-Laktat aus dem Kot

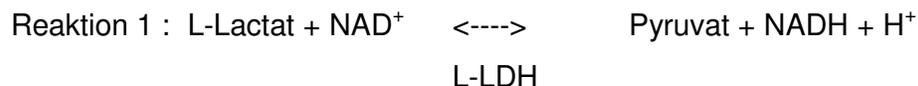
Im Darm kann es zur Metabolisierung von Milchsäure durch laktatkonsumierende Bakterien kommen, außerdem wird Milchsäure durch laktatbildende Bakterien produziert. Um eine durch Zulage des Probiotikums hervorgerufene Nettozunahme bzw. Abnahme des Laktatgehaltes im Kot zu evaluieren, wurde dieser Parameter bestimmt.

3.2.12.3.1. Aufbereitung und Verarbeitung der Proben

Für jede Probennahme wurde aus frisch abgesetztem Kot 1 Aliquot abgewogen, in ein Plastikröhrchen gegeben und mit 10 Teilen 0,6 molarer Perchlorsäure versetzt. Anschließend wurde das Plastikröhrchen verschlossen und Kot und Säure unter Schütteln suspendiert. Darauf hin wurde die Probe bei 3000 U/min. für 10 min. zentrifugiert. Je 1 ml des Überstandes des Zentrifugates wurden in je ein Eppendorf Cup abpipettiert, so dass zwei Proben entstanden. Die Proben wurden anschließend bei -80° bis zur Probenauswertung eingefroren.

3.2.12.3.2. Auswertung der Proben

Die Proben wurden nach dem Prinzip ausgewertet, dass L-Laktat in Gegenwart von L-Laktat-Dehydrogenase(L-LDH) durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) zu Pyruvat oxidiert wird (Reaktion 1).



Da das Gleichgewicht der Reaktion auf Seite des Laktats liegt, ist es notwendig, dass Pyruvat mittel des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat weiterreagiert (Reaktion 2) und so das Gleichgewicht von Reaktion 1 auf die Seite des Pyruvats verschoben wird.



Folgende Chemikalien wurden zur Laktatbestimmung hergestellt und verwendet:

- Natronlauge 8%
- Glycylglycinpufferlösung (Glycylglycin 9%, L-Glutaminsäure 1,5% in Aqua)

- bidest.)
- Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Lösung (3,5% β -NAD*H₂O, lyophilisierte freie Säure, w (Massenanteil) > 98% in Aqua bidest.)
 - Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Lösung (1% GPT aus Schweineherz (E.C.2.6.1.2.) in Ammoniumsulfatlösung (Konzentration 3,2 mol/l)).
 - L-Lactat-Dehydrogenase-Lösung (1% L-LDH aus Schweinemuskel (E.C. 1.1.1.27) in Glycerin-Wasser Mischung (Massekonzentration 50g/100ml)).

Die Messung erfolgte in einem Genesys 10 UV Photometer (Firma ThermoSpectronic, Rochester NY, USA) bei einer Wellenlänge von 365 nm. Die Temperatur betrug 22°C, die Messung erfolgte gegen einen Leerwert. Proben und Leerwert wurden nach folgendem Schema mit den Reagenzien in Einmalküvetten (Plastibrand®, 2,5 ml Makro, 1 cm Schichtdicke, Abmessung 12,5x12,5x45 mm, Cat No. 759005) pipettiert:

Tabelle 10: Pipettierschema der Reagenzien zur Laktatbestimmung		
	Leerwert	Probe (doppelt)
Glycylglycinpuffer	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
Aqua bidest.	0,500 ml	0,450 ml

Die Reagenzien wurden mit einem Rührspatel gemischt, nach ca. 5 min. wurden die Proben gegen den Leerwert gemessen und so der Probenleerwert bestimmt. Anschließend wurden Leerwert und Proben mit 0,010 ml L-LDH versetzt, gemischt und nach Ablauf der Reaktion (30 Minuten Wartezeit) wurden die Proben wiederum gegen den Leerwert gemessen und so der Probewert bestimmt. Bei jeder Probe wurde anschließend der Probenleerwert vom Probenwert subtrahiert und so der Extinktionskoeffizient DeltaE errechnet.

Die Laktatkonzentration wurde nun mittels folgender Formel errechnet:

$$c = (V \times MG \times \Delta E) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$$

- c = Laktatkonzentration [g L-Lactat/l]
V = Testvolumen [ml] (hier: 1,120)
MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol] (hier: 89,1 für L-Lactat)
DeltaE = Extinktionskoeffizient der Probe
 ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH [l/(mmol*cm)] bei 365 nm (hier: 3,4)
d = Schichtdicke [cm] (hier: 1)
v = Probevolumen [ml]. (hier: 0,050)

Der erhaltene Wert von g L-Lactat pro Liter bezieht sich in diesem Fall auf 1000 ml Perchlorsäure/Kot Gemisch im Verhältnis 1g Kot zu 10,25 g Perchlorsäure. Es ist sinnvoll diesen Wert auf g Laktat pro kg Kot umzurechnen. Der Gewichtsanteil des Kotes beträgt im Gemisch 8,88%. Somit muss man den Messwert mit dem Faktor 11,25 multiplizieren um auf den Laktatwert in g pro kg Kot zu kommen.

3.2.12.4. Bestimmung von Ammoniak aus dem Kot

Als Parameter zur Einschätzung der mikrobiellen proteolytischen Aktivität wurde Ammoniak im Kot bestimmt (Zentek et al. 1998).

3.2.12.4.1. Aufbereitung und Verarbeitung der Proben

Aus frisch abgesetztem Kot wurde 1 Aliquot Kot abgewogen, in ein Plastikröhrchen gegeben und mit 9 Teilen Aqua tridest (Millipore®) versetzt. Anschließend wurde das Plastikröhrchen verschlossen und Kot und Aqua tridest. unter Schütteln suspendiert. Daraufhin wurde die Probe bei 3000 U/min. 10 min. lang zentrifugiert. 1 ml Überstand wurde in ein Eppendorf Cup abpipettiert, mit 80 µl 1:4 verdünnter rauchender HCl versetzt und die Probe bei -80° bis zur Probenauswertung eingefroren. Es wurden pro Probennahme 2 Proben hergestellt.

3.2.12.4.2. Auswertung der Proben

Die Ammoniakmessung wurde mit einer Ammoniak-elektrode (Gas-sensitive Einstabmesskette mit Steckkopf für die Ammoniak/Ammonium-Messung NH 500/2, WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien) und einem daran angeschlossenen pH Meter als Messgerät (pH 325 von WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien) durchgeführt. Ein Messkopf mit Membran wurde dazu mit Elektrolytlösung (WTW-NH₃ 0504-1) gefüllt und auf die Messelektrode aufgeschraubt, die Messelektrode wurde anschließend an das Messgerät angeschlossen.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde zuerst eine Standardlösung mit 10 g/l Ammonium (ES/NH₄, WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien) in einer Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen bis zu einer Konzentration von 0,01 mg/l verdünnt und in Plastikröhrchen (Sarstedt AG Nürnberg, No. Ref. 55.463, 14 ml 105 x 16 mm) gegeben. Dabei sollte die Höhe der erwarteten Probenmesswerte möglichst innerhalb der Konzentrationen der Verdünnungsreihe liegen. Das Messgerät wurde auf die Einheit mV eingestellt und für eine Messtemperatur von 25°C kalibriert. Die Proben der Verdünnungsreihe wurden mit 10% Natriumhydroxidlösung (10 mol/l, MZ/NH₃/CN, WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien) versetzt, wodurch vorhandenes Ammonium in Ammoniak umgewandelt wurde. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad auf die Messtemperatur von 25°C erwärmt. Nun wurde das Messgerät so in das mit Standardlösung gefüllte Plastikröhrchen eingebracht, dass der gesamte Messkopf mit Flüssigkeit bedeckt war und sich keine Luftbläschen bildeten. Es wurde abgewartet bis das Messgerät einen stabilen Wert im negativen mV Bereich anzeigte und dieser schließlich abgelesen. Mit den Verdünnungen der Standardlösung wurde ebenso verfahren. Zwischen den einzelnen Messungen wurde der Messkopf mit Aqua bidest. (Millipore®) gespült, bis der angezeigte Probenwert wieder auf ein Ausgangspotential von ca. -50 mV im Aqua dest. abgesunken war. Die Werte der Standardlösung und ihrer Verdünnungen ergaben zusammen sowohl eine Eichkurve, die auf halblogarithmischem Papier aufgezeichnet ein Ablesen der Probenwerte zulies, als auch eine Funktion, die das Errechnen der Probenwerte ermöglichte.

Nun wurden die auszuwertenden Proben analog der Standardmessung ebenfalls mit 10% Natriumhydroxidlösung versetzt, auf 25°C im Wasserbad erwärmt und die mV-Spannung gemessen. Für die Berechnung der Ammoniakkonzentration wurden anschließend folgende Standards vereinfachend als Referenzwerte für eine Eichgerade herangezogen:

Ammoniak- Konzentration gemessene Spannung

0,1 g/l (x1) - 150 mV (y1)

0,01 g/l(x2) - 110 mV (y2)

Für Messwerte zwischen – 150 mV und – 110 mV wurde nun vereinfachend in Form einer Gerade die Steigung nach folgender Formel berechnet:

$$(y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) \rightarrow (-110 + 150) / (0,01 - 0,1).$$

Daraus ergibt sich für Messwerte eine Steigung m von –444,444. Als nächstes wurde der y-Achsenabschnitt (t) mittels folgender Formel berechnet: $y_1 = mx_1 + t$. $\rightarrow -150 = -444,444 \times 0,1 + t \rightarrow t = -105,556$.

Mittels der umgestellten Formel $x = (t - y) / m$, also $x = (-105,556 - y) / -444,444$ ließ sich nun jeder beliebige x-Wert zwischen –150 mV und - 110 mV durch Einsetzen des gemessenen y-Wertes berechnen.

Da die Probe 1:10 mit Aqua tridest. verdünnt war, musste anschließend der errechnete Wert mit 10 multipliziert werden, um den Wert von Ammoniak in g pro kg Kot zu erhalten.

3.2.13. Statistische Methoden

Zunächst wurden Mittelwerte der Kontrollgruppe und der Probiotikumsgruppe mit Standardabweichung zur Zusammenfassung von Einzelwerten berechnet. Die weitere statistische Auswertung des Versuchs erfolgte durch den t-Test (paarweise Mittelwertanalyse) und den Wilcoxon Rangsummen Test mittels Statistical Analysis

System Ver. 6.12. (SAS) durch Hr. Stanglmeier, Institut für Tierzucht. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde dabei als signifikant, von $p < 0,01$ als hochsignifikant und von $p < 0,001$ als sehr hoch signifikant angesehen.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Aufzuchtparameter und ernährungsphysiologische Daten

3.3.1.1. Allgemeinbefinden

Das Allgemeinbefinden der Welpen war während des Versuchs größtenteils ungestört. Lediglich während der ersten 8 Tage der Untersuchung war bei 4 der 6 Welpen der Probiotikumsgruppe das Allgemeinbefinden geringgradig reduziert. Dies äußerte sich grundsätzlich in folgenden Symptomen: Müdigkeit, Gähnen, geringe Sauglust, geringer Muskeltonus und geringe Futteraufnahme. So wiesen Welpen Nr. 5 an Tag 5, Welpen Nr. 6 an Tag 5 und 10, Welpen Nr. 11 an Tag 3 (12 Std. nach Versuchsbeginn) und Tag 4 sowie Welpen Nr. 12 an Tag 3 (12 Std. nach Versuchsbeginn), Tag 4, 8, 9 und 11 diese Symptomatik auf. Außerdem litt Welpen Nr. 12 von Tag 20 – Tag 33 an einer Infektion der oberen Atemwege. Das Allgemeinbefinden des Tieres wurde in diesem Zeitraum mit „mäßig“ bewertet. Das weiße Blutbild des Welpen in Woche 4 konnte aufgrund der Beeinflussung durch die Infektion nicht in die Ergebnisse übernommen werden.

3.3.1.2. Körpertemperatur

Die durchschnittliche Körpertemperatur der Welpen stieg zwischen Woche 1 und Woche 14 um 0,86 °C (Kontrollgruppe) bzw. 1,20 °C (Versuchsgruppe) an. Insgesamt lag die Körpertemperatur beider Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg sehr nahe beieinander und ließ keine signifikanten Unterschiede erkennen (Tabelle 11). Allerdings war bis zur Woche 6 die Durchschnittstemperatur der Versuchswelpen immer etwas niedriger als die der Kontrollgruppe.

3.3.1.3. Zeitpunkt der Augenöffnung

Die Welpen der Kontrollgruppe öffneten mit durchschnittlich 11,17 ($\pm 1,17$) Tagen die Augen, die Welpen der Probiotikumsgruppe mit 10,67 ($\pm 1,21$) Tagen durchschnittlich ein halben Tag früher. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren nicht signifikant.

Tabelle 11:
Körpertemperatur der Welpen im Wochendurchschnitt

Lebenswoche	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittliche Körpertemperatur in °C	Standardabweichung (\pm)	Durchschnittliche Körpertemperatur in °C	Standardabweichung (\pm)
Woche 1	37,68	0,27	37,35	0,22
Woche 2	37,53	0,16	37,40	0,07
Woche 3	37,75	0,16	37,71	0,10
Woche 4	37,92	0,16	37,76	0,12
Woche 5	38,11	0,10	38,01	0,10
Woche 6	38,20	0,06	38,15	0,09
Woche 7	38,20	0,10	38,23	0,09
Woche 8	38,42	0,15	38,43	0,07
Woche 9	38,44	0,14	38,50	0,14
Woche 10	38,41	0,08	38,36	0,07
Woche 11	38,52	0,13	38,41	0,19
Woche 12	38,50	0,20	38,61	0,10
Woche 13	38,52	0,14	38,50	0,12
Woche 14	38,54	0,14	38,55	0,11

3.3.1.4. Gewichtsentwicklung

Die Tiere nahmen vom Versuchsbeginn an Tag 3 bis zum Ende der Woche 14 durchschnittlich um 5993,50 g (Kontrollgruppe) bzw. 6092,67 g (Versuchsgruppe) an Gewicht zu. Die Probiotikumsgruppe wies zu Versuchsbeginn im Durchschnitt ein um 6,06% niedrigeres Gewicht als die Kontrollgruppe auf. Bis zur Woche 7 glich sich das Gewicht dann immer mehr an das Niveau der Kontrollgruppe an, ab Woche 12

wies die Probiotikumsgruppe dann durchgehend ein höheres durchschnittliches Gewicht auf (Tabelle 12). Die prozentuale Gewichtszunahme im Vergleich zur Vorwoche (Woche 1 im Vergleich zum Versuchsbeginn) sank bei beiden Gruppen mit zunehmendem Alter ab. Bei der Kontrollgruppe von 47,74% in Woche 1 auf 6,63% in Woche 14, bei der Versuchsgruppe von 49,89% auf 6,43% in diesem Zeitraum. Zwischen den beiden Gruppen war der Unterschied der durchschnittlichen prozentualen Gewichtszunahmen in Woche 5 mit 5,89% am größten. Die Unterschiede erreichten jedoch zu keinem Zeitpunkt Signifikanzniveau.

Tabelle 12:
Gewichtsentwicklung der Welpen, Vergleich der durchschnittlichen Gruppengewichte zu Versuchsbeginn (Tag 3), zum Ende jeder Lebenswoche und prozentuale wöchentliche Zunahme.

Lebenswoche	Kontrolle			Probiotikum		
	Ø Gewicht in Gramm	Zunahme % im Vgl. zur Vorwoche	Standardabweichung Gewicht (±)	Ø Gewicht in Gramm	Zunahme % im Vgl. zur Vorwoche	Standardabweichung Gewicht (±)
Tag 3	550,17	-	54,07	516,83	-	24,03
Woche 1	812,83	47,74 ¹	78,36	774,67	49,89 ¹	78,20
Woche 2	1251,00	53,91	135,36	1186,50	53,16	123,18
Woche 3	1621,00	29,58	187,79	1517,17	27,87	185,59
Woche 4	1945,17	20,00	169,44	1845,00	21,61	185,91
Woche 5	2272,17	16,81	201,57	2263,83	22,70	269,95
Woche 6	2683,50	18,10	227,82	2672,00	18,03	279,40
Woche 7	3166,33	17,99	234,10	3159,00	18,23	261,44
Woche 8	3652,50	15,35	264,70	3681,50	16,54	233,56
Woche 9	4140,33	13,36	265,20	4149,50	12,71	265,61
Woche 10	4675,17	11,46	422,24	4660,50	12,31	368,74
Woche 11	5211,17	12,92	458,00	5195,83	11,49	390,74
Woche 12	5722,00	9,80	522,44	5735,67	10,39	381,34
Woche 13	6136,83	7,25	581,62	6210,00	8,27	462,15
Woche 14	6543,67	6,63	590,73	6609,50	6,43	492,32

¹ = Zunahme im Vergleich zum Versuchsbeginn (Tag 3)

3.3.1.5. Futteraufnahme

Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme stieg mit zunehmendem Alter an. Bei der Kontrollgruppe von 114,79 g in Woche 1 auf 949,26 g in Woche 14 und bei der

Versuchsgruppe von 112,95 g auf 984,10 g in diesem Zeitraum. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich ab Woche 5 durch die Beifütterung und ab Woche 9 durch das Absetzen der Welpen jeweils die Futterzusammensetzung änderte. Die Futteraufnahme war bis zur Woche 4 bei der Kontrollgruppe etwas höher, im Zeitraum der Wochen 5 bis 8 ergab sich ein uneinheitliches Bild. Von Woche 9 bis Versuchsende war schließlich die Futteraufnahme bei der Versuchsgruppe höher (Tabelle 13), die Unterschiede waren zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Tabelle 13: Vergleich der durchschnittlichen täglichen Futteraufnahme pro Woche innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden.					
		Kontrolle		Probiotikum	
Fütterungs- periode	Lebenswoche	Øtägliche Futterauf- nahme in g	Standard- abweichung (±)	Øtägliche Futterauf- nahme in g	Standard- abweichung (±)
Milchaus- tauscher (Tag 3-28)	Woche 1	114,79	14,78	112,95	10,48
	Woche 2	197,40	7,24	195,02	26,51
	Woche 3	219,95	29,06	206,55	24,70
	Woche 4	201,90	11,53	200,95	10,87
Beifütterung (Tag 29-56)	Woche 5	230,50	35,00	258,62	53,99
	Woche 6	307,95	16,86	305,79	19,97
	Woche 7	375,69	31,40	377,48	9,08
Absatzperiode (Tag 57-98)	Woche 8	475,17	39,81	473,74	25,31
	Woche 9	624,19	101,60	642,14	82,30
	Woche 10	778,19	58,84	788,02	55,41
	Woche 11	832,83	20,41	845,50	14,28
	Woche 12	873,43	38,79	883,17	42,35
	Woche 13	918,98	28,43	934,02	31,86
	Woche 14	949,26	33,60	984,10	27,34

3.3.1.6. Futterverwertung

Die Futterverwertung wurde als Quotient von Futteraufnahme und Gewichtszunahme berechnet und lies in allen vier untersuchten Zeitabschnitten der Aufzucht geringe, nicht signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen (Tabelle 14). Von Tag 1 bis 28 war die durchschnittliche Futterverwertung bei der Kontrollgruppe um

2,6 % besser. In der Periode der Beifütterung war die Futtermittelverwertung der Probiotikagruppe um 6,5% höher als bei der Kontrollgruppe. In der Absatzperiode bzw. über den gesamten Versuchszeitraum hinweg waren die Unterschiede sehr gering. Dabei ist wiederum zu berücksichtigen, dass sich ab Woche 5 durch die Beifütterung und ab Woche 9 durch das Absetzen der Welpen jeweils die Futterzusammensetzung änderte.

Tabelle 14: Durchschnittliche Futtermittelverwertung der Welpen in drei verschiedenen Fütterungsperioden und im Gesamtzeitraum des Versuchs.				
	Kontrolle		Probiotikum	
Fütterungsperiode	ØFuttermittelverwertung in g Futter pro g Zunahme	Standardabweichung (±)	ØFuttermittelverwertung in g Futter pro g Zunahme	Standardabweichung (±)
Milchaustauscher (Tag 3-28)	3,70	0,19	3,80	0,25
Beifütterung (Tag 29-56)	5,97	0,56	5,58	0,29
Absatzperiode (Tag 57-98)	12,46	1,33	12,50	1,11
Gesamtzeitraum (Tag 3-98)	8,35	0,77	8,31	0,49

3.3.2. Blutparameter

3.3.2.1. Rotes Blutbild und Thrombozyten

3.3.2.1.1. Erythrozyten

Die durchschnittliche Erythrozytenzahl beider Gruppen stieg mit zunehmendem Alter kontinuierlich an. Der Vergleich beider Gruppen ließ nur geringe Unterschiede erkennen (Tabelle 15). In Woche 8 war die Differenz am höchsten, die

durchschnittliche Zahl roter Blutkörperchen der Probiotikumsgruppe lag dort um 8,5% unter dem Wert der Kontrollgruppe. Zu keinem Zeitpunkt erreichten die Unterschiede Signifikanzniveau.

Tabelle 15:
Durchschnittliche Erythrozytenzahl der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.

Lebenswoche	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittliche Erythrozytenzahl in 10^6 pro μ l Blut	Standardabweichung (\pm)	Durchschnittliche Erythrozytenzahl in 10^6 pro μ l Blut	Standardabweichung (\pm)
Woche 4	4,87	0,15	4,84	0,47
Woche 8	6,11	0,56	5,59	0,41
Woche 10	6,47	0,47	6,48	0,33
Woche 12	6,54	0,27	6,73	0,23
Woche 14	6,51	0,32	6,51	0,24

3.3.2.1.2. Hämoglobin

Der durchschnittliche Hämoglobingehalt im Blut beider Gruppen stieg mit zunehmendem Alter kontinuierlich an. Während in den Wochen 4, 12 und 14 der Hb Gehalt im Blut der Probiotikumsgruppe etwas höher war, wiesen die Kontrolltiere in den Wochen 8 und 10 höhere Werte auf, wobei der Unterschied zwischen beiden Gruppe mit 0,56 mmol/l in Woche 8 am größten war (Tabelle 16). Die Unterschiede waren dabei zu keinem Zeitpunkt signifikant.

3.3.2.1.3. Hämatokrit

Der durchschnittliche Hämatokritwert der Welpen beider Gruppen stieg mit zunehmendem Alter an (Tabelle 17). Zwischen den Gruppen gab es zu den untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede. Am größten war der Unterschied, wie schon bei der Hämoglobinkonzentration in Woche 8, wo die

Versuchsgruppe einen um 9,0% geringeren Hämatokritwert aufwies als die Kontrollgruppe.

Tabelle 16:
Durchschnittliche Hämoglobinkonzentration im Blut der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.

	Kontrolle		Probiotikum	
Lebenswoche	Durchschnittliche Hb-Konzentration in mmol/l Blut	Standard-abweichung (\pm)	Durchschnittliche Hb-Konzentration in mmol/l Blut	Standard-abweichung (\pm)
Woche 4	5,73	0,46	5,81	0,49
Woche 8	6,61	0,64	6,05	0,88
Woche 10	7,81	0,68	7,69	0,41
Woche 12	8,25	0,20	8,37	0,37
Woche 14	8,35	0,37	8,37	0,42

Tabelle 17:
Hämatokritwert im Blut der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.

	Kontrolle		Probiotikum	
Lebenswoche	Durchschnittlicher Hämatokrit in l/l Blut	Standard-abweichung (\pm)	Durchschnittlicher Hämatokrit in l/l Blut	Standard-abweichung (\pm)
Woche 4	0,288	0,028	0,290	0,027
Woche 8	0,332	0,032	0,302	0,037
Woche 10	0,373	0,031	0,371	0,015
Woche 12	0,388	0,009	0,392	0,016
Woche 14	0,387	0,021	0,390	0,015

3.3.2.1.4. Thrombozyten

Die Auswertung der Thrombozytenzahlen ergab ein uneinheitliches Bild (Tabelle 18). So schwankte die durchschnittliche Zahl der Blutplättchen bei der Kontrollgruppe zwischen 376.000 und 511.170, bei der Versuchsgruppe zwischen 392.620 und 442.000 pro μ l Blut. Die hohe Standardabweichung der Woche 4 ergab sich daraus,

dass zu diesem Zeitpunkt in jeder Gruppe je ein Welpen mit 93500 bzw. 89700 Thrombozyten pro μl Blut eine vergleichsweise niedrige Anzahl an Blutplättchen aufwies. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht beobachtet.

Tabelle 18: Durchschnittliche Thrombozytenzahl der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.				
	Kontrolle		Probiotikum	
Lebenswoche	Durchschnittliche Thrombozytenzahl in $10^3/\mu\text{l}$ Blut	Standardabweichung (\pm)	Durchschnittliche Thrombozytenzahl in $10^3/\mu\text{l}$ Blut	Standardabweichung (\pm)
Woche 4	422,25	210,51	392,62	162,16
Woche 8	511,17	73,96	439,50	72,27
Woche 10	445,00	73,20	442,00	117,09
Woche 12	376,00	109,96	433,83	50,65
Woche 14	462,67	74,19	404,83	52,00

3.3.2.2. Weißes Blutbild

3.3.2.2.1. Leukozyten

Die durchschnittliche Zahl der Leukozyten war in Woche 4 bei der Probiotikumsgruppe um 19,1%, in Woche 8 um 5,1 %, in Woche 10 um 15,7% und in Woche 12 um 17,7% höher als bei der Kontrollgruppe. In Woche 14 fiel die Leukozytenzahl bei der Versuchsgruppe auf das Niveau der Kontrollgruppe ab. Die Unterschiede erreichten zu keinem Zeitpunkt Signifikanzniveau. Die Zahl der weißen Blutkörperchen schwankte zwischen Woche 4 und Woche 14 bei der Kontrollgruppe zwischen 11.040 und 12.580, bei der Versuchsgruppe zwischen 11.600 und 14.980 Leukozyten pro μl Blut (Tabelle 19).

3.3.2.2.2. Lymphozyten

Mit Ausnahme der Woche 8 ergab die Auswertung der durchschnittlichen Lymphozytenzahlen bei den Versuchswelpen höhere Werte als bei der

Kontrollgruppe (Tabelle 20). In Woche 4 waren die Werte um 18,3%, in Woche 10 um 12,4% und in Woche 12 um 22,9% höher, jedoch waren die Unterschiede zu keinem Zeitpunkt signifikant. In Woche 14 fiel die durchschnittliche Lymphozytenzahl der Probiotikumsgruppe auf das Niveau der Kontrollgruppe ab. Die durchschnittliche Zahl der Lymphozyten schwankte bei der Kontrollgruppe zwischen 4.430 und 5.870 bzw. bei der Versuchsgruppe zwischen 4.120 und 6.490 Zellen pro μl Blut.

Tabelle 19:
Durchschnittliche Leukozytenzahl der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.

Lebenswoche	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittliche Leukozytenzahl in 10^3 pro μl Blut	Standard-abweichung (\pm)	Durchschnittliche Leukozytenzahl in 10^3 pro μl Blut	Standard-abweichung (\pm)
Woche 4	12,58	3,17	14,98*	1,86*
Woche 8	11,04	3,24	11,60	1,67
Woche 10	11,73	2,15	13,57	1,95
Woche 12	11,45	1,80	13,48	1,55
Woche 14	12,39	2,20	12,37	1,07

*= Es wurden nur 5 Welpen in die Auswertung mit einbezogen, da ein Tier aufgrund einer Infektion in Woche 4 eine stark erhöhte Leukozytenzahl von 26400 pro μl Blut aufwies.

Tabelle 20:
Lymphozytenzahl der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.

Lebenswoche	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittliche Lymphozytenzahl in 10^3 pro μl Blut	Standard-abweichung (\pm)	Durchschnittliche Lymphozytenzahl in 10^3 pro μl Blut	Standard-abweichung (\pm)
Woche 4	5,47	1,29	6,47*	1,22*
Woche 8	4,43	2,09	4,12	1,12
Woche 10	5,00	1,97	5,62	1,65
Woche 12	5,28	1,16	6,49	0,71
Woche 14	5,87	1,60	5,90	1,09

*= Es wurden nur 5 Welpen in die Auswertung mit einbezogen, da bei einem Tier aufgrund einer Infektion in Woche 4 die Lymphozytenzahl nicht verwertbar war.

3.3.2.2.3. Neutrophile Granulozyten

In Woche 4 war die durchschnittliche Zahl der neutrophilen Granulozyten im Blut der Probiotikumsgruppe um 18,4% höher. Mit 17,9% und 18,6% höheren Werten in Woche 8 bzw. Woche 10 hielt sich diese Differenz auf gleichem Niveau. In Woche 12 waren die Granulozytenwerte der Probiotikumsgruppe noch um 11,2% höher, um schließlich in Woche 14 auf das Niveau der Kontrollgruppe abzufallen. Zu keinem Zeitpunkt erreichten die Unterschiede Signifikanzniveau. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten schwankte im Messzeitraum bei der Kontrollgruppe zwischen 5.420 und 5.920, bei der Versuchsgruppe zwischen 5.680 und 7.010 Zellen pro μl Blut (Tabelle 21).

Tabelle 21:
Durchschnittliche Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.

Lebenswoche	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittliche Anzahl Neutrophiler in 10^3 pro μl	Standardabweichung (\pm)	Durchschnittliche Anzahl Neutrophiler in 10^3 pro μl	Standardabweichung (\pm)
Woche 4	5,92	2,07	7,01*	1,31*
Woche 8	5,42	1,55	6,39	1,13
Woche 10	5,80	1,86	6,88	1,40
Woche 12	5,43	0,79	6,04	0,79
Woche 14	5,71	0,80	5,68	0,56

*= Es wurden nur 5 Welpen in die Auswertung mit einbezogen, da ein Tier aufgrund einer Infektion in Woche 4 eine stark erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten (16800 pro μl Blut) aufwies.

3.3.2.2.4. Monozyten

In Woche 4 war die durchschnittliche Zahl der Monozyten in der Probiotikumsgruppe um 27,6% höher als bei der Kontrollgruppe. In Woche 8 war die Monozytenzahl bei der Kontrollgruppe um 4,1% höher, anschließend in Woche 10 und 12 aber wieder bei der Probiotikumsgruppe mit 17,9% bzw. 33,8%. In Woche 14 schließlich sank die Zahl bei der Versuchsgruppe leicht unter das Niveau der Kontrolle ab, zu keinem

Zeitpunkt waren die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant. Die Zahl der Monozyten schwankte im Auswertungszeitraum bei der Kontrollgruppe zwischen 650 und 1050 und bei der Versuchsgruppe zwischen 690 und 1340 Zellen pro μl Blut (Tabelle 22).

Tabelle 22:
Durchschnittliche Anzahl der Monozyten im Blut der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.

Lebenswoche	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittliche Anzahl der Monozyten in 10^3 pro μl	Standardabweichung (\pm)	Durchschnittliche Anzahl der Monozyten in 10^3 pro μl	Standardabweichung (\pm)
Woche 4	1,05	0,25	1,34*	0,31*
Woche 8	1,01	0,25	0,97	0,17
Woche 10	0,78	0,41	0,92	0,07
Woche 12	0,65	0,30	0,87	0,28
Woche 14	0,76	0,43	0,69	0,29

*= Es wurden nur 5 Welpen in die Auswertung mit einbezogen, da bei einem Tier aufgrund einer Infektion in Woche 4 die Monozytenzahl nicht verwertbar war.

3.3.2.2.5. Basophile Granulozyten

Die Auswertung der durchschnittlichen Zahl basophiler Granulozyten ergab ein uneinheitliches Bild (Tabelle 23). Unter Berücksichtigung einer relativ hohen Streuung der Einzelwerte (Anhang Tabelle A) waren in den Wochen 4, 10 und 14 die Werte bei der Versuchsgruppe höher, in Woche 8 und 12 bei der Kontrollgruppe, wobei die Unterschiede nie signifikant waren. Die Zahl der basophilen Granulozyten schwankte bei der Kontrollgruppe zwischen 48 und 129, bei der Probiotikumsgruppe zwischen 42 und 163 Zellen pro μl Blut.

3.3.2.2.6. Eosinophile Granulozyten

Die Zahl der eosinophilen Granulozyten schwankte bei sehr hoher Streuung der Einzelwerte (Anhang Tabelle B) zwischen 12 und 79 bei der Versuchsgruppe und 3

und 62 Eosinophilen pro μl Blut bei der Versuchsgruppe. Im Vergleich der Gruppen war das Ergebnis uneinheitlich: In Woche 4 und 14 war die Zahl bei der Versuchsgruppe höher, zu den übrigen Messzeitpunkten bei der Kontrollgruppe (Tabelle 24), die Unterschiede erreichten zu keinem Zeitpunkt Signifikanzniveau.

Tabelle 23:
Durchschnittliche Anzahl der basophilen Granulozyten im Blut der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.

Lebenswoche	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittliche Anzahl der Basophilen in 10^3 pro μl	Standardabweichung (\pm)	Durchschnittliche Anzahl der Basophilen in 10^3 pro μl	Standardabweichung (\pm)
Woche 4	0,129	0,066	0,163*	0,068*
Woche 8	0,160	0,109	0,102	0,064
Woche 10	0,077	0,059	0,091	0,061
Woche 12	0,049	0,042	0,090	0,036
Woche 14	0,048	0,030	0,072	0,040

*= Es wurden nur 5 Welpen in die Auswertung mit einbezogen, da bei einem Tier aufgrund einer Infektion in Woche 4 die Anzahl der basophilen Granulozyten nicht verwertbar war.

Tabelle 24:
Durchschnittliche Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten.

Lebenswoche	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittliche Anzahl Eosinophiler in 10^3 pro μl	Standardabweichung (\pm)	Durchschnittliche Anzahl Eosinophiler in 10^3 pro μl	Standardabweichung (\pm)
Woche 4	0,012	0,017	0,023*	0,024*
Woche 8	0,029	0,061	0,021	0,043
Woche 10	0,079	0,180	0,063	0,075
Woche 12	0,061	0,127	0,003	0,005
Woche 14	0,006	0,006	0,023	0,027

*= Es wurden nur 5 Welpen in die Auswertung mit einbezogen, da bei einem Tier aufgrund einer Infektion in Woche 4 die Anzahl der eosinophilen Granulozyten nicht verwertbar war.

3.3.2.3. Immunglobuline

3.3.2.3.1. IgG

Der durchschnittliche Gehalt an IgG schwankte in der Kontrollgruppe zwischen 2,69 und 10,68 mg und in der Versuchsgruppe zwischen 1,60 und 8,10 mg pro ml Serum. Ausgehend von Tag 3, wo die Werte beider Gruppen mit 5,99 mg bzw. 5,38 mg/ml nahe beieinander lagen, sank der Gehalt an IgG bei beiden Gruppen bis Woche 2 kontinuierlich ab. Ab Woche 2 war der Gehalt an IgG bei der Kontrollgruppe kontinuierlich höher als bei der Versuchsgruppe, wobei der Unterschied in Woche 10 am größten war. Dort wiesen die Kontrolltiere einen fast doppelt so hohen Wert auf (Tabelle 25). Die Unterschiede zwischen den Gruppen erreichten zu keinem Zeitpunkt Signifikanzniveau.

Tabelle 25: Durchschnittlicher IgG Gehalt im Serum der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten				
	Kontrolle		Probiotikum	
Lebenswoche	Durchschnittlicher IgG Gehalt in mg pro ml Serum	Standard- abweichung (\pm)	Durchschnittlicher IgG Gehalt in mg pro ml Serum	Standard- abweichung (\pm)
Tag 3	5,99*	4,40*	5,38	3,02
Woche 1	3,53	2,99	4,12	5,50
Woche 2	2,69	1,85	1,60	0,64
Woche 4	2,73	1,55	1,76	0,90
Woche 8	6,11	3,19	3,69	2,74
Woche 10	10,68	7,21	5,35	3,46
Woche 12	6,57	3,88	4,47	3,20
Woche 14	9,60	4,98	8,10	8,07

*= Es wurden nur 5 Welpen in die Auswertung mit einbezogen.

3.3.2.3.2. IgA

Ausgehend von Tag 3, wo die durchschnittlichen Werte an IgA bei beiden Gruppen mit 0,401 bzw. 0,432 mg pro ml Serum sehr nahe beieinander lagen, wiesen die Versuchswelpen bis Woche 4 höhere IgA Werte auf. Ab Woche 8 war der IgA Gehalt bei der Kontrollgruppe höher, in Woche 14 glichen sich die Werte beider Gruppen aneinander an. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant. Der durchschnittliche IgA Gehalt schwankte bei der Kontrollgruppe zwischen 0,159 und 0,627 mg, bei der Probiotikumsgruppe zwischen 0,163 und 0,496 mg pro ml Serum (Tabelle 26).

Tabelle 26: Durchschnittlicher IgA Gehalt im Serum der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten				
	Kontrolle		Probiotikum	
Lebenswoche	Durchschnittlicher IgA Gehalt in mg pro ml Serum	Standard- abweichung (\pm)	Durchschnittlicher IgA Gehalt in mg pro ml Serum	Standard- abweichung (\pm)
Tag 3	0,401*	0,158*	0,432	0,253
Woche 1	0,159	0,108	0,163	0,107
Woche 2	0,193	0,137	0,299	0,193
Woche 4	0,284	0,110	0,309	0,084
Woche 8	0,627	0,507	0,496	0,072
Woche 10	0,535	0,295	0,426	0,079
Woche 12	0,601	0,534	0,465	0,080
Woche 14	0,440	0,154	0,457	0,103

*= Es wurden nur 5 Welpen in die Auswertung mit einbezogen.

3.3.2.3.3. Antikörper gegen humanes Serumalbumin

Nach Impfung der Welpen mit hSa in Woche 8 stieg der Gehalt an Antikörpern gegen hSa gemessen an der Extinktion im ELISA Reader bei den Kontrollwelpen auf 0,085 und bei der Probiotikumsgruppe auf 0,061. In Woche 12 sanken diese Werte bei beiden Gruppen leicht ab, um nach Boosterung der Tiere schließlich in Woche 14 bei

der Kontrollgruppe mit 0,160 und der Versuchsgruppe mit 0,162 auf gleiches Niveau anzusteigen (Tabelle 27).

Tabelle 27: Durchschnittlicher Gehalt von Antikörpern gegen humanes Serumalbumin (hSa) im Serum der Welpen zu verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten gemessen als fotometrische Extinktion im ELISA-Reader.				
	Kontrolle		Probiotikum	
Lebenswoche	Durchschnittlicher hSa Gehalt als Extinktion	Standard-abweichung (\pm)	Durchschnittlicher hSa Gehalt als Extinktion	Standard-abweichung (\pm)
Woche 10	0,085	0,049	0,061	0,015
Woche 12	0,079	0,025	0,069	0,005
Woche 14	0,160	0,046	0,162	0,020

3.3.3. Kotparameter

3.3.3.1. Kottrockensubstanz

Die durchschnittliche Trockensubstanz im Kot schwankte bei der Kontrollgruppe zwischen 20,48% und 37,83%. Bei der Versuchsgruppe ergaben sich Schwankungen zwischen 20,33 % und 32,70 %. Im Zeitraum der Milchaustauscherfütterung war die durchschnittliche Trockensubstanz im Kot der Versuchsgruppe niedriger als bei der Kontrolle. Zur Zeit der Beifütterung waren die Werte der Versuchsgruppe bis Woche 7 höher. Ab Woche 8 ergab sich ein uneinheitliches Bild (Tabelle 28), zu keinem Zeitpunkt waren die Unterschiede signifikant.

Tabelle 28: Durchschnittliche Trockensubstanz im Kot der Welpen im wöchentlichen Vergleich.					
		Kontrolle		Probiotikum	
Fütterungs- periode	Lebenswoche	ØTrocken - substanz des Kotes in %	Standard- abweichung	ØTrocken - substanz des Kotes in %	Standard- abweichung
Milchhaus- Tauscher (Tag 3-28)	Woche 1-2	31,61	3,04	28,07	5,48
	Woche 3	27,65	3,71	24,13	3,43
	Woche 4	29,60	6,80	27,01	4,33
Beifütterung (Tag 29-56)	Woche 5	28,63	n/a	32,70	n/a
	Woche 6	27,20	n/a	27,83	n/a
	Woche 7	32,03	n/a	32,67	n/a
	Woche 8	33,42	n/a	27,29	n/a
Absatzperiode (Tag 57-98)	Woche 9	31,37	n/a	25,73	n/a
	Woche 10	37,83	n/a	31,10	n/a
	Woche 11	20,48	n/a	25,77	n/a
	Woche 12	24,56	n/a	21,93	n/a
	Woche 13	22,84	n/a	20,33	n/a
	Woche 14	24,19	n/a	24,67	n/a

n/a = Da der Kot ab Woche 5 in Gruppen gesammelt wurde, war eine Bestimmung der Standardabweichung nicht möglich.

3.3.3.2. Mikrobiologische Kotuntersuchung

3.3.3.2.1. Aerobe Gesamtkeimzahl

Die Auswertung der aeroben Gesamtkeimzahl fiel durch die hohe Streuung der Einzelergebnisse (Anhang Tabelle C) auf, die Unterschiede zwischen den Durchschnittswerten beider Gruppen erreichten zu keinem Zeitpunkt Signifikanzniveau. Die im Kot nachgewiesene Gesamtkeimzahl nahm mit zunehmendem Alter ab. Die Kontrollgruppe wies zu Versuchsbeginn durchschnittlich 2136,7 KbE und in der Absatzperiode 187,5 KbE, die Versuchsgruppe in denselben Zeiträumen jeweils 3346,7 KbE bzw. 759,7 KbE Gesamtkeime pro Gramm Kot auf (Tabelle 29). Die Versuchswelpen wiesen in der Beifütterperiode eine auffällig niedrige durchschnittliche Gesamtkeimzahl im Kot auf.

Tabelle 29:
Durchschnittliche aerobe Gesamtkeimzahl im Kot der Welpen
innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden.

Fütterungsperiode	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittliche Gesamtkeimzahl in KbE pro g Kot	Standardabweichung (\pm)	Durchschnittliche Gesamtkeimzahl in KbE pro g Kot	Standardabweichung (\pm)
Versuchsbeginn (Tag 3-8)	2136,7	1329,7	3346,7	2904,2
Milchaustauscher	1823,3	1589,8	3245,0*	3668,0
Beifütterung	957,0*	924,1	195,3	95,7
Absatzperiode	187,5**	183,9	759,7	932,8

* = Es wurden lediglich 5 von 6 Tieren ausgewertet.

** = Es wurden lediglich 4 von 6 Tieren ausgewertet.

3.3.3.2.2. Nachweis von *Escherichia coli*

Die absolute Anzahl an *E. coli* schwankte bei der Kontrollgruppe durchschnittlich zwischen 187,8 KbE und 1199,2 KbE, bei der Versuchsgruppe zwischen 38,5 und 1676,2 KbE pro g Kot. Die Streuung der Einzelwerte (Anhang, Tabelle D) war sehr hoch, die Unterschiede zwischen den Werten beider Gruppen waren nicht signifikant. Der durchschnittliche Anteil an der Gesamtkeimzahl schwankte bei der Kontrollgruppe zwischen 14,7 und 50,3%, bei der Versuchsgruppe zwischen 22,9 und 46,3%. Die Probiotikumsgruppe wies abgesehen vom Versuchsanfang einen niedrigeren Anteil von *E. coli* an der Gesamtkeimzahl auf als die Kontrolle. Die absolute Anzahl an *E. coli* war bei der Probiotikumsgruppe in Beifütter- und Absatzperiode niedriger (Tabelle 30), ansonsten waren bei diesen Tieren im Durchschnitt höhere Keimzahlen nachweisbar.

Tabelle 30:
Durchschnittliche Anzahl von E. coli und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtkeimzahl im Kot der Welpen innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden.

Fütterungsperiode	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittliche Anzahl von E.coli in KbE pro g Kot	Durchschnittlicher Anteil (%) an der Gesamtkeimzahl	Durchschnittliche Anzahl von E.coli in KbE pro g Kot	Durchschnittlicher Anteil (%) an der Gesamtkeimzahl
Versuchsbeginn (Tag 3-8)	187,8**	14,7**	1024,2	23,9
Milchaustauscher	920,0	50,3	1676,2*	46,3
Beifütterung	1199,2	40,8*	38,5	22,9
Absatzperiode	666,9	44,6**	165,8	27,5

*= Es wurden lediglich 5 von 6 Tieren ausgewertet

**= Es wurden lediglich 4 von 6 Tieren ausgewertet

3.3.3.2.3. Nachweis von Clostridium perfringens

Der Anteil Clostridium perfringens positiver Tiere war in allen untersuchten Zeiträumen bei der Versuchsgruppe niedriger als bei der Kontrolle. Während zu Versuchsbeginn und in der Absatzperiode in der Kontrollgruppe bei einer großen Zahl der Tiere Cl. perfringens im Kot nachgewiesen werden konnte, war während der Milchaustauscherperiode der Anteil mit 16,7% noch am niedrigsten (Tabelle 31). Auch die Versuchsgruppe hatte zu diesem Zeitraum mit 0% den niedrigsten Wert. Die höchsten Werte zeigte die Versuchsgruppe mit 33,3% zu Versuchsbeginn und in der Beifütterperiode.

Bei den Cl. perfringens positiven Tiere der Versuchsgruppe konnte innerhalb aller untersuchten Fütterungsperioden eine höhere durchschnittliche Anzahl an Cl. perfringens im Kot nachgewiesen werden als bei den positiven Tieren der

Kontrollgruppe, am größten war der Unterschied dabei in der Absatzperiode. Bezogen auf alle Tiere war die durchschnittliche Anzahl an Cl. perfringens bei der Versuchsgruppe in der Beifutter- und Absatzperiode höher, ansonsten aber niedriger als bei der Kontrollgruppe. Die Streuung der Einzelwerte aller Tiere (Anhang, Tabelle F) erwies sich als sehr hoch, signifikante Unterschiede zwischen den Keimzahlen der Gruppen waren nicht festzustellen.

Tabelle 31: Nachweishäufigkeit von Clostridium perfringens im Kot der Welpen und durchschnittliche Zahl von Cl. perfringens bei allen Tieren und den positiven Tieren einer Gruppe innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden						
	Kontrolle			Probiotikum		
Fütterungs- periode	ØZahl von Cl. Perfrin- gens in Mio. KbE pro g Kot	Anteil von Tieren mit Nachweis von Cl. per- fringens im Kot in %	ØZahl von Cl.perfrin- gens bei po- sitiven Tie- ren in Mio. KbE/g Kot	ØZahl von Cl. Perfrin- gens in Mio. KbE pro g Kot	Anteil von Tieren mit Nachweis von Cl. per- fringens im Kot in %	ØZahl von Cl.perfrin- gens bei po- sitiven Tie- ren in Mio. KbE/g Kot
Versuchs- beginn (Tag 3-8)	280,0*	75,0*	373,0*	133,3	33,3	400,0
Milch- austauscher	3,3	16,7	20,0	0,0	0,0	-
Beifütterung	3,2	50,0	6,3	16,8	33,3	50,5
Absatz- periode	23,3	66,7	35,0	30,0	16,7	180,0

*=Es wurden lediglich 4 von 6 Tieren ausgewertet.

3.3.3.2.4. Nachweis von Enterokokken

Bei der Kontrollgruppe schwankte der Anteil der Tiere mit Enterokokken-Nachweis zwischen 50% zu Versuchsbeginn und 100% in der Beifutterperiode. Bei der Versuchsgruppe waren zu Versuchsbeginn und bei Beifütterung 83,3% positiv, ansonsten konnten bei allen Tieren Enterokokken nachgewiesen werden. Besonders

groß war die Differenz der Enterokokkengehalte beider Gruppen in der Absatzperiode (Tabelle 32). Vergleicht man die durchschnittlichen Keimzahlen der positiven Tiere, so wiesen die Tiere der Probiotikumsgruppe zu Versuchsbeginn und in der Beifütterperiode geringere Enterokokkenzahlen auf, im Bezug auf den Durchschnitt jeweils aller Tiere einer Gruppe, war dies jedoch nur in der Beifütterperiode der Fall. Die Enterokokkenzahlen fielen durch eine hohe Streuung der Einzelwerte aller Tiere (Anhang, Tabelle G) auf, wobei die Unterschiede in den Keimzahlen beider Gruppen kein Signifikanzniveau erreichten.

Tabelle 32: Nachweishäufigkeit von Enterokokken im Kot der Welpen und durchschnittliche Zahl von Enterokokken bei allen Tieren und den positiven Tieren einer Gruppe innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden.						
	Kontrolle				Probiotikum	
Fütterungs- periode	ØZahl der Enterokok- ken in Mio. KbE pro g Kot	Anteil von Tieren mit Nachweis von Entero- kokken im Kot in %	ØZahl der Enterokok- ken bei po- sitiven Tie- ren in Mio. KbE/g Kot	ØZahl der Enterokok- ken in Mio. KbE pro g Kot	Anteil von Tieren mit Nachweis von Entero- kokken im Kot in %	ØZahl der Enterokok- ken bei po- sitiven Tie- ren in Mio. KbE/g Kot
Versuchs- beginn (Tag 3-8)	1065,0*	50,0*	2130,0*	1456,7	83,3	1748,0
Milch- austauscher	96,7	83,3	117,8	227,3	100,0	227,33
Beifütterung	372,3	100,0	372,3	126,0	83,3	151,2
Absatz- periode	15,5	83,3	18,6	457,3	100,0	457,3

*=Es wurden lediglich 4 von 6 Tieren ausgewertet.

3.3.3.2.5. Nachweis von Laktobazillen

Die durchschnittliche Zahl von Laktobazillen war sowohl im Vergleich aller Tiere einer Gruppe, als auch bei Gegenüberstellung der durchschnittlichen Keimzahl der

positiven Tiere bei der Probiotikumsgruppe höher. Die Ergebnisse fielen durch eine hohe Streuung der Einzelwerte aller Tiere (Anhang, Tabelle H) auf, die Keimzahlen beider Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Außerdem sanken die durchschnittlichen Lb. Zahlen bei der Versuchsgruppe mit dem Alter langsamer ab, und stiegen bei dieser in der Absatzperiode nochmals an. In dieser Periode war auch der Unterschied zwischen den Gruppen wie schon bei den Enterokokken am größten.

Der Anteil der Laktobazillen-positiven Tiere betrug zu Versuchbeginn in beiden Gruppen 100%. Es sank anschließend bis zur Absatzperiode bei der Kontrollgruppe bis auf 0% bei der Versuchsgruppe lediglich bis auf 33% ab (Tabelle 33).

Tabelle 33: Nachweishäufigkeit von Laktobazillen im Kot der Welpen und durchschnittliche Zahl von Laktobazillen bei allen Tieren und den positiven Tieren einer Gruppe innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden.						
	Kontrolle				Probiotikum	
Fütterungs- periode	Zahl der Laktobazil- len in Mio. KbE pro g Kot	Anteil von Tieren mit Nachweis von Laktobazillen im Kot in %	Zahl der Laktobazil- len bei po- sitiven Tie- ren in Mio. KbE/g Kot	Zahl der Laktobazil- len in Mio. KbE pro g Kot	Anteil von Tieren mit Nachweis von Laktobazillen im Kot in %	Zahl der Laktobazil- len bei po- sitiven Tie- ren in Mio. KbE/g Kot
Versuchs- beginn (Tag 3-8)	266,0*	100,0*	266,0*	363,1	100,0	363,1
Milch- austauscher	2,9	66,7	4,3	307,1	83,3	368,5
Beifütterung	2,4	50,0	4,8	3,5	33,3	10,5
Absatz- periode	0,0	0,0	-	82,3	33,3	247,0

*=Es wurden lediglich 4 von 6 Tieren ausgewertet.

3.3.3.2.6. Nachgewiesene spezifische Keime

Der an häufigsten gefundene spezifische Keim im Kot der Tiere war *Sc. bovis*. Er wurde bei 14 Proben der Kontrollgruppe, bzw. 11 Proben der Versuchsgruppe mit hohen Keimzahlen von durchschnittlich 502,8 KbE bzw. 736,0 KbE/g Kot nachgewiesen. *Lb. acidophilus* war ebenfalls in insgesamt 24 Proben nachweisbar. Der auch im Probiotikum enthaltene Keim *Ec. faecium* wurde bei der Kontrolle 5 mal mit einer durchschnittlichen Keimzahl von 9,8 KbE/ g Kot, und bei der Versuchsgruppe 9 mal mit einer durchschnittlichen Keimzahl von 43,3 KbE/g Kot nachgewiesen. Die Daten aller nachgewiesenen spezifischen Keime sind in Tabelle 34 aufgelistet.

Tabelle 34: Nachweishäufigkeit und durchschnittliche Zahl bestimmter Keime im Kot der Welpen.				
	Kontrolle		Probiotikum	
Keim	Anzahl der Proben in denen der Keim nachgewiesen wurde.	Durchschnittliche Zahl der Keime bei positiven Tieren in Mio. KbE pro g Kot	Anzahl der Proben in denen der Keim nachgewiesen wurde	Durchschnittliche Zahl der Keime bei positiven Tieren in Mio. KbE pro g Kot
<i>Sc. bovis</i>	14	502,8	11	736,0
<i>Lb. acidophilus</i>	10	59,1	14	182,6
<i>Ec. faecalis</i>	9	44,6	3	43,3
<i>Ec. faecium</i>	5	9,8	9	43,3
<i>Ec. durans</i>	2	17,0	2	135,5
<i>Lb. fermentum</i>	1	1,4	2	9,5
<i>Cl. putrificium</i>	1	1,0	0	-
<i>Citrobacter freundii</i>	1	n/a	0	-
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2,0	0	-
<i>Ec. gallinarum</i>	0	-	8	498,1
<i>Sc. salivaris</i>	0	-	1	10,0
<i>Ec. avium</i>	0	-	2	460,0
<i>Leuc. lactis</i>	0	-	2	81,0
<i>Prov. alcalifaciens</i>	0	-	1	102,0

3.3.3.3. L-Laktat im Kot

Ausgehend von einem L-Laktatwert von 1,357 g bei der Kontrollgruppe und 1,459 g Laktat / g Kot bei der Versuchsgruppe zu Versuchsbeginn, sanken die Laktatwerte beider Gruppen in der darauffolgend ausgewerteten Milchaustauscherperiode auf durchschnittlich unter 50% des Ausgangswertes. Innerhalb dieser Periode war der Laktatwert der Versuchsgruppe durchschnittlich um 23,4% niedriger als bei der Kontrolle. In der Beifütterungsperiode sanken die Werte beider Gruppen noch weiter auf unter 20% des Ausgangswertes ab. Die Versuchsgruppe wies hier um 24,2 % höhere Laktatwerte auf als die Kontrollgruppe. Zu keinem Zeitpunkt erreichten die Unterschiede zwischen den Gruppen Signifikanzniveau. In der Absatzperiode glichen sich die Werte beider Gruppen auf dem Niveau der Beifütterperiode aneinander an (Tabelle 35).

Tabelle 35: Durchschnittlicher Laktatgehalt im Kot der Welpen innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden.				
Fütterungsperiode	Kontrolle		Probiotikum	
	Durchschnittlicher Laktatgehalt in g pro kg Kot	Standard-abweichung (\pm)	Durchschnittliche Laktatgehalt in g pro kg Kot	Standard-abweichung (\pm)
Versuchsbeginn (Tag 3-8)	1,357	0,646	1,459	0,575
Milchaustauscher	0,640	0,363	0,490	0,614
Beifütterung	0,223	0,148	0,277	0,108
Absatzperiode	0,268	0,165	0,257	0,205

3.3.3.4. Ammoniak im Kot

Die Kontrollgruppe wies zu Versuchsbeginn, in der Milchaustauscher- und Absatzperiode höhere Ammoniakwerte im Kot auf. Lediglich in der Beifütterperiode waren die Ammoniakwerte bei der Versuchsgruppe höher. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant. Insgesamt schwankten die Werte zwischen 0,335 g und 0,617 g bei der Kontrollgruppe und 0,235 g und 0,580 g Ammoniak pro g Kot bei der Versuchsgruppe (Tabelle 36).

Tabelle 36: Durchschnittlicher Ammoniakgehalt im Kot der Welpen innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden.				
	Kontrolle		Probiotikum	
Fütterungsperiode	Durchschnittlicher Ammoniakgehalt in g pro kg Kot	Standard-abweichung (\pm)	Durchschnittlicher Ammoniakgehalt in g pro kg Kot	Standard-abweichung (\pm)
Versuchsbeginn (Tag 3-8)	0,355	0,240	0,235	0,277
Milchaustauscher	0,576	0,382	0,572	0,223
Beifütterung	0,497	0,196	0,580	0,267
Absatzperiode	0,617	0,290	0,535	0,332

4. Diskussion

4.1. Diskussion des Versuchsaufbaus

Der gewählte Versuchsaufbau orientierte sich an den Anforderungen der EG „Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd“. Die Regelungen dieser Leitlinien sind teils sehr allgemein gehalten, was unter streng wissenschaftlichen Kriterien Zugeständnisse in der Experimentieranordnung zulässt (Lahrssen und Zentek 2002). Es ist deshalb erforderlich über diese Mindestanforderungen hinaus sicherzustellen, dass Versuchsergebnisse ausreichend bestätigt werden können.

Die in dieser Untersuchung eingesetzte eingeschränkte Anzahl von Tieren (6 Tiere in der Versuchsgruppe, 6 in der Kontrollgruppe) kann laut Lahrssen und Zentek (2002) durch ein geeignetes Versuchsdesign kompensiert werden. So wurden im Hinblick auf die Einsatzintention Hundewelpen eingesetzt, da das Produkt für diese Altersgruppe gedacht ist. Die Rasse Beagle ist als Standardversuchshund in der Forschung für viele Modelle etabliert. Die Versuchsdauer wurde mit 14 Wochen so großzügig gewählt, damit für die Altersgruppe Saug- und Absatzwelpen ein ausreichender Beobachtungszeitraum zur Verfügung stand.

Der in den Leitlinien geforderten Erhebung allgemeiner Daten, die eine Grundinformation über den allgemeinen Gesundheitsstatus des Tieres liefern, wurde in dieser Untersuchung ausreichend entsprochen. Die Parameter wurden, wie von Lahrssen und Zentek (2002) gefordert, nicht subjektiv eingeordnet, sondern auf wissenschaftlicher Basis. Eine Ausnahme stellte dabei die subjektiv erfolgte Bestimmung des Allgemeinbefindens, der Lungenfunktion und der Größe der Lymphknoten dar. Ebenso wurden quantitative Daten nach anerkannten wissenschaftlichen Methoden bestimmt.

Die außerdem geforderten unterstützenden Daten beschreiben Hilfsparameter, die für sich alleine nicht geeignet sind die Effizienz eines Probiotikums zu belegen, aber helfen, die Wirkungen des Probiotikums unterstützend zu beschreiben. In diesem

Versuch wurden hierfür unter anderem die Futterverdaulichkeit und Kotkonsistenz bestimmt.

Zuletzt müssen den Richtlinien entsprechend auch Parameter bestimmt werden „die eine direkte Beziehung zur probiotischen Wirkung aufweisen“. Hierfür wurde die mikrobiologischen Kotuntersuchungen durchgeführt, es wurden außerdem zu mehreren Zeitpunkten Laktat und Ammoniak im Kot bestimmt. Die Evaluierung immunologischer Effekte war durch Bestimmung des weißen Blutbildes und spezifischer Antikörper möglich.

Um eventuelle positive bzw. negative Wirkungen eines Probiotikums evaluieren zu können, sollte dieses in einer ausreichenden Menge dem Futter zugesetzt werden. Nur so kann gewährleistet werden, dass die Mikroorganismen in ausreichender Konzentration ihren Wirkungsort im Darm erreichen. Bisher durchgeführte Studien über die akute Toxizität von Probiotika weisen außerdem darauf hin, dass es unmöglich ist, Probiotika in einer so hohen oralen Dosierung zu verabreichen, dass es zu schwerwiegenden Nebenwirkungen kommt (Donhue et al. 1998). Die für den Versuch gewählte Dosierung von 1×10^8 KbE *Ec. faecium* pro 100 g Futtertrockensubstanz lag um eine Logarithmusstufe niedriger als in den Untersuchungen von Molitor (1996), Zentek et al. (1998) und Pasupathy et al. (2001), die Dosierungen von 10^9 bzw. 2×10^9 KbE pro 100 g Futter zur Untersuchung der Wirkung von Probiotika beim Hund verwendeten. Die Dosierung wurde jedoch absichtlich etwas niedriger gewählt um die erhöhte Sensibilität neonataler Tiere gegenüber Mikroorganismen zu berücksichtigen.

4.2. Diskussion der Methoden

Eine ausführliche Diskussion der angewandten Methoden findet sich bei Unsöld (2003). Das auf Basis dieser Arbeit entstandene Modell wurde für diesen Versuch angewendet.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Aufzuchtparameter und ernährungsphysiologische Daten

Ein gestörtes Allgemeinbefinden während der ersten acht Versuchstage mit dem unter Punkt 3.3.1.1. erwähnten Symptomkomplex wurde bei der Versuchsgruppe beobachtet. Dies deutet auf eine Beteiligung des Probiotikums an diesem Geschehen hin. Am wahrscheinlichsten ist als Ursache eine Koprostase, da die Welpen oft vor Besserung der Symptomatik große Mengen Kot absetzten. Im Zeitraum vor Verschlechterung des Allgemeinbefindens hatten diese Welpen außerdem meist relativ viel Milchaustauscher aufgenommen. Als Ursache für die obstipative Wirkung des Probiotikums kann man eventuell über eine Beeinflussung der Darmflora und eine dadurch bedingte Veränderung des Wasserhaushalts im Darm durch das Probiotikum spekulieren. Andere Autoren fanden keine Hinweise auf eine Koprostase oder Verschlechterung des Allgemeinbefindens beim Hund, die durch *Ec. faecium* (Zentek et al. 1998, Molitor 1996) bzw. andere Probiotika (Biourge et al. 1998, Weese und Anderson 2002) ausgelöst wurden. Allerdings wurden bei diesen Untersuchungen lediglich früh abgesetzte Welpen bzw. adulte Hunde berücksichtigt, wohingegen in vorliegender Untersuchung die Problematik im Zeitraum der ersten 11 Lebenstage auftrat, später aber nicht mehr. Will man *Ec. faecium* im Rahmen der mutterlosen Aufzucht auch schon in den ersten Lebenstagen anwenden, so ist es empfehlenswert, eine regelmäßige, gleichmäßige und moderate Futteraufnahme zu gewährleisten, um die Gefahr einer Koprostase zu minimieren. Grundsätzlich scheint es aber empfehlenswert, das Probiotikum nicht zu früh einzusetzen, da eine Verschlechterung des Allgemeinbefindens zusammen mit einer geringen Futteraufnahme ein Risiko für den Aufzuchterfolg darstellt.

Die Körpertemperatur wurde als Indikator für die Reife der Welpen bestimmt. Mit zunehmender Reife nimmt die Fähigkeit der Welpen zu, eigenständig ihre Körpertemperatur zu regulieren, bzw. aufrecht zu erhalten, was auch insgesamt zu einer steigenden Körpertemperatur führt. Meyer (1998) gibt die Körpertemperatur von 7 Tage alten Hundewelpen mit Werten zwischen 35,6°C und 36,7°C an. In den eigenen Untersuchungen lag die Körpertemperatur der Welpen in der 1.

Lebenswoche über diesem Referenzwert (Tabelle 11). Der Grund dafür bestand in der Haltung der Welpen unter Wärmelampen, wodurch die Körpertemperatur maßgeblich beeinflusst wurde. Vor allem in den ersten zwei Wochen des Versuchs waren die Tiere der Wärme innerhalb der Wurfkisten kontinuierlich ausgesetzt. Dieser Einfluss wurde mit fortschreitendem Alter immer geringer, da die Welpen sich frei innerhalb des Stalles bewegen konnten und die Fähigkeit zur eigenen Temperaturregulation zunahm. So lagen die durchschnittlichen Temperaturwerte der eigenen Untersuchungen in Woche 4 innerhalb des von Meyer (1998) angegebenen Bereichs von 37,5°C bis 38,3°C für 4 Wochen alte Welpen.

Die niedrigere durchschnittliche Körpertemperatur der Probiotikumsgruppe in den ersten 6 Lebenswochen (Tabelle 11) ist ein Hinweis auf einen geringeren Entwicklungsstand im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies wird dadurch untermauert, dass sowohl die durchschnittliche Futtermittelaufnahme, als auch das durchschnittliche Gewicht der Versuchsgruppe in den ersten 6 bzw. 7 Wochen geringer war als bei der Kontrollgruppe (Tabelle 13, 12). Gewicht und Futtermittelaufnahme sind ebenfalls maßgebliche Indikatoren für den Entwicklungsstand eines Welpen. Die wöchentliche prozentuale Zunahme der Welpen ist ein Indikator für die Entwicklungsgeschwindigkeit. Da der Unterschied der wöchentlichen prozentualen Gewichtszunahme im Vergleich zur Vorwoche zwischen beiden Gruppen maximal 5,89% betrug (Tabelle 12), schien das Probiotikum diesen Parameter kaum zu beeinflussen.

Ab Woche 7 glichen sich die Körpertemperaturen beider Gruppen aneinander an. Die Versuchswelpen schienen somit ihren Entwicklungsrückstand der ersten 5 Wochen voll kompensieren zu können, da sich auch Gewicht und Futtermittelaufnahme zunehmend angleichen. Die Futtermittelaufnahme der Versuchsgruppe übertraf schließlich ab Woche 9 die der Kontrollgruppe und daraus resultierend war in den letzten drei Versuchswochen das Gewicht der Versuchsgruppe höher.

Die Körpertemperatur war außerdem zusammen mit der palpatorischen Befunderhebung an den Lymphknoten ein Parameter zur Evaluierung der Anwendungssicherheit des Probiotikums. Fieber bzw. vergrößerte Lymphknoten bei der Versuchsgruppe wären ein Indikator für eine durch das Probiotikum verursachte,

generalisierte Infektion, bzw. Sepsis oder Entzündungsreaktion gewesen. Da keiner der Welpen im Versuchszeitraum eine über den physiologischen Werten liegende Körpertemperatur zeigte, konnte eine Entzündungsreaktion bzw. Translokation der Erreger ins Blut im Rahmen einer Sepsis mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Um eine Übersiedlung des Probiotikums in den Organismus vollkommen auszuschließen, wäre allerdings zusätzlich eine mikrobiologische Untersuchung von Milz, Leber und Niere (Bernardeau et al. 2002, Shu et. al 1999), bzw. eine Bestimmung des Quotienten aus Milz- und Körpergewicht (Bloskma et al. 1979) im Rahmen des Versuchs sinnvoll gewesen. Die damit verbundene Notwendigkeit einer Tötung der Tiere stand aber im Rahmen des Versuchsziels in keiner Relation zum erwarteten Ergebnis. Außerdem ist *Ec. faecium* bei den meisten Säugetieren im Kot nachweisbar (Noble, 1978; Chenoweth und Schaberg, 1990; Leclerc et al. 1996; Devriese et al. 1992b, 1994), als normaler Bestandteil der Darmflora ist somit eine Translokation in den gesunden Organismus sehr unwahrscheinlich.

In vorliegenden Untersuchungen konnte durch *Ec. faecium* in keiner Fütterungsperiode eine signifikante Verbesserung der Futterverwertung erreicht werden. Die Futterverwertung lag jedoch in der Beifütterperiode bei der Probiotikumsgruppe immerhin um 6,5% höher. Aus den Ergebnissen ist auch ersichtlich, dass im Vergleich zum Milchaustauscher die Futterverwertung bei Beifütterung bzw., ausschließlicher Fütterung von Pedrigree® wesentlich niedriger war.

Betrachtet man die bessere Futterverwertung in der Beifütterperiode, so schien sich die Versuchsgruppe anfangs besser an eine Zulage von Pedrigree® zur Ration adaptieren zu können. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass die zur Milchsäurebildung aus sehr vielen Substraten fähigen *Ec. faecium* (siehe 2.3.1) bei der Versuchsgruppe die für Hunde schwer verdauliche Kohlenhydrate wie z.B. Zellulose, Pektine und Pentosane (Meyer, 1998) im Beifutter zur Produktion zusätzlicher Milchsäure nutzten. Diese Milchsäure kann anschließend von Organismus des Welpen über Pyruvat und Oxalacetat im Citratzyklus zur Synthese von ATP verwendet werden und steht somit dem Welpen als zusätzliche Energie bereit. Diese These wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass in der

Beifütterungsperiode der Laktatgehalt im Kot der Versuchswelpen um 24,2% höher war, als bei der Kontrollgruppe. Aufgrund dieser Beobachtungen scheint eine Anwendung des Probiotikums zur Verbesserung der Futterverwertung in der Beifütterperiode durchaus Sinn zu machen.

4.3.2. Rotes Blutbild und Thrombozyten

Die von Earl et al. (1973) angegebenen Referenzwerte und die im Rahmen des Versuchs gemessenen Werte des roten Blutbildes sind in Tabelle 37 angegeben. Daraus ist ersichtlich, dass alle gemessenen Blutwerte im bzw. sehr nahe am Referenzbereich lagen. Ein Einfluss von *Ec. faecium* auf das rote Blutbild war nicht ersichtlich und auch nicht zu erwarten, da Probiotika ihrer Natur nach nicht auf die Hämatopoese bzw. auf Erythrozyten Einfluss nehmen sollen. Das rote Blutbild war vielmehr zur Evaluierung des allgemeinen Gesundheits- und Ernährungszustand gedacht.

Tabelle 37: Referenzwerte für Beagles und Durchschnittswerte von Kontroll- und Versuchsgruppe im roten Blutbild (nach Earl et al. 1973)			
Blutbestandteile	Alter der Welpen		
	4 Wochen	8 Wochen	14 Wochen ¹
Erythrozyten in 10 ⁶ / µl			
Referenzwerte	3,6-4,9	4,5-5,9	5,3-7,7
Kontrollgruppe Ø	4,87	6,11	6,51
Versuchsgruppe Ø	4,84	5,59	6,51
Hämoglobinkonz.in mmol/l			
Referenzwerte	5,28-7,01	6,39-7,76	7,82-11,42
Kontrollgruppe Ø	5,73	6,61	8,35
Versuchsgruppe Ø	5,81	6,05	8,37
Hämatokrit in l/l Blut:			
Referenzwerte	0,270-0,330	0,310-0,390	0,380-0,550
Kontrollgruppe Ø	0,288	0,332	0,387
Versuchsgruppe Ø	0,290	0,302	0,390

¹ = die Referenzwerte wurden für „junge reinrassige Beagles“ angegeben.

Obwohl durch Zusatz des Mineralfutters eine ausreichende Eisenversorgung gewährleistet war, hätte durch die regelmäßigen Blutentnahmen bei den Welpen eine Anämie auftreten können, was sich im Blutbild in einer Verminderung der Hämoglobinkonzentration, des Hämatokrit und der Erythrozytenzahlen geäußert hätte.

Die Thrombozytenzahlen wurden zur Erfassung des allgemeinen Gesundheitszustandes der Welpen bestimmt. Hätte das Probiotikum bei der Versuchsgruppe ein septisches, bzw. entzündliches Geschehen ausgelöst, so wäre z.B. eine auf dissimierter intravasaler Gerinnung basierende Thrombozytopenie die Folge gewesen. Die Thrombozytenzahlen der Welpen lagen jedoch in der 4. und 8. Woche sogar über den angegebenen Referenzwerten (Tabelle 38).

Tabelle 38: Referenzwerte für Beagles und Durchschnittswerte der Thrombozyten im Blut von Kontroll- und Versuchsgruppe			
	Alter der Welpen		
	4 Wochen	8 Wochen	Woche 14 ¹
Thrombozyten in 10 ³ / µl			
Referenzwerte	130-360	240-435	210-612
Kontrollgruppe Ø	422,25	511,17	462,67
Versuchsgruppe Ø	392,62	439,50	404,83

¹ = die Referenzwerte wurden für „junge reinrassige Beagles“ angegeben.

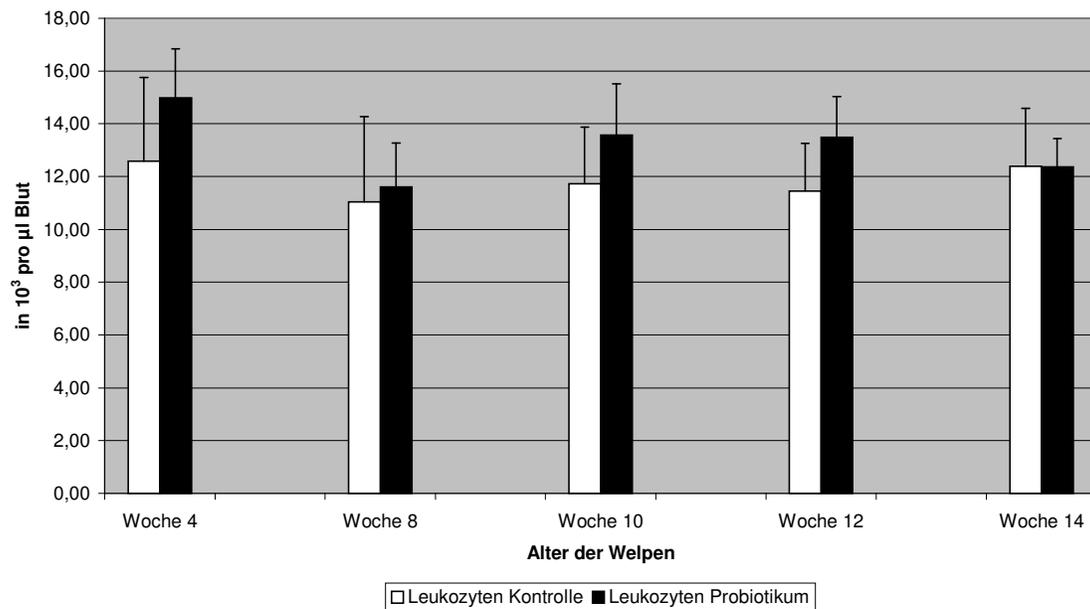
4.3.3. Weißes Blutbild und Immunglobuline

Die Untersuchung der Leukozytenzahlen im peripheren Blut ist unter dem Gesichtspunkt zu sehen, dass das Blutplasma von den weißen Blutkörperchen lediglich als Transportmedium von Weg der Bildungsstätte zum Ort der Wirkung und des Untergangs genutzt wird. Wenn viele Leukozyten verbraucht werden, so müssen nicht unbedingt auch viele im Blut vorhanden sein (Kraft und Dürr 1999). Trotz dieser Tatsache wird das weiße Blutbild in Klinik und Wissenschaft zur Diagnose immunologischer, entzündlicher und infektiöser Prozesse genutzt.

Bei beiden Gruppen muss man außerdem die Tatsache berücksichtigen, dass die angegebenen Leukozytenzahlen aufgrund durch die Blutentnahme verursachten Stresses durch Aktivierung des marginalen Leukozytenpools höher sein können als in Ruhe (Kraft und Dürr 1999).

Um die bis zur Woche 12 höhere durchschnittliche Leukozytenzahl der Versuchsgruppe (Abb. 3) auf eine eventuelle Wirkung des Probiotikums zurückzuführen, müssen wie in folgendem die Ergebnisse der einzelnen Leukozytenarten und deren mögliche Interaktion mit dem Probiotikum diskutiert werden.

Abb.3: Durchschnittliche Leukozytenzahlen der Kontroll- und Probiotikumsgruppe



Der Gastrointestinaltrakt ist die wichtigste Eintrittsquelle für fremde Antigene. Dabei induzieren mikrobielle Antigene wie das Probiotikum eine intensivere Immunantwort als z.B. im Futter enthaltene Fremdproteine (Tizard, 2000). Diese Mikroorganismen können über die intestinale Mukosa in den Organismus gelangen, werden aber meist in den Mesenteriallymphknoten und der Leber abgefangen. Auch intraepithelial können Antigene entweder innerhalb von Enterozyten durch Lysosomen degradiert, bzw. in sogenannten m-Zellen direkt den intraepithelialen Lymphozyten präsentiert

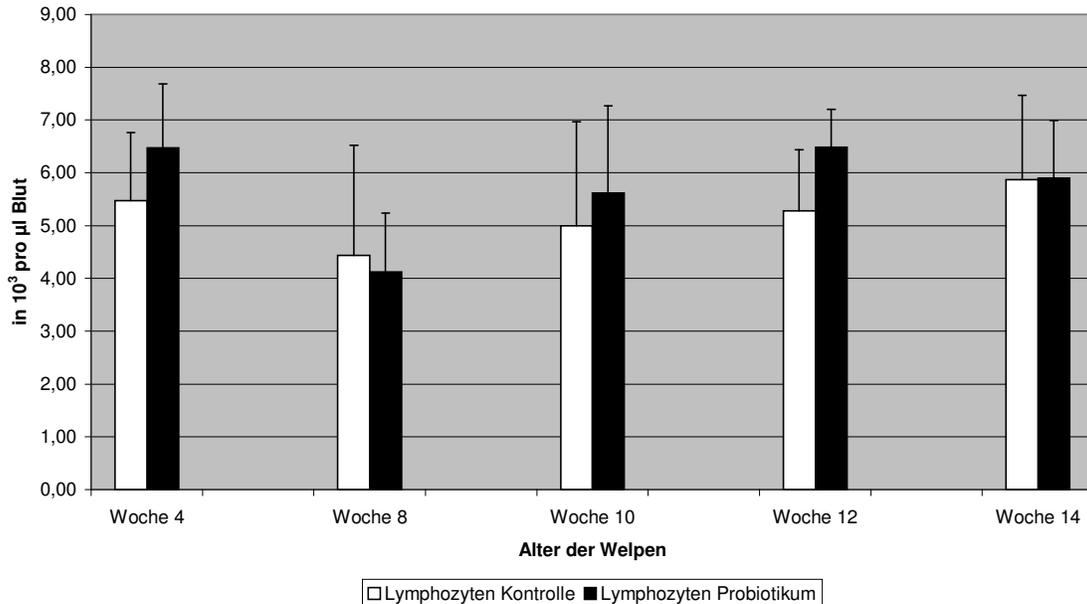
werden. Dies geschieht durch Antigen-präsentierende Zellen wie z.B. die sich aus Monozyten differenzierenden Makrophagen. Die Monozytenwerte waren bei den Versuchswelpen in Woche 4, 10 und 12 höher und fielen im Woche 14 unter das Niveau der Kontrollgruppe, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Trotzdem könnte das Probiotikum einen höheren Bedarf an diesen antigenpräsentierenden und phagozytierenden Zellen hervorgerufen und somit bei den Versuchswelpen zu höheren Monozytenzahlen geführt haben.

T-Helfer Zellen aus der Reihe der Lymphozyten können anschließend an präsentiertes Antigen binden und in aktiviertem Zustand bei ebenfalls an das Antigen gebundenen B-Lymphozyten deren Ausdifferenzierung in Plasmazellen bewirken.

Die Versuchsgruppe wies in den Wochen 4, 10 und 12 eine höhere durchschnittliche Lymphozytenzahl auf, die sich dann bis Woche 14 an das Niveau der Kontrollgruppe anglich (Abb. 4). Obwohl die Unterschiede kein Signifikanzniveau erreichten, deutet die höhere Lymphozytenzahl einerseits auf eine stärkere Immunantwort durch Gabe des Probiotikums hin, andererseits spielte bei beiden Gruppen sicherlich die Applikation des hSa bzw. der Impfung nach den Wochen 8 und 12 eine Rolle. Die Lymphozytenzahlen stiegen nämlich nach Applikation des hSa bzw. der Impfung (Woche 8) in Woche 10 und 12 an, bei der Versuchsgruppe stieg dabei die Zahl stärker an als bei der Kontrolle. Eine stärkere Immunantwort auf die Impfung, bzw. das hSa könnte ebenfalls durch das Probiotikum bewirkt worden sein. Nach Boosterung in Woche 12 mit Impfstoff bzw. hSa stieg bei der Kontrollgruppe die Lymphozytenzahl im Woche 14 noch weiter an während sie bei der Versuchsgruppe von hohem Niveau ausgehend sich an die Lymphozytenzahl der Kontrollgruppe anglich.

Es bleibt natürlich die Frage inwieweit schon maternale Antikörper gegen *Ec. faecium* bei den Welpen vorhanden waren. Diese hätten die Entwicklung einer lymphozytären Immunantwort gegen das Probiotikum in den ersten Wochen bei den Welpen vermindert. Eine Antikörperbestimmung aus den Kolostrum der Mutter zur Abklärung dieses Sachverhaltes wäre sinnvoll gewesen, wurde aber aus technischen Gründen nicht durchgeführt.

Abb. 4: Durchschnittliche Lymphozytenzahlen der Kontroll- und Probiotikumsgruppe



Die aus den B-Lymphozyten entstandenen Plasmazellen produzieren Antikörper, die das Antigen opsonisieren können. Bei den Welpen wurde sowohl Gesamt-IgG und IgA als auch der Titer spezifischer Antikörper gegen hSa bestimmt.

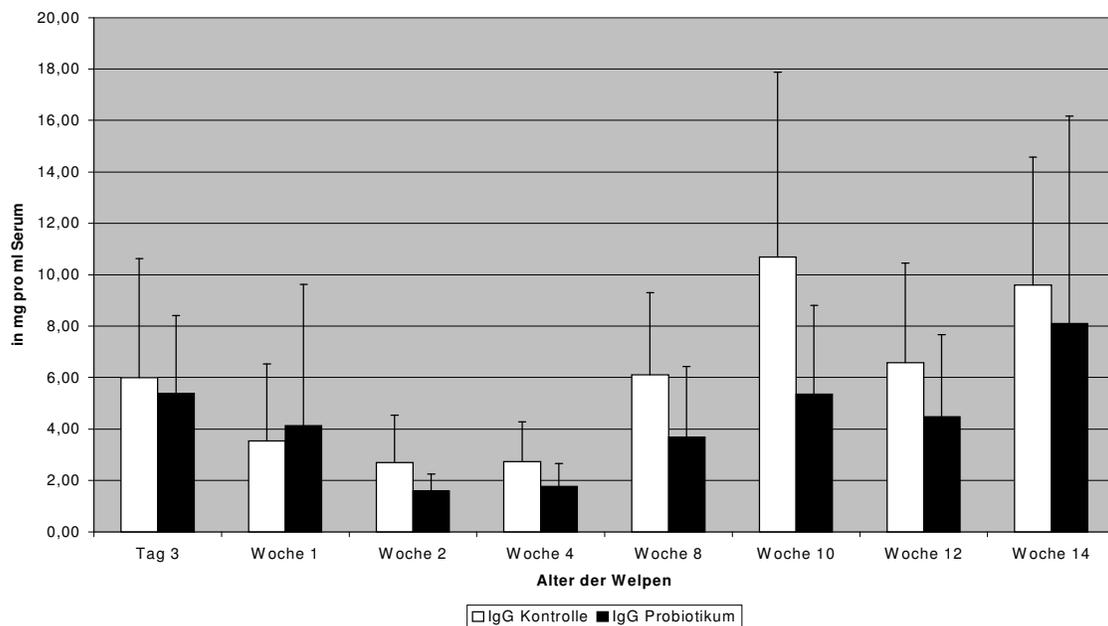
Der Tag 3-Gehalt an IgG und IgA im Serum der Welpen wurde maßgeblich durch die aufgenommene Menge an Kolostrum beeinflusst. Bei beiden Gruppen lagen sowohl IgG als auch IgA Werte zu diesem Zeitpunkt nahe beieinander, somit waren gleiche Voraussetzungen für die Entwicklung der Immunglobulingehalte im Blut der Tiere gegeben. Die hohe Standardabweichung bei IgG an Tag 3 deutet darauf hin, dass es bei der Menge aufgenommenen Kolostrums zwischen den Einzeltieren größere Unterschiede gab.

Das Absinken der IgA Konzentration bis zur Woche 1 bzw. der IgG Konzentration bis Woche 2 ist durch Abbauprozesse der passiv erworbenen Antikörper bedingt (Tizard, 2000). Anschließend stiegen die Gehalte an Immunglobulinen wieder, da deren Abbau durch die Produktion eigener Antikörper bei den Welpen kompensiert wurde. Nach Applikation der Impfung und des hSa in Woche 8 stieg in Woche 10 der IgG Gehalt im Serum der Tiere an. Außerdem war erstmals ein Titer von Antikörpern

gegen hSa messbar. In diesem Zusammenhang wäre weiterhin eine Bestimmung der IgM Konzentration im Serum der Welpen von Interesse gewesen, da die Konzentration dieser Immunglobuline nach Erstkontakt mit einem Antigen in hohem Maße ansteigt (Lösch et al. 2000) und in diesem Zusammenhang als sensitiver Immunparameter besonders geeignet ist. IgG wird vermehrt nach weiterem Antigenkontakten gebildet und so ist es nicht verwunderlich, dass in Woche 14 dessen Gehalt nach Applikation der Boosterimpfung bzw. des hSa in Woche 12 nochmals bei beiden Gruppen kräftig ansteigt. Die Konzentration von IgA schien hingegen durch die Impfung und das hSa nur sehr gering beeinflusst worden zu sein. Schwierig nachzuvollziehen ist, warum die IgG Konzentration bei den Versuchswelpen ab Woche 2 durchgehend niedrigere Werte aufwies (Abb. 5). Auch die prozentualen Anstiege von IgG nach der Impfung bzw. Boosterung ergeben ein uneinheitliches Bild. So stieg der Gehalt an IgG nach der ersten Impfung bis Woche 10 um 74,8% (Kontrolle) bzw. 50,0 % (Probiotikum) bei der Boosterung in Woche 12 waren die Verhältnisse in Woche 14 mit 46,1% bei der Kontrolle und 81,2% bei der Probiotikumsgruppe quasi umgekehrt. Die geringen Unterschiede zwischen den Gruppen beim Antikörper-Titer gegen humanes Serumalbumin wiesen auf eine geringe Beeinflussung dieses Parameters durch das Probiotikum hin. Den Gehalt zirkulierender IgG im Blut der Welpen schien das Probiotikum hingegen negativ zu beeinflussen, was unter Berücksichtigung des kritischen Immunstatus von Hundewelpen in den ersten Lebenswochen als problematisch anzusehen ist. IgA wird als Immunantwort vor allem lokal auf Schleimhäuten sezerniert (Löschner et al. 2000), ist aber auch im Serum vorhanden. Die Tatsache, dass die Probiotikumsgruppe in Woche 2 und 4 höhere Serum IgA-Werte aufwies als die Kontrollgruppe, könnte ein Hinweis auf eine Stimulierung der Schleimhautimmunität durch das Probiotikum sein, da dieses im gesamten Verdauungstrakt mit der Schleimhautoberfläche in Kontakt kam und dort eine Immunantwort induzieren konnte. Schreiber et al. (1992) geben für 34 bis 44 Wochen alte Beagles IgG Werte zwischen 4,57 mg/ml und 9,16 mg/ml und IgA Werte zwischen 0,260 und 1,480 mg/ml Serum an. Die Werte der eigenen Untersuchungen nähern sich diesen Referenzbereichen erst mit zunehmender eigener Antikörperproduktion der Welpen an. Dies ist für IgA ab Woche 4, für IgG ab Woche 8 der Fall.

Mit Antikörpern bzw. Komplementkomponenten (z.B. C3b) opsonisiertes Antigen kann von neutrophilen Granulozyten durch Phagozytose zerstört werden. Die durchschnittliche Zahl der neutrophilen Granulozyten war mit Ausnahme von Woche 14 bei den Versuchswelpen kontinuierlich höher, wenn auch nicht signifikant. Dies könnte eine durch das Probiotikum ausgelöste erhöhte Phagozytoseaktivität als Ursache haben. Die Zahl neutrophiler Granulozyten stieg nach Applikation des hSa bzw. der Impfung (Woche 8) analog der Lymphozytenzahl in Woche 10 bei beiden Gruppen an, sank dann aber im Gegensatz zur Zahl der Lymphozyten in Woche 12 wieder ab. Der Grund dafür ist, dass neutrophile Granulozyten lediglich akut an der unspezifischen Abwehr beteiligt sind. 4 Wochen nach Applikation einer begrenzten Menge Antigen war die Zahl der neutrophilen Granulozyten deshalb schon wieder abgesunken. Nach Boosterung in Woche 12 stieg die Zahl der Neutrophilen bei der Kontrollgruppe in Woche 14 nochmals leicht an, bei der Probiotikumsgruppe glich sie sich analog der Lymphozyten an das Niveau der Kontrolle an (Abb. 6).

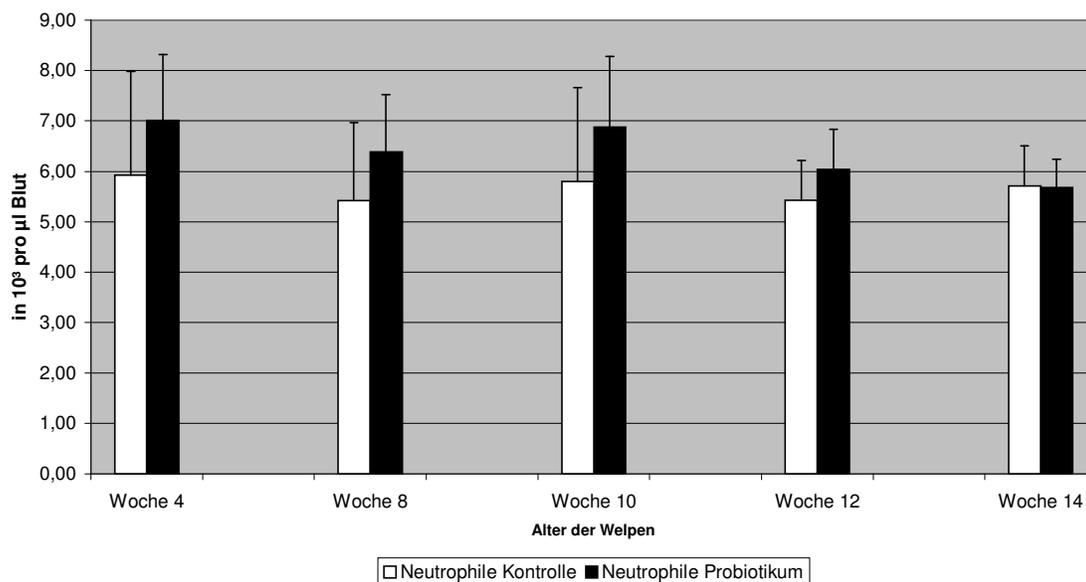
Abb. 5: Durchschnittlicher IgG Gehalt bei Kontroll- und Probiotikumsgruppe



Die Bestimmung der eosinophilen und basophilen Granulozyten erfolgte zum Zweck der Evaluierung einer potentiellen allergenen Wirkung des Probiotikums. Keine der beiden Granulozytenarten war bei der Versuchsgruppe übermäßig erhöht. Auch

sonstige Zeichen einer allergenen Wirkung waren bei den Welpen nicht zu beobachten. Bei beiden Gruppen bewegten sich die durchschnittlichen Werte im Referenzbereich (Earl et al. 1973) bei teils hohen Schwankungen (Anhang, Tabelle A und B). Sicherlich wurde die Zahl der eosinophilen und basophilen Granulozyten dadurch beeinflusst, dass fast alle Tiere von Geburt an mit Spulwürmern (*Toxocara canis*) infiziert waren.

Abb. 6: Durchschnittliche Anzahl neutrophiler Granulozyten bei Kontroll- und Probiotikumsgruppe

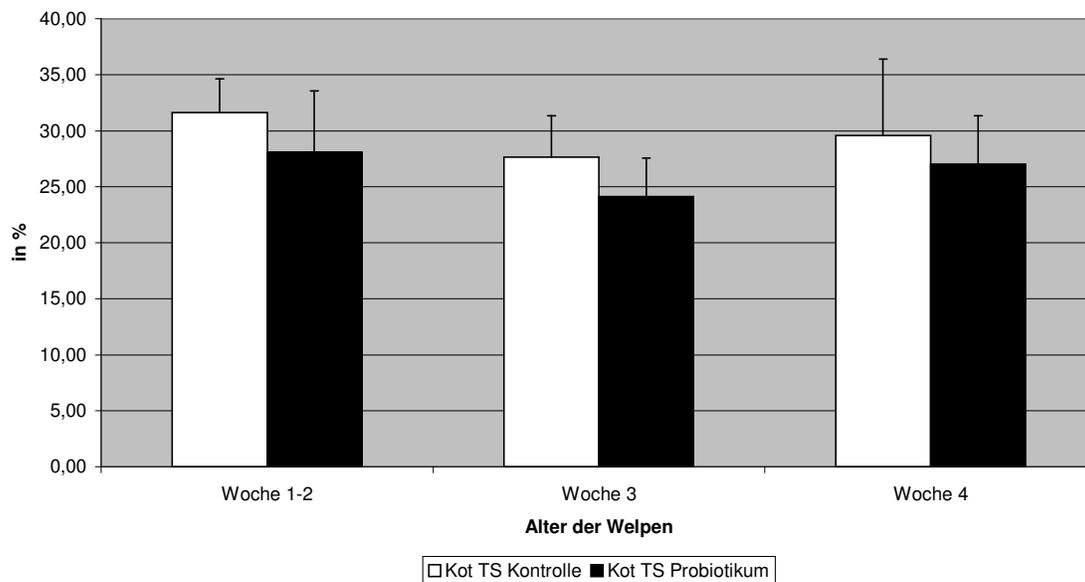


4.3.4. Kottrockensubstanz

Dass während der gesamten Milchaustauscherperiode die Probiotikumsgruppe eine durchgehend niedrigere Trockensubstanz im Kot aufwies (Abb.7), ist eventuell auf den Zusatz des Probiotikums zum Milchaustauscher zurückzuführen. Die subjektiv erfolgte Beurteilung der Kotkonsistenz bestätigte dies, da der Kot der Versuchswelpen während der ersten 4 Wochen durchschnittlich flüssiger war. Über den Einfluss von Probiotika auf die Trockensubstanz des Kotes beim Hund gibt es bisher kaum Veröffentlichungen. Swanson et al. (2002) beobachteten mit Zugabe von 2 g Sucrose und 10^9 KbE *Lb. acidophilus* zu Trockenfutter (2 x täglich) bei adulten Hunden eine durchschnittliche Erhöhung der Trockensubstanz im Kot um 2% bzw. 1,1%. Berechnet man zum Vergleich in den eigenen Untersuchungen den

Durchschnitt der Trockensubstanz beider Gruppen in der Absatzperiode (ab Woche 8), so ergibt sich hingegen eine um 1,96% niedrigere Trockensubstanz bei der Probiotikumsgruppe. Simpson et al. (2002) geben als durchschnittliche Trockensubstanz im Kot bei Hunden 33,2% bei Gabe von Kontrollfutter und 27,5% bei Verabreichung einer Rohfaser-reichen Diät an. Die Werte in den eigenen Untersuchungen liegen zwischen 20,48% und 37,83% (Kontrolle) bzw. 20,33% und 32,70% (Probiotikum).

Abb.7: Durchschnittliche Kot Trockensubstanz (TS) bei Kontroll- und Probiotikumsgruppe während Milchaustauscherfütterung



4.3.5. Mikrobiologische Kotuntersuchung

Der Vergleich der im Rahmen der Untersuchungen erhaltenen Keimzahlen mit Werten aus der Literatur gestaltet sich schwierig, da wenige Publikationen über die Wirkung von Probiotika auf die gastrointestinale Mikroflora des Hundes vorhanden sind. Außerdem reagieren Hunde auf Änderungen in der Futterzusammensetzung z.T. mit erheblichen Verschiebungen innerhalb der Intestinalflora (Meyer 1998), so dass Veränderungen nur sehr schwierig auf einzelne Faktoren, wie etwa die orale Applikation von Probiotika zurückzuführen sind. Die Tatsache dass die mikrobiologischen Proben erst nach maximal 60 Minuten verarbeitet wurden trägt zusätzlich zu möglichen Verschiebungen bei den Keimzahlen bei.

Da Clostridien, Enterokokken und Laktobazillen nur bei einem bestimmten Anteil der Tiere überhaupt nachgewiesen wurden, wurde auch der Prozentsatz der Nachweispositiven Tiere bzw. deren durchschnittlich nachgewiesene Keimzahl im Ergebnisteil angegeben. Die Angabe durchschnittlicher Keimzahlen der positiven Tiere erfolgte aufgrund der Überlegung, dass ein evtl. methodisch bedingtes Vorhandensein falsch-negativer Proben sonst bei Einbeziehung der negativen Proben in die Errechnung des Durchschnittswertes eine falsche durchschnittliche Keimzahl ergeben hätte. Andererseits war auch die Angabe der durchschnittlichen Keimzahl aller Tiere notwendig, da ja evtl. einige Tiere tatsächlich Keim-negativ waren und somit in die Durchschnittsberechnung mit einbezogen werden mussten. Auf eventuelle Diskrepanzen die durch die Interpretation beider Durchschnittszahlen hervorgerufen werden, wird bei der Diskussion der jeweiligen Keimzahlen eingegangen.

4.3.5.1. Aerobe Gesamtkeimzahl

Die aerobe Gesamtkeimzahl war bei der Probiotikumsgruppe zu Versuchsbeginn, in der Milchaustauscherperiode und in der Absatzperiode durchschnittlich um mindestens 56,6% höher. Da *Ec. faecium* grundsätzlich die Darmpassage überlebt und im Kot nachgewiesen werden kann (Netherwood et al. 1999, Devriese 1992b, 1994) und außerdem auch unter aeroben Bedingungen wächst, schien die Zufuhr des Keims in Form eines Probiotikums an einer Erhöhung der aeroben Keimzahl beteiligt zu sein. Außerdem trug die absolute Anzahl an *E. coli* zu Versuchsbeginn und in der Milchaustauscher-Periode zu einer Erhöhung der Gesamtkeimzahl bei der Versuchsgruppe bei. Die Aussagekraft der Ergebnisse wird durch die hohe Streuung der Einzelwerte bei der Gesamtkeimzahl relativiert, außerdem erreichten die Unterschiede zu keinem Zeitpunkt Signifikanzniveau.

In der Beifutterperiode kam es außerdem zu einem plötzlichen Abfall der Gesamtkeimzahl bei den Versuchswelpen. Dies kann eventuell durch die Futterumstellung im Form der Zufütterung von Pedrigree® erklärt werden. Auch das Probiotikum könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, da die Kontrollwelpen eine mit dem Alter kontinuierlichen Abfall der Gesamtkeimzahl ohne diesen plötzlichen Einbruch zeigten.

Benno et al. (1992) geben die durchschnittliche Keimzahl bei unter 12 Monate alten Beagles mit 3162 Mio. KbE / g Kot im Rektum an. Dies entspricht von der Größenordnung her den an Versuchsanfang gemessenen Durchschnittswerten. Bei Amtsberg et al. (1989) schwanken unter verschiedenen Futterrationen die aerobe Gesamtkeimzahl im Fäzes bei einzelnen Hunden zwischen 20 Mio. und 630 957 Mio., bei Simpson et al. (2002) abhängig von Alter, Rasse und Fütterung zwischen 1148 Mio. und 3019 Mio. KbE, in den eigenen Untersuchungen zwischen 68 Mio. und 8100 Mio. KbE pro g Kot (Anhang, Tabelle C).

4.3.5.2. Nachweis von E. coli

Amtsberg et al. (1989) geben im Kot einzelner Hunde je nach Fütterung E. coli Zahlen zwischen 0,1 Mio. und 3162 Mio./ g Kot an, Swanson et al. (2002) durchschnittlich 47 Mio. KbE bei Kontrollhunden und 45 Mio. KbE/ g Kot bei Probiotikumsfütterung. In den eigenen Untersuchungen schwankten die Einzelwerte zwischen 0,4 Mio. und 5600 Mio. E. coli /g Kot (Anhang, Tabelle D).

Entscheidend für das Gleichgewicht der Darmflora ist aber auch der prozentuale Anteil von E. coli an der Gesamtkeimzahl. Die Probiotikumgruppe wies in den eigenen Untersuchungen abgesehen vom Versuchsbeginn niedrigere prozentuale Anteile dieses Keims an der aeroben Gesamtkeimzahl auf. Obwohl die Unterschiede nicht signifikant waren, ist es durchaus möglich, dass das Probiotikum zur Senkung dieses Anteils an E. coli beigetragen hat. *Ec. faecium* kann nämlich die Adhäsion von E. coli an Darmmucin signifikant hemmen (Jin et al. 2000). Spieler (1995) postuliert in diesem Zusammenhang einen synergistischen Hemmmechanismus. Die Schwere von durch E. coli verursachten Erkrankungen kann durch *Ec. faecium* gesenkt werden (Underdahl et al. 1982).

Eine Senkung des E. coli Anteils ist vor allem beim Welpen wünschenswert, da Colikeime geeignet sind, die für Welpen besonders gravierenden Krankheiten der caninen Parvovirose oder Staupe zu komplizieren (Mayr und Rolle 2002). Insgesamt erreichte der Anteil an E. coli in den eigenen Untersuchungen teilweise sehr hohe

Werte (Anhang, Tabelle E), in der Literatur sind hingegen nur geringe prozentuale Anteile von *E. coli* an der aeroben Gesamtkeimzahl beim Hund beschrieben. So ist bei Swanson et al. (2002) der Anteil an *E. coli* bei Kontrollhunden 1,86%, bei mit Probiotikum supplementierten Hunden 3,80%. Diese Werte beziehen sich allerdings auf adulte Hunde. Bei Neonaten erfolgt die Etablierung der gastrointestinalen Mikroflora in Beziehung zur unmittelbaren Umwelt, so z.B. durch die mit 10^8 Keimen/ml stark keimhaltige Kolostralmilch. In den ersten Lebenstagen dominieren coliforme Bakterien zusammen mit Streptokokken und Clostridien das mikrobielle Milieu und erst nach Absetzen vom Muttertier entwickelt sich langsam die typische Flora des adulten Tieres. (Mayr und Rolle 2002). Somit scheint ein hoher Anteil an *E. coli* nicht ungewöhnlich zu sein, außerdem waren durch die mutterlose Aufzucht die Voraussetzungen zur Etablierung einer „hundetypischen“ Mikroflora sicherlich gestört. Vielmehr wurde die Mikroflora wohl maßgeblich durch Milchaustauscher, Beifutter, Probiotikum und den Kontakt mit den Doktoranden beeinflusst.

4.3.5.3. Nachweis von *Cl. perfringens*

Cl. perfringens zählt beim Hund zur normalen Darmflora. Bei negativen Einflüssen seitens der Fütterung kann der Erreger an der Genese von Diarrhöen mitwirken. Der Proteingehalt des Futters korreliert nachweislich mit der im Darminhalt nachweisbaren Clostridienzahl und führt auch zu einer Steigerung der Enterotoxinbildung (Mayr und Rolle 2002). Somit ist vor allem aufgrund der Toxinbildung und der Gefahr von Durchfallerkrankungen ein möglichst niedriger Gehalt an *Cl. perfringens* im Kot von Hundewelpen wünschenswert. Der Anteil *Cl. perfringens* positiver Tiere war während des gesamten Versuches bei der Probiotikumsgruppe niedriger.

Die *Cl. perfringens* positiven Probiotikumstiere wiesen grundsätzlich höhere durchschnittliche Keimzahlen des Erregers im Kot auf als die positiven Kontrolltiere. Bezieht man die durchschnittliche Keimzahl allerdings auf alle Tiere, so ist lediglich in der Beifutter- und Absatzperiode die durchschnittliche Anzahl etwas höher. Bei den Clostridien ist es durchaus möglich, dass negative Tiere tatsächlich keine Clostridien im Kot aufwiesen, dann wäre bei der Auswertung eigentlich nur die durchschnittliche

Zahl bezogen auf alle Tiere einer Gruppe zu berücksichtigen, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. Aber auch falsch negative Ergebnisse sind möglich, wenn die ursprüngliche Clostridienzahl sehr niedrig war, so dass nach 60 Minuten keine Clostridien mehr nachzuweisen waren. Clostridien sind nämlich sehr empfindlich und weisen eine exponentielle Absterbekurve in aerobem Milieu auf. Die absolute Zahl der nachgewiesenen Clostridien ist somit stark zeitabhängig und deshalb nur schwer verwertbar. Berücksichtigt man jedoch, dass für alle Proben dieselben Voraussetzungen galten, so ist ein Vergleich der Gruppen untereinander durchaus zu rechtfertigen.

So kann die niedrigere Anzahl *Cl. perfringens* positiver Tiere bei der Versuchsgruppe durchaus auf eine Wirkung des Probiotikums zurückzuführen sein, da *Ec. faecium* fähig ist, die Adhäsionsfähigkeit von *Cl. perfringens* an canines Darmmucin signifikant zu reduzieren (Rinkinen et al. 2003). Bei der Maus führt die Applikation probiotischer Laktobazillen ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion von *Cl. perfringens* (Gallaher et al. 1996, O' Mahony et al. 2001). In der Milchaustauscherperiode konnten bei keinem der Versuchswelpen *Cl. perfringens* nachgewiesen werden. Benno et al. (1992) geben für junge Beagles Durchschnittswerte von 0,39 Mio. KbE und für erwachsene 630 Mio. KbE *Cl. perfringens* pro g Kot an. Bei Amtsberg et al. (1989) schwanken die Werte beim Einzelhund je nach Fütterung zwischen 31 Mio. und 10 000 Mio. KbE /g Kot, bei Simpsons et al. (2002) zwischen 5,6 und 20,9 Mio. je nach Fütterung, Rasse und Alter. In den eigenen Untersuchungen wurden beim Einzeltier zwischen 1 Mio. und 730 Mio. KbE/ g Kot gemessen (Anhang, Tabelle F).

4.3.5.4. Nachweis von Enterokokken

Nicht bei allen Tieren wurden Enterokokken nachgewiesen. Zu Versuchsanfang war es durchaus möglich, dass der Kot mancher Tiere keine Enterokokken beherbergte, weil sie damit in so jungem Alter noch nicht in Kontakt gekommen waren, bzw. das Probiotikum noch nicht im Kot angekommen war. In diesem Fall muss man die durchschnittliche Keimzahl auf alle Tiere einer Gruppe beziehen, um unverfälschte Ergebnisse zu erhalten.

In der Beifutterperiode wies die Tatsache, dass 1 Tier Enterokokken-negativ war allerdings auf einen methodischen Fehler bei der mikrobiologischen Untersuchung hin, da *Ec. faecium*, das kontinuierlich appliziert wurde, die Darmpassage überlebt und so im Kot vorhanden sein musste. Unter diesen Umständen darf man die durchschnittlichen Keimzahlen pro Tier lediglich auf die Enterokokken-positiven Tiere beziehen, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

Bezieht man also abgesehen von der Beifutterperiode die durchschnittlichen Enterokokkenzahlen grundsätzlich auf alle Welpen einer Gruppe, so wies die Probiotikumsgruppe höhere durchschnittliche Enterokokkenzahlen auf, besonders groß ist der Unterschied hierbei in der Absatzperiode. Obwohl die Unterschiede nicht signifikant waren, könnte die höhere Enterokokkenzahl bei der Probiotikumsgruppe dennoch durch die kontinuierliche Gabe von *Ec. faecium* verursacht worden sein, da *Ec. faecium* die Darmpassage überlebt. Die Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Molitor (1996), der sowohl bei *Ec. faecium* Gabe mit Milchaustauscherfütterung bzw. Trockenfutter höhere Enterokokkengehalte im Kot von Welpen bzw. adulten Hunden nachwies. Im Rahmen des Versuchs wäre eine Untersuchung der Enterokokkenzahl bei den Versuchswelpen nach Absetzen des Probiotikums noch interessant gewesen, um herauszufinden, ob sich der Keim im Intestinum des Hundes ansiedelt, was aber laut Molitor (1996) und Zentek et al. (1998) beim Hund nicht anzunehmen ist.

Molitor gibt als Enterokokkenzahl im Kot beim Hund ohne Zulage von *Ec. faecium* zwischen 0,016 und 0,85 Mio. KbE und mit Zulage von *Ec. faecium* zwischen 263 Mio. und 562 Mio. KbE / g Kot an. Simpson et al. (2002) geben ohne Fütterung von Probiotika je nach Alter, Rasse und Fütterung beim Hund zwischen 4,7 Mio. und 11,2 Mio. KbE/g Kot an. Bei den eigenen Untersuchungen ergaben sich teils hohe Schwankungen bei der Enterokokkenzahl (Anhang, Tabelle G).

4.3.5.5. Nachweis von Laktobazillen

Die Probiotikumsgruppe wies in jeder untersuchten Periode höhere durchschnittliche Laktobazillenzahlen auf, und zwar sowohl bezogen auf die Nachweis-positiven, als auch auf alle Tiere einer Gruppe. Auch war der Anteil der Laktobazillen-positiven Tiere außer während der Beifütterung bei den Versuchswelpen höher. Obwohl die Unterschiede nicht signifikant waren, könnten diese Beobachtung auf die Wirkung des Probiotikums zurückzuführen sein, da *Ec. faecium* durch seine Speziescharakteristika bedingt zur Etablierung einer Laktoflora beitragen kann. Die Anzahl der *Lactobacillus*-positiven Tiere sank bei beiden Gruppen kontinuierlich mit dem Alter ab, so daß die Aufrechterhaltung der Laktoflora durch Wegfall der Fütterung mit Milchaustauscher und Zugabe des Beifutters wohl negativ beeinflusst wird. Allerdings konnten Benno et al. (1992) und Mitsuoka et al. (1976) bei allen ihren untersuchten jungen und adulten Beagles Laktobazillen im Kot nachweisen.

Eine weitere Erklärung für das Vorhandensein *Lactobacillus*-negativer Tiere wäre in einem methodischer Fehler zu suchen, wie etwa der mangelnden Sensitivität der Nachweismethode, dem Absterben der Keime. bzw. einer Überwucherung mit anderen Keimen im Kot, da dieser erst nach maximal 60 Minuten mikrobiologisch verarbeitet war. Somit sind zumindest die absoluten Laktobazillenzahlen schwer zu interpretieren, allerdings rechtfertigt die Tatsache, dass alle Proben gleich behandelt wurden, einen Vergleich zwischen den Gruppen.

Benno et al. (1992) geben als Durchschnittswerte für Hunde Laktobazillen-Zahlen von 1000 Mio. KbE bei jungen und 200 Mio. KbE /g Kot bei adulten Tieren an. Unter Einfluss verschiedener Futterrationen schwanken die Zahlen an Lb. in den Untersuchungen von Amtsberg et al. (1989) zwischen 19 Mio. und 12 589 Mio. KbE / g Kot, bei Simpson et al. (2002) abhängig von Rasse, Alter und Fütterung zwischen 1698 Mio. und 3630 KbE/g Kot. In den eigenen Untersuchungen zeigten sich bei den Einzeltieren Werte zwischen 0 und 1800 Mio. KbE/ g Kot (Anhang, Tabelle H). Die durchschnittlichen Werte an Lb. sanken in beiden Gruppen mit dem Alter ab, was wohl auf eine Veränderung der Futterzusammensetzung zurückzuführen ist, da der am Anfang gefütterte Milchaustauscher sehr viele Lb. enthält.

4.3.5.6. Spezifische nachgewiesene Keime

Der in den eigenen Untersuchungen am häufigsten und mit den höchsten durchschnittlichen Keimzahlen im Kot nachgewiesene Keim war *Sc. bovis*. Auch in den Untersuchungen von Davis et al. (1977) war *Sc. bovis* der dominierende Keim im Intestinum von Beagles, im Kolon konnten bis zu 30 000 Mio. KbE/ g Gewebe und Darminhalt Trockensubstanz nachgewiesen werden. Auch die in den eigenen Untersuchungen aus dem Kot nachgewiesenen Keime *Lb. acidophilus*, *Ec. faecium*, *Ec. faecalis*, *Lb. fermentum* und *Proteus mirabilis* konnten Davis et al. (1977) aus dem Intestinum von Beagles isolieren, so dass diese Keime als Bestandteile der normalen caninen Darmflora angesehen werden können. Balish et al. (1977) isolierten oben genannte Keime auch aus dem Kot von Beagles, zusätzlich fanden sie *Citrobacter freundii*, die gelegentlich bei Infektionen von Mensch und Tier vorkommen (Mayr und Rolle 2001) und *Cl. putrificium*. In den eigenen Untersuchungen nachgewiesene *Ec. avium* wurden auch von Devriese et al. (1992a) als Bestandteil der Analfloora beim Hund gefunden.

Die am häufigsten aus dem Kot von Hunden isolierten Streptokokken bzw. Enterokokkenspezies waren in den eigenen Untersuchungen und den Untersuchungen von Weisser (1981) identisch (Tabelle 39).

Auffällig war im Vergleich der spezifisch nachgewiesenen Keime zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe, dass der Anteil *Ec. faecalis* positiver Tiere bei der Kontrollgruppe höher war, der Anteil der *Ec. faecium* positiven Tiere aber bei der Versuchsgruppe (Tabellen 34, 39). Dies deutet auf eine Verschiebung der Darmflora bei der Versuchsgruppe von *Ec. faecalis* zugunsten von *Ec. faecium* hin, die eventuell durch die Gabe des Probiotikums verursacht wurde. Auch Netherwood et al. (1999) beobachteten bei *Ec. faecium* Gabe eine Beeinflussung der Anzahl von *Ec. faecalis* und vermuten als Grund dafür, dass beide Keime dieselbe ökologische Nische im Darm besetzen.

Tabelle 39: Am häufigsten aus dem Kot von Hunden isolierte Streptokokken- bzw. Enterokokkenarten in den eigenen Untersuchungen und denen von Weisser (1981).				
	Weisser (1981)	eigene Untersuchungen		
Keim	Anteil positiver Proben in %	Anteil positiver Proben in % (Kontrolle)	Anteil positiver Proben in % (Probiotikum)	Anteil positiver Proben gesamt
Sc. bovis	35	58,3	45,8	52,1
Ec. faecalis	16	34,5	12,5	23,5
Ec. faecium	18	20,8	37,5	29,2
Ec. durans	18	8,3	8,3	8,3

4.3.6. L-Laktat im Kot

In der Milchaustauscherperiode war der durchschnittliche Laktatgehalt im Kot der Probiotikumswelpen im Vergleich zur Kontrollgruppe um 23,4% niedriger, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. In einer ähnlichen Untersuchung konnte Molitor (1996) bei Milchaustauscherfütterung von Welpen bei mit *Ec. faecium* supplementierten Tieren einen um 10,0% niedrigeren Laktatwert beobachten. Bei Fütterung mit Pedigree® in der Absatzperiode wiesen die durchschnittlichen Laktatwerte im Kot beider Gruppen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf. Molitor (1996) hingegen beschrieb als Effekt von *Ec. faecium* Zulage zu einem kommerziellen Futter sowohl steigende als auch sinkende Laktatwerte. Auch Swanson et al. (2002) erhielten bei Zulage von *Lb. acidophilus* zu Trockenfutter bei Hunden in einem Experiment höhere, in einem zweiten niedrigere Laktatwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zentek et al. (1998) und Biourge et al. (1998) beschrieben unter dem Einfluss von milchsäure-bildenden Bakterien einen Trend zur erhöhten Laktatproduktion und einem reduzierten pH-Wert im Ileum von Hunden.

Vahjen et al. (2002) berichten von einem kontinuierlich ansteigenden Laktatwert im Kot von Puten bei Zugabe von *Ec. faecium* zum Futter. Der Laktatwert fiel in den eigenen Untersuchungen mit zunehmendem Alter ab, ebenso wie die Zahl der Enterokokken und Laktobazillen. Allerdings fanden etwa Vahjen et al. (2002) keine Korrelation zwischen Laktatwert und der Anzahl von Milchsäure-produzierenden Bakterien, so dass der Einfluss der Anzahl dieser Keime auf den Laktatwert fraglich ist. Da die nutritive Zufuhr von Laktat durch den milchsäurehaltigen Milchaustauscher mit der Beifütterung teilweise und durch das Absetzen komplett wegfiel, wäre hierdurch ein abfallender Laktatwert zumindest teilweise zu erklären.

4.3.7. Ammoniak im Kot

Ureasebildende Bakterien im Darm synthetisieren aus Nahrungsprotein und in den Darm hinein ausgeschiedenem Harnstoff Ammoniak. Dieses toxische Stoffwechselprodukt des Proteinmetabolismus wird in großen Mengen über den Portalkreislauf der Leber zugeführt, wo es normalerweise zu Harnstoff entgiftet und dann über die Nieren ausgeschieden wird (Kraft und Dürr 1999). Eine niedrige Ammoniakproduktion im Darm ist somit zur Entlastung des Stoffwechsels wünschenswert.

Ec. faecium ist fähig aus Arginin Ammoniak zu bilden (Mundt, 1986). Insofern wären aufgrund der Fütterung des im Milchaustauscher enthaltenen Arginin-reichen Eigelbs (Kienzle und Landes 1995) eventuell höhere Ammoniakwerte im Kot der Versuchswelpen zu erwarten gewesen. Tatsächlich waren aber die durchschnittlichen Ammoniakwerte im Kot der Versuchswelpen zu Versuchsanfang um 33,8% niedriger als bei der Kontrollgruppe. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß das Probiotikums anfangs schädliche ureasebildender Bakterien im Darm zurückdrängen kann. In der Beifutterperiode war der Ammoniakgehalt, wie auch schon der Laktatwert bei den Versuchswelpen höher, und zwar in diesem Fall um 16,7 %. Dass der plötzliche Anstieg auf einer Interaktion des Probiotikums mit dem Beifutter beruht, ist eher unwahrscheinlich, da in der Absatzperiode der Wert bei der Versuchsgruppe wieder unter das Niveau der Kontrollgruppe sinkt. Allerdings berichteten Swanson et al. (2002) bei Zulage von *Lb. acidophilus* zu Trockenfutter bei Hunden von einer Erhöhung der Ammoniakkonzentration im Kot der Tiere um bis

zu 22,9%. Außerdem spricht die Tatsache, dass in der Beifutterperiode die durchschnittliche Enterokokkenzahl unter Berücksichtigung einer hohen Streuung bei der Versuchsgruppe niedriger war als bei der Kontrollgruppe, gegen eine Erhöhung des Ammoniakgehaltes durch diese Keime. Die postulierte Ammoniakbildung der Enterokokken bezieht sich außerdem auf in-vitro Bedingungen, sodass nicht klar ist, in welchem Maße diese auch in-vivo statt findet.

So wären niedrigere Ammoniakwerte der Versuchswelpen bei Versuchsbeginn, in der Milchaustauscher-, und Absatzperiode lediglich dadurch zu erklären, dass Urease bildende Keime durch das Probiotikum zurückgedrängt wurden, was durch Adhäsion an der Darmschleimhaut und transiente Kolonisation des Darmes passieren kann, aber auch durch die Produktion von Bakteriozinen. Allerdings erreichten die Unterschiede zwischen den Gruppen zu keinem Zeitpunkt Signifikanzniveau. Simpson et al. (2002) geben in ihren Untersuchungen beim Hund als durchschnittlichen Ammoniakwert 6,1 g pro kg Kot an, was ca. 10 mal so hoch ist, wie der in den eigenen Untersuchungen gemessene höchste Wert von 0,617 g/kg Kot.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt der oralen Gabe eines Probiotikums bestehend aus *Ec. faecium* (Konzentration 1×10^8 KbE pro 100 g Futtertrockensubstanz) auf die Entwicklung und den Gesundheitsstatus mutterlos aufzogener Beaglewelpen untersucht. Dazu wurden je 6 Welpen einer Kontrollgruppe bzw. einer Versuchsgruppe zugeteilt. Der Versuch begann an Tag 3 nach Geburt der Welpen, so dass eine ausreichende Kolostrumaufnahme gewährleistet war, und endete an Tag 98. Allgemeinbefinden, klinische Parameter, tägliche Futteraufnahme, Gewichtszunahme, Kotmenge und Kotkonsistenz wurden erfasst, außerdem wurden 8 Blutproben zur Bestimmung des Immunstatus bzw. 4 zur Anfertigung des Blutbilds gewonnen. Es wurden kontinuierlich Kotproben zur Bestimmung der Trockensubstanz genommen und zu 4 Zeitpunkten eine mikrobiologische Untersuchung, sowie eine Laktat- und Ammoniakbestimmung aus dem Kot jedes Welpen durchgeführt. Zur Bestimmung einer spezifischen Immunantwort wurde in Woche 8 und 12 humanes Serumalbumin (hSa) appliziert und der Gehalt an IgG, IgA und spezifischen Antikörpern gegen hSa im Serum der Tiere gemessen.

Während der ersten acht Tage der Untersuchung beeinflusste das Probiotikum das Allgemeinbefinden der Versuchswelpen eher negativ. Dies äußerte sich in Müdigkeit, Gähnen, geringer Sauglust, geringem Muskeltonus und geringer Futteraufnahme. Abgesehen davon konnten jedoch keine abträglichen Effekte des Probiotikums auf den Gesundheitsstatus der Welpen festgestellt werden.

Die Zulage von *Ec. faecium* wirkte sich auf Gewichtszunahme und Futteraufnahme nicht aus. In der Beifutterperiode lag bei der Versuchsgruppe die durchschnittliche Futtermittelverwertung um 6,5 % höher.

Während kein Effekt des Probiotikums auf rote Blutkörperchen und Thrombozyten festgestellt werden konnte, wies die Versuchsgruppe zu den meisten Zeitpunkten eine tendenziell höhere durchschnittliche Zahl an Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten auf. *Ec. faecium* führte somit möglicherweise zu einer

erhöhten Zahl an Makrophagen, und somit Monozyten, einer stärkeren Immunantwort mit höheren Lymphozytenzahlen, bzw. einer erhöhten Phagozytoseaktivität durch neutrophile Granulozyten. Die ab Woche 2 etwas niedrigere IgG Konzentration im Serum der Versuchsgruppe könnte auf das Probiotikum zurückzuführen sein, höhere durchschnittliche IgA Werte in Woche 2 und 4 wiesen auf eine Stimulierung der Schleimhautimmunität durch den Zusatzstoff hin. Ein Einfluß auf die spezifische Immunantwort gegen hSa war nicht zu erkennen.

Das Probiotikum schien im Kot der Versuchstiere zeitweise zu einer höheren aeroben Gesamtkeimzahl mit niedrigerem Anteil an *E. coli*, zu höheren Enterokokkenzahlen und durchgehend zu einem niedrigeren Anteil *Cl. perfringens* positiver Tiere zu führen. Dies ist für den Erhalt der Eubiose im Darm ebenso wünschenswert, wie die bei der Versuchsgruppe durchgehend festgestellte höhere durchschnittliche Zahl an Laktobazillen. Die hohe Streuung aller Keimzahlen bei den Einzeltieren ist zu berücksichtigen. Die Zahl an aeroben Keimen, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* spp. und *Lactobacillus* spp. nahm mit zunehmendem Alter der Welpen ab. In der Milchaustauscherperiode schien das Probiotikum tendenziell zu einer Verminderung der Trockensubstanz im Kot beizutragen.

Ein signifikanter Einfluß von *Ec. faecium* auf die Konzentration von Laktat und Ammoniak im Kot konnte nicht beobachtet werden, wobei die hohe Streuung der Einzelwerte zu berücksichtigen ist. Dennoch schien das Probiotikum zu Versuchsbeginn den Ammoniakgehalt im Kot tendenziell zu senken.

6. Summary

Marco Weiß: Effect of *Enterococcus faecium* on the organism of newborn puppies.

The present study aimed to investigate the effect of oral administration of a probiotic containing *Ec. faecium* (Total concentration 1×10^8 cfu / 100 g dry matter of feed) on the development and health status of hand reared beagle puppies. For this experiment each control group, respectively each trial group consisted of 6 puppies. The trial began on day 3 after the birth of the puppies in order to ensure sufficient intake of colostrum, and ended on day 98. General health status, clinical parameters, daily feed intake, weight gain, amount of faeces and faeces consistency were recorded. Apart from that 8 blood samples were taken to determine immune status, and 4 for establishing blood parameters. Faeces samples were taken continually in order to determine the dry matter. At 4 different periods there were microbiological analyses as well as a determination of lactate and ammonia in each individual puppy's faeces. To determinate a specific immune response, humane serumalbumin (hsa) was applied in week 8 and 12, and the serum concentration of total IgG, IgA and specific antibodies against hsa were measured.

The probiotic affected the puppies' general health status slightly negatively during the first 8 days of the trail, resulting in sleepiness, yawning, reduced suckling, reduced muscular tone and reduced feed intake. Besides that no negative effects of the probiotic on the puppies' health were discovered.

The feeding of *Ec. faecium* did neither influence weight gain nor feed intake. The trail group showed a 6.5 % better feed conversion during the period of mixed feeding with Pedigree® and milk-replacer.

No effect of the probiotic on red blood cells and thrombocytes was discovered, but the trial group showed on average a tendentious higher count on lymphocytes, neutrophil granulocytes and monocytes. *Ec. faecium* feeding resulted possibly in a raised number of macrophages, and herewith monocytes, a stronger immune response with more lymphocytes and a higher phagocytotic activity of neutrophil

granulocytes. The lower IgG serum concentration of the trail group from week 2 on could be related to the probiotic, higher average values of IgA in week 2 and 4 suggested a stimulation of mucosal immunity by the additive.

In the trial group, the probiotic feeding seemed to result in a higher count of total aerobe bacteria with a lower share of *E. coli*, in higher *Enterococcus* counts and throughout lower shares of *Cl. perfringens* positive animals. These facts are as desirable for the maintenance of the intestinal eubiosis, as is the discovery of a higher average count on *Lactobacillus* spp. in the trail group. The count on aerobe bacteria, *Cl. perfringens*, *Enterococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. decreased with ongoing age of the puppies. In the period of milk-replacer feeding, probiotic feeding seemed to result in a decrease of fecal dry matter.

Considering the high spread of single values, no significant effect of *Ec. faecium* on fecal lactate and ammonia concentration was discovered, although the probiotic seemed to lower fecal ammonia concentration at the beginning of the trail.

7. Literaturverzeichnis

Alander, M.; Satokari, R.; Korpela, R. (1999). Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 351-354.

Amtsberg, G.; Stock, V.; Treschnak, E.; Ringel, U. (1989). Untersuchung zur Zusammensetzung der Darmflora des Hundes unter dem Einfluß verschiedener Futterrationen und zur Dekontamination des Darmkanals mit verschiedenen antibakteriell wirksamen Substanzen. *Fortschritte in der Tierphysiologie und Tierernährung*, 19, 120-130.

Balish, E.; Cleven, D.; Brown, J.; Yale, C.E. (1977). Nose, throat, and fecal flora of beagle dogs housed in "locked" or "open" environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 207-221.

Bellomo, G.; Mangiagle, A.; Nicastro, L.; Frigerio, G. (1980). A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Current Therapeutic Research*, 28, 927-934. .

Benno, Y.; Nakao, H.; Uchida, K.; Mitsuoka, T. (1992). Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 54, 703-706.

Bernardeau, M.; Vernoux, J.P.; Gueguen, M. (2002). Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 19-27.

Biourge, V.; Vallet C.; Levesque, A.; Sergheraert, R. ; Chevalier, S. ; Roberton, J.-L. (1998). The use of probiotics in the diet of dogs. *The Journal of Nutrition*, 128, 2730S-2732S.

Bloskma, N.; de Heer, E.; Dijk, H.; Willers, J.M. (1979). Adjuvanticity of of lactobacilli: I. Differential effects of viable and killed bacteria. *Clinical and Experimental Immunology*, 37, 367.

Burgstaller, G. et al. (1983). Zum Einsatz von Lactiferm in der Kälbermast. *Züchtungskunde*, 55, 48-54.

Burgstaller, G. et al. (1984). On the addition of lactobacillus (*Streptococcus faecium* SF-68) in milk-substitute feeds for veal calves. *Züchtungskunde*, 56, 156-162.

Canganella, F.; Gasbarri, M.; Massa, S.; Trovatelli, L.D. (1996). A microbiological investigation on probiotic preparations used for animal feeding. *Microbiological Research*, 151, 167-175. .

Carr, F.J.; Chill, D.; Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28, 281-370.

Chenoweth, C.; Schaberg, D. (1990). The epidemiology of enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9, 80-89.

Coconnier, M.-H.; Bernet, M.-F.; Chauvière, G.; Servin, A.L. (1993). Adhering heat-killed human lactobacillus acidophilus, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *Journal of Diarrhoeal Disease Research*, 11, 235-242.

Collins, J.K.; Thornton, G.; Sullivan, G.D. (1998). Selection of probiotic dairy strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8, 487-490.

Davis, C.P.; Cleven, D.; Balish, E; Yale, C.E. (1977). Bacterial association in the gastrointestinal tract of beagle dogs. *Applied and Enviromental Microbiology*, 34, 194-206.

De Roos, N.M.; Katan, M.B. (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and Karzinogenesis : a review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 405-411.

Devriese, L.A.; Van de Kerkhofe, A.; Killper-Bälz, R.; Schleifer, K.H. (1987). Characterization and identification of enterococcus spezies isolated from the intestine of animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 257-259.

Devriese, L.A.; Cruz Colque, J.I.; De Herdt, P.; Haesebrouck, F. (1992a). Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 421-425.

Devriese, L.A.; Laurier, L.; De Herdt, P.; Haesebrouck, F. (1992b). Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 29-31.

Devriese, L.A.; Pot, B.; Collins, M.D. (1993). Phenotypic identification of genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 399-408.

Devriese, L.A.; Hommez, J.; Pot, B.; Haesebrouck, F. (1994). Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 31-36.

Donhue, D.; Salminen, S.; Marteau, P. (1998). Safety of probiotic bacteria. In: Salminen, S.; von Wright, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, New York, 369-384.

Du Toit, M.; Franz, C.M.P.A; Dicks, L.M.T.; Holzapfel, W.H. (2000). Preliminary characterization of Bakteriozins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 482-494.

Earl, F.L.; Melveger, B.E.; Wilson, R.L. (1973). The hemogram and bone marrow profile of normal neonatal and weanling beagle dogs. *Laboratory Animal Science*, 23, 690-695.

Elliott, S.E.; Buret, A.; McKnight, W. ; Miller, M.J.S.; Wallace, J.L. (1998). Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats. *American Journal of Physiology*, 275, G425-G432.

Erhard, M.H.; Lösch, U.; Stangassinger, M. (1995). Untersuchungen zur intestinalen Absorption von homologem und heterologem Immunglobulin G bei neugeborenen Kälbern. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaften*, 34, 160-163.

Fox, S.M. (1988). Probiotics : Intestinal inoculants for production animals. *Veterinary Medicine*, 83, 806-830.

Franz, C.M.A.P.; Holzapfel, W.H.; Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1-24.

Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. In: *Probiotics: the Scientific base*, pp. 1-7. [R. Fuller ed.]. London: Chapman & Hall.

Gallaher, D.D.; Stallings, W.H.; Blessing, L.L.; Busta, F.F., Brady, L.J. (1996). Probiotics, cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. *The Journal of Nutrition*, 126, 1362-1371.

Gill, H.S., Rutherford, K.J. (2001). Viability and dose response effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in mice. *British Journal of Nutrition*, 86, 285-289.

Havenaar, R.; Huis in 't Veld, J.H.J. (1992). Probiotics: general review. In J.B.J. Wood, *Lactic and bacteria in health and disease* (pp. 151-170). London: Elsevier.

Harty, D.W.S.; Oakey, H.J.; Patrikakis, M.; Hume, E.B.H., Know, K.W. (1994). Pathogenic potential of lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 179-189.

Hefel, H. (1980). Kälberaufzucht mit Virginiamycin und Lactiferm im Milchaustauscher. Aulendorf: Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung.

Jin, L.Z.; Marquardt, R.R.; Zhao, X. (2000). A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4200-4204.

Kienzle, E.; Landes, E. (1995). Aufzucht verwaister Jungtiere Teil II: Herstellung von Milchaustauschern und praktische Durchführung der mutterlosen Aufzucht. *Kleintierpraxis*, 40, 687-699.

Killper-Bälz, R.; Schleifer, K.H. (1984). Nucleic acid hybridization and cell wall composition studies of pyogenic streptococci. *FEMS Microbiology Letters*, 24, 355-364.

Kirchgessner, M. (1985). Report of a trial of the effect of Microferm on the nutritional physiology of young calves. Weihenstephan Technische Universität München, Institut für Ernährungsphysiologie.

Klein, G.; Hallmann, C.; Casas, I.A.; Abad, J.; Louwers, J.; Reuter, G. (2000). Exclusion of vanA, vanB and vanC type Glykopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 815-824.

Kraft, W.; Dürr, U.M. (Hrsg.) (1999). *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 5. Auflage, 127.

Kumprecht, L. et al. (1985). Practical trail with the microbiotic preparation lactiferm in the feeding of broiler chickens. *Krmivarstvi a Sluzby*.

Lahrssen, M.; Zentek, J. (2002). Wirksamkeit von probiotischen Mikroorganismen als Futterzusatzstoff: Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 109, 22-25.

Leclerk, H.; Devriese, L.A.; Mossel, D.A.A. (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: Consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 459-466.

Lehto, E.M.; Salminen, S.J. (1997). Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 18, 125-132.

Lewenstein, A.; Frigerio, G.; Moroni, M. (1979). Biological properties of SF68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. *Current Therapeutic Research*, 26, 967-981.

Lilly, D.M.; Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.

Löscher U.; Cihak, J.; Erhard, M.H.; Kaspers, B. (2000). Blut und Abwehr. In: *Engelhardt, W. v.; Breves, G. (Hrsg.); Physiologie der Haustiere*. Enke im Hippokrates Verlag Stuttgart.

Loguercio, C.; Del Vecchio Blanco, C.; Coltorti, M. (1987). Enterococcus lactic acid bacteria strain SF68 and lactulose in hepatic encephalopathy: A controlled study. *The Journal of International Medical Research*, 15, 335-343.

Madara, J.L. (1997). The chameleon within: improving antigen delivery. *Science*, 277, 910-911.

Marteau, P.; Salminen, S. (1999). Safety of probiotics. In: *Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora*, edited by L.A. Hanson and R.H. Yolken, Nestlé nutrition workshop series, Vol.42.

Mayr, A. (Hrsg.), Rolle, M. (2002). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage. Enke Verlag Stuttgart. 414, 483, 506-507, 517-518, 530, 544-545.

McConnel, M.A.; Mercer, A.A.; Tannock, G.W. (1991). Transfer of plasmid pAM1 between members of the normal microflora inhabiting the murine digestive tract and modification of the plasmid in a *Lactobacillus reuteri* host. *Microbial Ecology Health Disease*, 4, 343-355.

Metchnikoff, E. (1908). *The prolongation of life*. Putmans Sons, New York, NY.

Meyer, H.; Heckötter, E. (1986). Futterwerttabellen für Hunde und Katzen, 2. Auflage. Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover.

Meyer, H. (1998). Ernährung des Hundes. Grundlagen, Fütterung, Diätetik, 3. Auflage. Parey Buchverlag. 21, 30, 173.

Mikes, A.; Ferencik, M.; Jahnova, E.; Ebringer, L.; Ciznar, I. (1995). Hypocholesterolemic and immunostimulatory effects of orally applied *Enterococcus faecium* M-74 in man. *Folia Microbiologica (Praha)*, 40, 639-646.

Mitsuoka, T.; Kimura, N.; Kobayashi, A. (1976). Studies on the composition of the fecal flora of healthy dogs with the special references of *Lactobacillus* flora and *Bifidobacterium* flora (author's translation). *Zentralblatt Bakteriologie A*, 235, 485-493.

Moen, J. (1982). *Streptococcus faecium* mot Spedgrisdair. *Norsk Veterinartidsskrift*, 94. 629-631.

Molitor, D. (1996). In-vitro- und in-vivo-Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) als Futterzusatz bei Hunden. Inaugural-Dissertation der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Mundt, J.O. (1986). Enterococci. In: P.H.A. Sneath (Ed.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol.2)*, 1063-1065. Williams & Wilkins, Baltimore, London.

Nes, I.F.; Diep, D.B.; Havarstein, L.S.; Brurberg, M.B.; Eijsink, V.; Holo, H. (1996). Biosynthesis of Bakteriozins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 113-128.

Netherwood, T.; Gilbert, H.J.; Parker, D.S.; O' Donnell, A.G. (1999). Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5134-5138.

Noble, C.J. (1978). Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of Clinical Pathology*, 4, 1182-1186.

O' Halloran, F.M.; Morrissey, S.D.; Murphy, L.; Thornton, G.; Shanahan, F.; O' Sullivan, G.C.; Collins, J.K. (1998). Adhesion of potential probiotic bacteria to human epithelial cell lines. *International Dairy Journal*, 8, 596.

O' Mahony, L.; Feeney, M.; O' Halloran, S.; Murphy, L.; Kiely, B.; Fitzgibbon, J.; Lee, G.; O' Sullivan, G.; Shanahan, F.; Collins, J.K. (2001). Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 15, 1219-1225.

Ouwehand, A.C.; Salminen, S. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 8, 749-758.

Ouwehand, A.C.; Kirjavainen, P.V.; Shortt, C.; Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9, 43-52.

Parker, R.B. (1974). Probiotics: the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4-8.

Pasupathy, K.; Sahoo, A.; Pathak, N.N. (2001). Effect of lactobacillus supplementaton on growth an nutrient utilization in mongrel pups. *Archiv für Tierernährung*, 55, 243-253.

Reid, G.; McGroarty, J.A., Angotti, R.; Cook, R.L. (1988). Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 344-351.

Rinkinen, M.; Mättö, J.; Salminen, S.; Westermarck E.; Ouwehand, A.C. (2000). In-vitro adhesion of lactic acid bacteria to canine small intestinal mucus. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 84, 43-47.

Rinkinen, M.; Jalava, K.; Westermarck, E.; Salminen, S.; Ouwehand, A.C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal Enterococcus faecium colonization? *Veterinary Microbiology*, 92, 111-119.

Salminen, S.; von Wright, A.; Morelli, L.; Marteau, P.; Brassart, D.; de Vos, W.M.; Fondén, R.; Saxelin, M.; Collins, K.; Mogensen, G.; Birkeland, S.-E.; Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 93-106.

Salminen, S.; Ouwehand, A.; Benno, Y.; Lee, Y.K. (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*, 10, 107-110.

Schiffrin, E.J.; Brassart, D.; Servin, A.L. ; Rochat, F. ; Donnet-Hughes, A. (1997). Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria : criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 515S-520S.

Schreiber, M.; Kantimm, D.; Kirchhoff, D.; Heimann, G.; Bhargava, A.S. (1992). Concentrations in serum of IgG, IgM and IgA and their age-dependence in beagle dogs as determined by a newly developed enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA). *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 30, 775-778.

Shu, Q.; Zhou, J.S.; Rutherfurd, K.J.; Birtles, M.J.; Prasad, J.; Gopal, P.K.; Harsharnjit, S.G. (1999). Prolactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* HN 017, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019) have no adverse effects on the health of mice. *International Dairy Journal*, 9, 831-836.

Simpson, J.M.; Martineau, B.; Jones, W.E. ; Ballam, J.M. ; Mackie, R.I. (2002). Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microbial Ecology*, 44, 186-197.

Spieler, A. (1995). Zur Beeinflussung der Gastrointestinal- und Faecalflora von Ferkeln durch Verabreichung eines probiotischen Futterzusatzes in Form des Stammes *Enterococcus faecium* cernelle 68. Dissertation, Journal Nr. 1828, Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Swanson, K.S.; Grieshop, C.M.; Flickinger, E.A.; Bauer, L.L.; Chow, J.; Wolf, B.W.; Garleb, K.A.; Fahej, G.C. jr. (2002). Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. *Journal of Nutrition*, 132, 3721-3731.

Swedish Farmers Association (1984). Internal reports of field trials involving treatment of pigs with *S. faecium*.

Swedish Farmers Association (1985). Internal reports of field trials involving treatment of pigs with *S. faecium*.

Thiercelin, M.E. (1899). Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *C.R. Séances Société Biologie*, 5, 269-271.

Thiercelin, M.E. ; Jouhaud, L. (1903). Reproduction de l'enterocoque; taches centrales ; granulations périmériques et microblastes. *C.R. Séances Société Biologie*, 55, 686-688.

Tizard, I.R. (2000). *Veterinary Immunology – An Introduction*, Sixth Edition. W.B. Saunders Company Philadelphia. 18-21; 224-225; 230-231.

Tuomola, E.M.; Ouwehand, A.C.; Salminen, S.J. (1999). Human ileostomy Glykoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 159-163.

Underdahl, N.; Torres A.; Doster, A. (1982). Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in control of *Escherichia coli* induced diarrhoea in gnotobiotic pigs. *American Journal of Veterinarian Research*, 43, 2227-2232.

Unsöld, E. (2003). Modell der mutterlosen Aufzucht von Hundewelpen zur Wirksamkeitsprüfung probiotischer Substanzen. *Inaugural-Dissertation der Ludwig-Maximilians-Universität München*.

Vahjen, W.; Jadamus, A.; Simon, O. (2002). Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poults. *Archiv für Tierernährung*, 56, 419-429.

Weese, J.S.; Anderson, M.E.C. (2002). Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *The Canadian Veterinary Journal*, 43, 771-774.

Weisser, W. (1981). Beobachtungen über die fäkale Streptokokkenflora bei fleischfressenden Haustieren. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, 1, Originale A, 248, 455-462.

Zentek, J.; Molitor, D.; Kamphues, J. (1998). Prüfung intestinaler Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) bei Hunden. *Kleintierpraxis*, 43, 149-236.

8. Anhang

Tabelle A:												
Anzahl der basophilen Granulozyten im Blut der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten. Daten der Einzeltiere. Angaben in $10^3/\mu\text{l}$												
	Welpen 1	Welpen 2	Welpen 3	Welpen 4	Welpen 5	Welpen 6	Welpen 7	Welpen 8	Welpen 9	Welpen 10	Welpen 11	Welpen 12
	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>
Woche 4	0,033	0,166	0,06	0,146	0,24	0,095	0,147	0,104	0,172	0,197	0,229	0,753
Woche 8	0,242	0,116	0,242	0,28	0,161	0,198	0,073	0,076	0,022	0,059	0,077	0,029
Woche 10	0,159	0,076	0,06	0,133	0,077	0,12	0,025	0,018	0,015	0,02	0,137	0,167
Woche 12	0,101	0,061	0,015	0,092	0,097	0,05	0,152	0,073	0,021	0,002	0,101	0,067
Woche 14	0,086	0,028	0,075	0,059	0,074	0,13	0,04	0,022	0,03	0,01	0,104	0,063

Tabelle B:												
Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut der Welpen zu den verschiedenen Blutentnahmezeitpunkten. Daten der Einzeltiere. Angaben in $10^3/\mu\text{l}$												
	Welpen 1	Welpen 2	Welpen 3	Welpen 4	Welpen 5	Welpen 6	Welpen 7	Welpen 8	Welpen 9	Welpen 10	Welpen 11	Welpen 12
	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>
Woche 4	0,046	0,003	0,004	0,001	0,003	0,013	0,046	0,002	0,010	0,008	0,051	n/a
Woche 8	0,007	0,001	0,153	0,003	0,003	0,000	0,000	0,010	0,003	0,009	0,109	0,005
Woche 10	0,003	0,010	0,446	0,004	0,007	0,043	0,197	0,026	0,004	0,008	0,003	0,100
Woche 12	0,000	0,014	0,320	0,000	0,000	0,001	0,000	0,007	0,008	0,022	0,000	0,011
Woche 14	0,001	0,000	0,013	0,002	0,001	0,006	0,002	0,017	0,005	0,015	0,062	0,052

Tabelle C: Aerobe Gesamtkeimzahl im Kot der Welpen innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden. Daten der Einzeltiere. Angaben im Mio. KbE pro g Kot.												
	Welpen 1	Welpen 2	Welpen 3	Welpen 4	Welpen 5	Welpen 6	Welpen 7	Welpen 8	Welpen 9	Welpen 10	Welpen 11	Welpen 12
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Probiotikum	Probiotikum	Probiotikum	Probiotikum	Kontrolle	Kontrolle	Probiotikum	Probiotikum
Versuchsbeginn	2360	2470	600	860	2600	3000	9100	2600	4300	2230	1090	1690
Milchaustauscher	1400	4900	970	660	n/a	8100	6200	1520	2100	910	310	95
Beifütterung	870	1190	2400	n/a	214	360	130	210	230	95	179	79
Absatzperiode	137	n/a	79	460	450	380	790	280	74	n/a	2600	58

Tabelle D: Anzahl von E.coli im Kot der Welpen innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden. Daten der Einzeltiere. Angaben in Mio. KbE pro g Kot.												
	Welpen 1	Welpen 2	Welpen 3	Welpen 4	Welpen 5	Welpen 6	Welpen 7	Welpen 8	Welpen 9	Welpen 10	Welpen 11	Welpen 12
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Probiotikum	Probiotikum	Probiotikum	Probiotikum	Kontrolle	Kontrolle	Probiotikum	Probiotikum
Versuchsbeginn	-	-	160	180	380	660	3700	1100	340	71	170	135
Milchaustauscher	480	3000	680	450	n/a	4300	3000	970	520	390	61	50
Beifütterung	480	860	150	5600	1	26	110	90	66	39	3,6	0,4
Absatzperiode	64	10	52	270	280	152	54	46	5,4	3600	450	13

Tabelle E: Anteil von E.coli an der aeroben Gesamtkeimzahl im Kot der Welpen innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden. Daten der Einzeltiere. Angaben in %												
	Welpen 1	Welpen 2	Welpen 3	Welpen 4	Welpen 5	Welpen 6	Welpen 7	Welpen 8	Welpen 9	Welpen 10	Welpen 11	Welpen 12
	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Probiotikum	Probiotikum	Probiotikum	Probiotikum	Kontrolle	Kontrolle	Probiotikum	Probiotikum
Versuchsbeginn	n/a	n/a	26,7	20,9	14,6	22	41	42,3	7,9	3,2	15,6	8
Milchaustauscher	34,3	61,2	70,1	68,2	40,4	53,1	48,4	63,8	24,8	42,9	19,7	52,6
Beifütterung	55,17	72,3	6,25	n/a	0,47	7,2	84,6	42,9	28,7	41,4	2	0,5
Absatzperiode	46,7	n/a	65,8	58,7	62,2	39,7	6,8	16,4	7,3	n/a	17,3	22,4

Tabelle F: Anzahl von Cl. perfringens im Kot der Welpen innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden. Daten der Einzeltiere. Angaben in Mio. KbE/g Kot.												
	Welpen 1	Welpen 2	Welpen 3	Welpen 4	Welpen 5	Welpen 6	Welpen 7	Welpen 8	Welpen 9	Welpen 10	Welpen 11	Welpen 12
	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>
Versuchsbeginn	n/a	n/a	290	730	0	300	500	0	100	0	0	0
Milchaustauscher	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Beifütterung	8	6	0	0	0	100	1	0	0	5	0	0
Absatzperiode	110	19	0	0	0	0	0	180	1	10	0	0

Tabelle G: Anzahl von Enterokokken im Kot der Welpen innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden. Daten der Einzeltiere. Angaben in Mio. KbE/g Kot.												
	Welpen 1	Welpen 2	Welpen 3	Welpen 4	Welpen 5	Welpen 6	Welpen 7	Welpen 8	Welpen 9	Welpen 10	Welpen 11	Welpen 12
	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>
Versuchsbeginn	-	-	0	0	0	30	3910	2200	2800	1460	1100	1500
Milchaustauscher	200	0	20	56	100	960	110	21	180	124	150	23
Beifütterung	350	27	1700	12	190	270	0,01	0	119	26	215	81
Absatzperiode	33	0,01	15	45	19	156	20	32	0	0,1	2500	16,8

Tabelle H: Anzahl von Laktobazillen im Kot der Welpen innerhalb der verschiedenen Fütterungsperioden. Daten der Einzeltiere. Angaben in Mio. KbE/g Kot.												
	Welpen 1	Welpen 2	Welpen 3	Welpen 4	Welpen 5	Welpen 6	Welpen 7	Welpen 8	Welpen 9	Welpen 10	Welpen 11	Welpen 12
	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>Probiotikum</i>	<i>Probiotikum</i>
Versuchsbeginn	n/a	n/a	380	44	490	150	241	75	1,3	1800	43	18
Milchaustauscher	0,7	0	0	0,8	3,7	12	172	460	1210	0,53	0,04	0
Beifütterung	0,03	0	14,4	0,02	0	0	21	0,01	0	0	0	0
Absatzperiode	0	0	0	0	0	0	0	0	400	94	0	0

Ich danke Herrn Prof. W.A. Rambeck für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Niederschrift dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an meine Familie, Eva und Petra für die seelische und moralische Unterstützung, vor allem während der Zeit nächtlicher Welpenaufzucht.

Für die Unterstützung bei der Welpenaufzucht in der GSF danke ich Nicola, Eva und Petra und ganz besonders Julia Schwarzer für die tolle Zusammenarbeit und ihr Engagement.

Außerdem möchte ich der H. Wilhelm Schaumann Stiftung danken, ohne deren finanzielle Unterstützung eine derart zeitintensive Doktorarbeit für mich nicht durchführbar gewesen wäre.

Herrn Ulrich Wehr danke ich für die hilfreiche Anleitung und konstruktive Kritik im Bezug auf alle technischen, organisatorischen und inhaltlichen Belange der Doktorarbeit.

Frau Britta Dobenecker danke ich für die Unterstützung während der Vorbereitungsphase des Versuchs und für die Betreuung während der Welpenaufzucht.

Herrn Hesselbach, Frau Stadler, Frau Kleiner, Herrn Strobl und Herrn Kuchler danke ich für die geduldige Anleitung und Unterstützung bei allen labortechnischen Arbeiten, ebenso danke ich allen Tierpflegern des Hundehauses in der GSF und der Tierernährung im OWF für ihre Hilfe.

Ich danke außerdem Herrn Stanglmeier für die statistische Auswertung des Versuchs und Frau Christel Unsöld für die Hilfe bei der Übersetzung der Zusammenfassung ins Englische.

Allen aufgezogenen Welpen danke ich für die Geduld im Umgang mit ihrem „Leihvater“.

10. Lebenslauf

Name: Marco Weiß

Geboren am: 07.08.1976 in München

Eltern: Thomas Weiß, Versicherungskaufmann
Roswitha Weiß, geb. Maidl, Buchhalterin

Schulbildung: 1982 – 1986 Besuch der Montessori Grundschule in München
1986 – 1995 Besuch des Theresien-Gymnasiums in München
30.06.1995 Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1996 – 2002 Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Staatsexamen: 26.02.2002

Approbation
als Tierarzt: 10.04.2002

Promotion: Februar 2002 – April 2003
Durchführung der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation am
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und
Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Rigorosum am 18. Juli 2003.