

**MODELL DER MUTTERLOSEN AUFZUCHT
VON HUNDEWELPEN
ZUR WIRKSAMKEITSPRÜFUNG PROBIOTISCHER SUBSTANZEN**

Eva Unsöld

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

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

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Diese Dissertation wurde gefördert von der Hanns-Seidel-Stiftung, München.

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H.-J. Gabius

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. W. Rambeck

MODELL DER MUTTERLOSEN AUFZUCHT
VON HUNDEWELPEN
ZUR WIRKSAMKEITSPRÜFUNG PROBIOTISCHER SUBSTANZEN

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

von
EVA UNSÖLD
aus
Rottweil

München 2003

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1.	Einleitung	7
1.1.	Aufgabenstellung	7
1.2.	„Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd“	9
1.2.1.	Versuchsaufbau	10
1.2.2.	Wirksamkeitsparameter	10
2.	Literatur	13
2.1.	Mutterlose Aufzucht – Einführung	13
2.2.	Allgemeines über neugeborene Welpen	13
2.2.1.	Physiologische Reife zum Zeitpunkt der Geburt	13
2.2.2.	Geburtsgewicht	14
2.2.3.	Gewichtsentwicklung	15
2.2.4.	Schlaf	16
2.2.5.	Gesundheitsstatus	16
2.2.6.	Körperliche Entwicklung der Welpen	18
2.3.	Mutterlose Aufzucht von Hundewelpen	20
2.3.1.	Indikation zur mutterlosen Aufzucht	20
2.3.2.	Haltung und Pflege	21
2.3.3.	Milchzusammensetzung und Milchersatz	24
2.3.4.	Milchmenge und Fütterungsfrequenz	29
2.3.5.	Fütterungstechnik	32
2.3.6.	Beifütterung	34
2.4.	Probiotische Substanzen	38
2.4.1.	Einführung	38
2.4.2.	Geschichtliche Entwicklung	40
2.4.3.	Probiotische Mikroorganismen	41
2.4.4.	Wirkungen von Probiotika	42
2.4.5.	Wirkungsmechanismen von Probiotika	42

	Seite	
2.4.6.	Präbiotika	44
2.4.7.	Vergleich von Präbiotika mit Probiotika	46
2.4.8.	Einsatz probiotischer Substanzen	47
2.5.	Blutparameter bei Hundewelpen	51
2.5.1.	Rotes Blutbild	51
2.5.2.	Weißes Blutbild	52
2.5.3.	Blutchemie	56
2.6.	Immunität beim Fetus und Neugeborenen	58
2.6.1.	Problematik der Immunität neugeborener Tiere	58
2.6.2.	Entwicklung des Immunsystems	58
2.6.3.	Immuntransfer von der Mutter zum Nachwuchs	59
2.6.4.	Sekretion und Zusammensetzung von Kolostrum	60
2.6.5.	Absorption der Antikörper durch die Darmschleimhaut	60
2.6.6.	Immunologische Besonderheiten bei mutterlos aufgezogenen Welpen	63
2.6.7.	Impfung bei Welpen	63
3.	Eigene Untersuchungen	65
3.1.	Versuchsplan	65
3.1.1.	Versuchsdauer	65
3.1.2.	Versuchsgruppen	65
3.1.3.	Untersuchte Parameter	66
3.1.4.	Versuchsgenehmigung	69
3.2.	Material und Methoden	69
3.2.1.	Zuchtmanagement	69
3.2.2.	Fütterung	72
3.2.3.	Unterbringung	78
3.2.4.	Klinische Überwachung	79
3.2.5.	Pflege	80
3.2.6.	Probengewinnung und tierärztliche Maßnahmen	81
3.2.7.	Blutentnahme	82
3.2.8.	Blutbild	83

	Seite	
3.2.9.	Untersuchung mittels Elisa	83
3.2.10.	pH-Wert-Messung im Kot	88
3.2.11.	Ammoniakbestimmung im Kot	88
3.2.12.	Bestimmung des L-Lactatgehaltes im Kot	89
3.2.13.	Bestimmung der Trockensubstanz des Kotes	93
3.2.14.	Mikrobiologische Untersuchungen	94
3.2.15.	Untersuchungen der Darmwand	98
3.2.16.	Statistische Methoden	102
4.	Ergebnisse	104
4.1.	Zusammensetzung des verwendeten Milchaustauschers	104
4.2.	Futterverwertung	105
4.3.	Entwicklung der Welpen	106
4.4.	Blut	110
4.4.1.	Rotes Blutbild	110
4.4.2.	Weißes Blutbild	113
5.	Diskussion	116
5.1.	Diskussion der Methode	116
5.1.1.	Versuchsplan	116
5.1.2.	Fütterung	118
5.1.3.	Arbeitsaufwand	126
5.1.4.	Zuchtmanagement	126
5.1.5.	Allgemeinuntersuchung	128
5.1.6.	Untersuchungen im Blut	128
5.1.7.	Untersuchungen im Kot	132
5.1.8.	Untersuchungen der Darmwand	136
5.1.9.	Vorschläge für weitere Untersuchungen	137
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	139
5.2.1.	Futterverwertung	139
5.2.2.	Gewichtszunahme	139
5.2.3.	Blut	142

		Seite
6.	Zusammenfassung	150
7.	Summary	152
8.	Literaturverzeichnis	154
9.	Danksagung	168
10.	Lebenslauf	169

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bLF	bovines Lactoferrin
CK	Creatinkinase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.	Escherichia
Ec.	Enterococcus
EDTA	Ethylendiamintetrasäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSF	GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg; Lokalisation des Ec.faecium- Versuchs
Hb	Hämoglobin
HSA	humanes Serumalbumin
I.E.	Internationale Einheiten
KbE	Kolonie bildende Einheiten
KGW	Körpergewicht
LDH	Lactatdehydrogenase
Lb.	Lactobacillus
LF	Lactoferrin
MAT	Milchaustauscher
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
OWF	Institut für Tierernährung, Aussenstelle Oberwiesefeld; Lokalisation des Lactoferrinversuchs
PBS	phosphate buffered saline = gepufferte Kochsalzlösung
PCSL	Pam3Cys-Ser-(Lys)4x3HCl
REM	rapid eye movement
Tab.	Tabelle
TS	Trockensubstanz

1. Einleitung

In den „Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze, Pferd“ der Europäischen Kommission vom Oktober 2000 wird die Standardisierbarkeit von Versuchsbedingungen gefordert. Diese Leitlinien wurden von der Kommission erarbeitet, um bisher fehlende Kriterien zur Überprüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd zur Verfügung zu stellen. Der Aspekt der „Förderung der tierischen Produktion“ war in diesem Zusammenhang (Heim- und Hobbytiere) irrelevant. Diese Leitlinie dient also als Erweiterung der Leitlinie zur Beurteilung von Zusatzstoffen in der Tierernährung (87/153/EWG), die unter anderem beschreibt, welche Unterlagen für ein Zulassungsverfahren eines Zusatzstoffes nach der Zusatzstoffrichtlinie einzureichen sind.

1.1. Aufgabenstellung

Um die in den Leitlinien geforderten Standardbedingungen bei Versuchen an Hundewelpen zu gewährleisten, müssen die Welpen mutterlos aufgezogen werden. In der vorliegenden Arbeit soll anhand von Literatur und eigenen Untersuchungen an 35 Beagle-Welpen das Modell der mutterlosen Aufzucht beschrieben, deren Problematik erklärt und die Eignung dieses Modells zur Prüfung von probiotischen Zusatzstoffen in der Tierernährung diskutiert werden. Der vorgeschlagene Versuchsaufbau und die vorgestellten Untersuchungsmethoden einiger in den Leitlinien erwähnter Parameter sollen Antragsteller von Zusatzstoffdossiers in ihrer Versuchsplanung unterstützen.

Die in den eigenen Untersuchungen verwendeten Welpen waren Gegenstand zweier verschiedener Fütterungsversuche. Anhand allgemeiner, unterstützender und spezifischer Parameter wurden Veränderungen des Gesundheits- und Immunstatus bei Verabreichung der probiotischen Substanz Lactoferrin in verschiedenen Dosierungen (23 Welpen), beziehungsweise des probiotischen Bakteriums *Enterococcus faecium* (12 Welpen) festgestellt.

Bei dem Glykoprotein Lactoferrin handelt es sich nicht um ein Probiotikum im eigentlichen Sinne, da sich die Definition nur auf lebende Mikroorganismen bezieht. Diese entfalten gesundheitsfördernde Wirkungen, die über die der Grundnahrungsmittel hinausgehen und ab einer bestimmten Menge die Verdauung fördern (GUARNER und SCHAAFSSMA, 1998). Lactoferrin gehört zu den Präbiotika, die von GIBSON und ROBERFROID (1995) definiert werden als unverdauliche Futterbestandteile, die für den Wirt von Nutzen sind, indem sie selektiv das Wachstum oder die Aktivität einer oder mehrerer Bakterienarten im Colon stimulieren. Auf Lactoferrin trifft aber auch die Definition probiotischer Substanzen zu, welche Organismen und Substanzen einschließt, die die Darmflora „günstig“ beeinflussen (VELDMAN, 1992). Im folgenden werden sowohl Lactoferrin als auch das Bakterium *Enterococcus faecium* als probiotische Substanzen betrachtet.

Die Leitlinien fordern die Erhebung allgemeiner, unterstützender und spezifischer Wirksamkeitsparameter. Allgemeine Parameter dienen zur Beschreibung des Versuchs und des Gesundheitsstatus der Tiere. Unterstützende Parameter dienen dazu, eine spezifische Wirkung zu untermauern, die aber nicht in direktem Zusammenhang mit der Verabreichung der Mikroorganismen steht. Spezifische Parameter werden direkt durch die oral zugeführten Mikroorganismen beeinflusst (LAHRSSSEN und ZENTEK, 2002).

Der Vergleich einiger allgemeiner Parameter der Welpen beider Versuche soll Hinweise darauf geben, wie Standardbedingungen für das Modell der mutterlosen Aufzucht zur Wirksamkeitsprüfung von probiotischen Substanzen geschaffen werden können.

Die unterstützenden und spezifischen Parameter des Versuchs über Lactoferrin werden in der Vet. med. Dissertation von Petra Laur, die des Versuchs über *Enterococcus faecium* in der Dissertation von Marco Weiß ausgewertet (beide München, 2003).

1.2. „Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd“

Um eine Zulassung für den gemeinsamen Markt für einen probiotischen Zusatzstoff gemäß der Zusatzstoffrichtlinie zu erhalten, müssen unter anderem Unterlagen eingereicht werden, wie sie in den Leitlinien zur Beurteilung von Zusatzstoffen in der Tierernährung (87/153/EWG) dargelegt sind. In den letzten Jahren hatte sich gezeigt, dass keine Kriterien zur Verfügung standen, um die Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd nachzuweisen, da der Aspekt der „Förderung der tierischen Produktion“ bei diesen Tierarten nicht relevant ist. Aus diesem Grund hat die Europäische Kommission „Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd“ erarbeitet.

Das Hauptkriterium „Förderung der tierischen Produktion“ wird hierbei durch gesundheitsfördernde Effekte wie die Stabilisierung der Darmflora abgelöst. Weitere gesundheitliche Effekte sind bisher wissenschaftlich nur im Ansatz belegt.

Neben der Produktsicherheit ist im Rahmen des Verbraucherschutzes besonders der wissenschaftliche Nachweis der Wirkungen und damit auch die Nachprüfbarkeit von Werbeaussagen entscheidend. Dieser Nachweis wurde durch die Erarbeitung der oben genannten Leitlinie für Hersteller und Kontrollbehörden vereinfacht und vor allem vereinheitlicht.

Ziel der Leitlinie war es, die Anwendungsbereiche von probiotischen Mikroorganismen bei oben genannten Tierarten zu definieren und dementsprechend die Zulassungsverfahren festzulegen. Demnach sollen Probiotika im Futtermittel verabreicht werden, um die Zusammensetzung und den Metabolismus der Darmflora mit für das Tier positiven Effekten zu beeinflussen. Solche Effekte können eine Steigerung des Wohlbefindens, eine Stabilisierung der Darmflora mit dem Ziel der Verminderung von pathogenen Keimen, deren unerwünschten Metaboliten und Toxinen sein. Versuchsaufbau und Parameter sind dem Antragsteller freigestellt, es werden aber Wirksamkeitsparameter vorgeschlagen, die, wie oben beschrieben, je

nach Spezifität in allgemeine, unterstützende und spezifische Parameter eingeteilt sind.

1.2.1. Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau soll so gestaltet sein, dass die erhobenen Daten nachvollziehbar und vergleichbar sind. Problematisch ist dabei, dass im Gegensatz zum Nutztierbereich oft mit eingeschränkter Tierzahl gearbeitet werden muss. Deshalb ist besonders auf die Auswahl der Tiere, zum Beispiel hinsichtlich Alter, Gesundheitsstatus und Rasse, je nach Produktbestimmung, zu achten. Adaptationsperiode und Versuchsdauer müssen lang genug sein. Mehrere Untersuchungen an verschiedenen unabhängigen Versuchseinrichtungen sowie wiederholter, konsekutiver Einsatz von Versuchstieren können zur Bestätigung der Versuchsergebnisse dienen.

1.2.2. Wirksamkeitsparameter

Die in den Leitlinien aufgeführten Parameter sind nicht obligatorischerweise zu erfassen. Sie stellen nur beispielhaft die Untersuchungsmöglichkeiten dar und dienen als Orientierungshilfe für Untersucher und Zulassungsbehörde.

Je nach Spezifität werden die Parameter in Gruppen unterteilt (s. auch Aufgabenstellung). Die spezifischen Parameter haben die grösste Bedeutung für das Zulassungsverfahren, da der Wirksamkeitsanspruch darauf aufgebaut ist.

Nachfolgend werden einige relevante Textabschnitte der „Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd“ zitiert.

1.2.2.1. Allgemeine Parameter

Hierbei handelt es sich um „Daten, die üblicherweise in allen wissenschaftlichen Untersuchungen erhoben werden oder die eine Grundinformation über den

allgemeinen Gesundheitsstatus des Tieres liefern (z. B. allgemeine klinische Untersuchung, Futter-, Wasseraufnahme, Körpergewicht, konventionelle und biochemische Blutparameter, Kotkonsistenz, Menge und Häufigkeit des Kotabsatzes)“.

Die erhobenen Daten dienen zusätzlich zu den spezifischeren Parametern der weiteren Information. Hierbei ist darauf zu achten, dass alle qualitativen Daten objektiv, das heißt anhand einer Skalierung, erhoben werden. Subjektive Aussagen sind unzulässig. In diese Kategorie fällt auch die Beschreibung des Futters. Es müssen die Komponenten, eine Nährstoffanalyse und die Applikationsart des Probiotikums aufgeführt werden.

1.2.2.2. Unterstützende Daten

„Parameter, die ergänzende Informationen zur Wirksamkeit des Mikroorganismus liefern (z.B. Erscheinungsbild des Haarkleides, Erfassung der Kotkonsistenz, der Häufigkeit und der Menge des Kotabsatzes mittels eines abgestuften Bewertungssystems, Verdaulichkeit des Futters)“.

Hierzu zählen Hilfsparameter, die die unten genannten spezifischen Parameter in ihrer Aussage unterstützen, sie reichen alleine aber nicht aus, um die Wirksamkeit eines Probiotikums nachzuweisen. Sie stehen nicht direkt mit der Applikation des Mikroorganismus in Verbindung. Bei der Erfassung des Zustandes von Haut und Haarkleid ist auf einen ausreichend langen Beobachtungszeitraum zu achten. Wird die Kotkonsistenz auch anhand eines objektivierenden Skalierungssystems (z.B. Skala von 1 (fest) bis 5 (wässrig) ausgewertet, kann sie nicht nur zur Widerspiegelung des Gesundheitszustandes, sondern auch als unterstützender Parameter dienen.

1.2.2.3. Spezifische Parameter

Spezifische Parameter sind „Parameter, die eine direkte Beziehung zur probiotischen Wirkung aufweisen. Aus der Vielzahl der möglichen Testsysteme werden einige aufgeführt, zum Beispiel spezifische Kotanalysen (Parameter für den Proteinabbau, bakterielle Enzyme, bakterielle Toxine, mikrobiologische Analysen); Darmwandstudien (mikrobiologische Analysen, Schleimproduktion); Blutparameter (Leberenzyme, Parameter für den Proteinabbau, Endotoxine) etc.“

Spezifische Parameter stehen direkt mit der Applikation des Mikroorganismus in Verbindung. In der Leitlinie werden nur einige Parameter genannt, die zur Verfügung stehen. Es werden intestinale und systemische Messgrößen bestimmt.

Die Richtlinie 70/524/EWG über Zusatzstoffe in der Tierernährung schreibt vor, dass Mikroorganismen als Zusatzstoffe in der Tierernährung nur nach Durchlaufen eines Zulassungsverfahrens in Verkehr gebracht werden dürfen. Die Leitlinien zur Beurteilung von Zusatzstoffen in der Tierernährung beschreiben, welche Daten für den Zulassungsantrag vorgelegt werden müssen. Hinsichtlich der Wirksamkeit sind spezifische Untersuchungen, die eine Effizienz eindeutig und spezifisch nachweisen, ideal. Für eine vorläufige Zulassung (für 4 Jahre) muss jedoch lediglich der Nachweis erbracht werden, dass die „beanspruchte Wirksamkeit anzunehmen“ ist. Hierzu genügt, wenn der Antragsteller einen Versuch mit statistisch signifikanten Effekten (Irrtumswahrscheinlichkeit < 5 %) auf einen als spezifisch definierten Parameter vorlegt, oder zwei unabhängige Versuche eine Irrtumswahrscheinlichkeit von < 10 % ergeben. Ebenfalls möglich sind theoretische Studien oder vergleichbare Modelle, deren Erkenntnisse das Vorliegen der beanspruchten Wirkungen annehmen lassen (LAHRSEN und ZENTEK, 2002).

2. Literatur

2.1. Mutterlose Aufzucht – Einführung

Um die mutterlose Aufzucht von Hundewelpen erfolgreich durchführen zu können, müssen neben der Bereitschaft, sehr viel Arbeit und Zeit zu investieren, auch Fachkenntnisse über die Bedürfnisse von Welpen vorhanden sein. Es muss versucht werden, die natürlichen Verhältnisse, in denen die Welpen aufwachsen, so gut wie möglich nachzuahmen. Die Zusammensetzung des Milchersatzes sowie die Fütterungstechnik, die Fütterungsfrequenz und die Milchmenge müssen den Bedürfnissen der Welpen entsprechen. Auch die unter natürlichen Bedingungen durch das Muttertier vorgenommene Körperpflege und Sozialisierung müssen entsprechend ersetzt werden. Passiver Immunschutz muss vom Jungtier in den ersten Stunden nach der Geburt erworben werden, optimal ist hierfür die Aufnahme antikörperreicher Kolostralmilch. Ist dies nicht möglich, muss der Immunschutz andersweitig gewährleistet werden (KIENZLE und LANDES, 1995). Obwohl mutterlos aufgezogene Welpen während der Aufzuchtphase ein langsames Wachstum und eine geringere Robustheit aufweisen, entwickeln sie sich zu normalen, gesunden Tieren mit normalen sozialen Merkmalen (RÜSSE und SCHWAB, 1990).

2.2. Allgemeines über neugeborene Welpen

2.2.1. Physiologische Reife zum Zeitpunkt der Geburt

Neugeborene Hunde sind im Gegensatz zu den Nestflüchtern physiologisch noch unreif und befinden sich in einem sehr hilflosen Zustand. Sogar das Einsetzen der Atmung muss durch das Lecken der Mutter stimuliert werden. Die noch unvollständige Entwicklung des Nervensystems ist nach aussen an den noch geschlossenen Augen und Ohren zu erkennen. Außerdem zeigt der Welpe zum Zeitpunkt der Geburt nur sehr wenige spontane Bewegungen. Die Körperzusammensetzung der Welpen zeigt ebenfalls die physiologische Unreife auf (MEYER et al., 1985). So sind Trockensubstanz- und Proteingehalte im Vergleich

zum adulten Hund niedrig, der Wassergehalt und damit einhergehend der Natriumgehalt jedoch erhöht. Die niedrigen Gehalte an skelettbildenden Mineralstoffen– Calcium und Phosphor – bringen den geringen Reifegrad besonders zum Ausdruck. Sie beruhen sowohl auf einer geringen Mineralisierung der Skelettknochen als auch auf einem geringen Skelettanteil im Körper. Bei kleineren Rassen, die mit einem größeren relativen Geburtsgewicht zur Welt kommen, ist die Mineralisierung der Skelettknochen bereits weiter fortgeschritten als bei Tieren aus größeren Rassen mit einem geringeren relativen Geburtsgewicht (MEYER et al., 1981).

Auch das neonatale Immunsystem ist noch nicht voll funktionsfähig, der Immunstatus ist stark abhängig vom Antikörpertiter, den der Welpen hauptsächlich (90-95%, TIZARD, 2000) über das Kolostrum, und nur zu 5-10 % über die Placenta endotheliochorialis während der Gravidität bekommt. Die relative physiologische Reife des Organismus wird durch das Geburtsgewicht widerspiegelt.

2.2.2. Geburtsgewicht

Das Geburtsgewicht stellt das wichtigste Kriterium zur Beurteilung der Überlebenschance dar, wobei der rassespezifische Durchschnitt beachtet werden muss. Niedrige Geburtsgewichte können durch Fehlernährung oder chronische Krankheit der Hündin, Umwelttoxine oder angeborene Defekte verursacht sein (RÜSSE und SCHWAB, 1990, MOSIER, 1978). Das relative Geburtsgewicht des Hundes (Geburtsgewicht des Welpen/Gewicht der Mutter zum Zeitpunkt der Geburt) liegt mit 2,25% relativ niedrig (MEYER et al., 1985) und bringt wiederum den geringen Reifegrad von Welpen zum Zeitpunkt der Geburt zum Ausdruck. Obwohl die Tragzeit bei Hunden rassenunabhängig nur 62,5 Tage beträgt, sind Frühgeburten erst ab dem 58. Tag überlebensfähig, da sie erst dann 75% des Geburtsgewichts erreicht haben. Liegt das Geburtsgewicht darunter, ist der Welpen physiologisch noch so unreif, dass er keine Überlebenschancen hat (RÜSSE und SCHWAB 1990). Von MOSIER (1978) wurde im Gegensatz dazu lediglich eine höhere Sterblichkeit beobachtet. Für Beaglewelpen nennt er ein durchschnittliches Geburtsgewicht von 240-260 Gramm. Bei Welpen mit deutlich unter dem Durchschnitt liegendem

Geburtsgewicht kann sich der im Vergleich zu schwereren Welpen geringere Reifegrad an verschiedenen Organsystemen zeigen. So liegen am Respirationstrakt eine unvollständigere Entwicklung der Alveolen, eine schwächere Atemmuskulatur und eine abnormale Elastizität vor. Dadurch kann kein Unterdruck erreicht werden und es kann vorkommen, dass manche Welpen nur periodisch atmen. Oft ist die Fähigkeit zur Glucuronidierung in der Leber nicht ausreichend gegeben, was zu Ikterus begleitet von Hypoglykämie und Hypoproteinämie führen kann. Die Niere eines untergewichtigen Welpen ist nicht fähig, Urin zu konzentrieren, die Clearance von Harnstoff, Chlorid, Kalium und Phosphor ist damit erniedrigt. Können die Stoffwechselabfallprodukte aus den Zellen nicht so schnell abtransportiert werden wie sie entstehen, kann es zur Ödembildung kommen. Die bakterizide und bakteriostatische Wirkung des Serums ist geringer. Welpen kühlen aufgrund eines Mangels an isolierendem Fett schnell aus, insbesondere untergewichtige Welpen sind anfällig für Hypoglykämie, Sepsis, Lungenentzündung und Blutungen. Nach dem Tod eines solchen Welpen kann man ein abnormales Leber/Hirn – Verhältnis feststellen. Kräftige, lebhafte Welpen weisen eine mindestens doppelt so grosse Lebermasse als Gehirnmasse auf. Ist die Lebermasse weniger als 1,5 mal so gross wie die Hirnmasse, stirbt der Welpen üblicherweise (MOSIER, 1978).

2.2.3. Gewichtsentwicklung

Der Gewichtskontrolle kommt eine herausragende Bedeutung zur Überwachung der Entwicklung während der neonatalen Phase zu. Gewichtsabnahme, Gewichtskonstanz oder Abweichungen von der vorausberechneten Gewichtszunahme weisen auf Gesundheitsstörungen hin und geben Anlass zu einer genauen Untersuchung. Nach MUNDT (1989) nehmen Welpen bereits am ersten Tag zu und können unter optimalen Bedingungen ihr Geburtsgewicht in einer Woche verdoppeln. JOHNSON und GRACE (1987) geben als Durchschnittswert für die Gewichtsverdopplung 10-12 Tage an.

2.2.4. Schlaf

Neben dem Geburtsgewicht und der Gewichtsentwicklung dient auch die Länge der Schlafphasen als Kriterium zur Bewertung der Gesundheit. Die Schlafphasen eines neugeborenen gesunden Welpen machen 90 % des Tages aus. Beim Aufwachen gähnen die Welpen üblicherweise, schreien nicht und weisen einen guten Muskeltonus auf. Schlafende Welpen sollten nicht geweckt werden. Muskelkontraktionen während des Schlafs sind in den ersten vier Wochen normal und zeigen aktivierten Schlaf an. Ihr Verschwinden in dieser Zeit weist auf Gesundheitsstörungen hin (RÜSSE und SCHWAB, 1990). Nach vier Wochen stellen die Zuckungen sich ein. Durch Studien an neugeborenen Ratten konnte gezeigt werden, dass das ZNS während des aktivierten Schlafes sogar bei sehr unreifen Tieren eine erhöhte neuronale Aktivität zeigt. Auch neugeborene Ratten weisen im Schlaf eine hohe motorische Aktivität mit häufigen REM (rapid eye movement)-Phasen und unkoordinierten myoklonischen Zuckungen auf. Trotzdem ist fraglich, ob der aktivierte Schlaf bei der neugeborenen Ratte mit dem REM-Schlaf Adulter verglichen werden kann. Werden neugeborene Ratten dieser Schlafphasen beraubt, zeigen sie später eine geringere Entwicklung des Gehirns und Verhaltensstörungen (MIRMIRAN, 1986). Inwieweit die Muskelzuckungen im Schlaf von Hundewelpen durch ähnliche Vorgänge erklärt werden können und ob die Deprivation der aktivierten Schlafphasen zu ähnlichen Schäden führen kann, bleibt noch zu untersuchen.

2.2.5. Gesundheitsstatus

Der Gesundheitsstatus kann im wachen Zustand durch das Lautgeben und das Bewegungsverhalten des Welpen beurteilt werden. Lautäußerungen, verbunden mit vermehrter Unruhe, weisen in den ersten Wochen auf das Vorliegen suboptimaler Verhältnisse (Schmerz, Hunger, Kälte, Hitze) hin (MEYER und ZENTEK, 1998). Die Temperatur spielt dabei eine dominierende Rolle, da selbst hungrige Welpen, solange sie warmgehalten werden, akustisch unauffällig bleiben. Gesunde Welpen

halten den Kopf beim Füttern gestreckt und fühlen sich nach dem Fressen rund und fest an. Sie liegen mit ausgestrecktem Kopf auf dem Bauch oder auf der Seite.

Die Diagnose von Erkrankungen bei neonatalen Welpen ist schwierig, da verschiedene Krankheitsursachen eine ähnliche oder gleiche Symptomatik haben und nicht den für Adulte typischen Verlauf zeigen. Das Vorliegen einer Krankheit lässt sich an Abweichungen der physiologischen Werte, Verhaltensänderungen wie ansteigender Aktivität, Schreien und Jammern, Hypoxie, Hypothermie, Dehydratation und dergleichen erkennen. Die Behandlung erfolgt primär symptomatisch, gleichzeitig sollte aber eine bakteriologische und virologische Untersuchung zur Klärung der Ätiologie eingeleitet werden. In der ersten Woche, insbesondere am ersten Lebenstag, ist die Mortalität am höchsten, später wird sie deutlich geringer. Tote Welpen sollten grundsätzlich seziiert werden.

Die Vorbeugung spielt eine wichtige Rolle. Die Elterntiere sollten geimpft und gesundheitlich überwacht werden. Bei den Welpen ist besonders auf Hygiene, korrekte Fütterung und Einhaltung einer Mindestumgebungstemperatur zu achten (RÜSSE und SCHWAB, 1990).

Für die genaue Durchführung der Allgemeinuntersuchung werden die Ausführungen von GRECO und PARTINGTON (1995) empfohlen. Tab. 1 gibt die physiologischen Werte von Herz- und Atemfrequenz und Temperatur in den ersten vier Wochen an.

Tabelle 1
Herz- und Atemfrequenz, Körpertemperatur bei Welpen
(nach MEYER und ZENTEK, 1998)

Alter in Tagen	Herzfrequenz/min.	Atemfrequenz/min.	Temperatur in °C
1	160	10-18	33,3-36,1
2	224	18-36	35,0-36,7
7	220	16-32	35,6-36,7
14	212	16-32	36,3-36,9
21	192	16-32	36,9-37,5
28	196	16-32	37,5-38,3

2.2.6. Körperliche Entwicklung der Welpen

2.2.6.1. Muskulatur und Bewegung

In den ersten Tagen ist der Muskeltonus schlecht entwickelt (BEAVER, 1995). Der „rooting reflex“, der den Welpen dazu veranlasst, sich auf warme Objekte zuzubewegen, beginnt mit vier Tagen nachzulassen. Mit Hilfe dieses Reflexes trifft der Welpen mit grosser Wahrscheinlichkeit auf seine Mutter oder seine Wurfgeschwister. Wenn die Mutter den Welpen leckt, bewegt dieser sich ebenfalls auf sie zu. Direkt nach der Geburt dominiert die Beugemuskulatur an Körper und Hals, das heißt, der Welpen antwortet in den ersten vier Tagen mit der Beugung der Wirbelsäule, des Schwanzes und der Gliedmaßen, wenn man ihn an der Kopfbasis unterstützend hält. Dies ändert sich am vierten Lebenstag (BREAZILE, 1978). Jetzt dominiert die Streckmuskulatur, so dass der Welpen die Wirbelsäule und die Gliedmaßen durchstreckt. Dominiert die Beugemuskulatur auch nach Tag 3, ist der Welpen krank. Ab 6-10 Tagen können die Vordergliedmaßen das Welpengewicht tragen, die Hintergliedmaßen erst ab 11-15 Tagen, wenn der Welpen nicht zu fett ist. Einige Tage später kann der Welpen dann in seiner Umgebung umherlaufen. Nach weiteren vier Wochen kann sich der Welpen aufrichten (BEAVER, 1995). JOHNSON und GRACE (1987) geben den Beginn des Umherkrabbelns mit 7-14 Tagen, des Laufens mit 16 Tagen und des Beherrschens eines relativ normalen Ganges mit 21 Tagen an.

2.2.6.2. Augen und Ohren

Bei der Geburt sind die Augen und Ohren der Welpen noch geschlossen. Nach RÜSSE und SCHWAB (1990) öffnen sich die Augen schon mit 10 Tagen, nach JOHNSON und GRACE (1987) mit 12-14 Tagen, nach MEYER und ZENTEK (1998) erst mit 14-16 Tagen. Die Iris ist dann blaugrau und nimmt bis zum Alter von 4-6 Wochen die normale Farbe des erwachsenen Tieres an. Die Sehfähigkeit ist in den ersten 3-4 Wochen noch nicht voll entwickelt (JOHNSON und GRACE, 1987). BEAVER (1995) hält es für wahrscheinlich, dass die vollständige Ausprägung der

Sehfähigkeit sogar noch mehrere Monate dauert. Die äusseren Gehörgänge öffnen sich nach RÜSSE und SCHWAB (1990) mit 13 Tagen.

2.2.6.3. Kot- und Harnabsatz

Das reflektorische Kot- und Harnabsetzen bis zum Tag 28 ermöglicht es der Hündin, das Nest sauber zu halten (BEAVER, 1995). Der freiwillige Kot- und Harnabsatz beginnt zwischen Tag 16 und 21 (RÜSSE und SCHWAB, 1990). Nach 18 Tagen suchen die Welpen eine Ecke der Wurfkiste auf, um sich zu entleeren, nach 21 Tagen macht die ganze Gruppe in eine bestimmte Ecke. Nach 28 Tagen, wenn der anogenitale Reflex verschwunden ist, nehmen männliche und weibliche Welpen eine sitzende Haltung zum Harnabsatz ein (BEAVER, 1995).

2.2.6.4. Rektaltemperatur

Die Körpertemperatur von Welpen während der ersten Lebenswoche ist direkt abhängig von der Umgebungstemperatur und kann nur 3-4°C darüber gehalten werden (HOSKINS, 1999; MUNDT, 1989). Sie beträgt in der ersten Woche 35-37,2°C, in der zweiten Woche 36,1-37,8°C (MOSIER, 1978). Beim Absetzen haben die Welpen die gleiche Temperatur wie adulte Hunde (MUEGGLER et al., 1979). Nach der Geburt zeigen sie einen Abfall der Rektaltemperatur um 4,4°C. Am ersten Lebenstag beträgt die Körpertemperatur 35,6±0,8°C, danach sollte sie täglich ansteigen. In den ersten zwei Wochen kommen Schwankungen vor, die Temperaturen liegen in der ersten Lebenswoche zwischen 34,4 und 37,2°C, in der zweiten zwischen 35,0 und 37,8°C und in der dritten zwischen 36,1 und 37,8°C (RÜSSE und SCHWAB, 1990). HOSKINS (1999) bezeichnet die Änderung der Körpertemperatur der Welpen in den ersten vier Wochen als langsamen Übergang von poikilotherm zu homöotherm.

2.3. Mutterlose Aufzucht von Hundewelpen

2.3.1. Indikation zur mutterlosen Aufzucht

Die Aufzucht durch die Mutter ist für die Welpen am besten. Ist die Mutter nicht verfügbar, sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, das Jungtier einer Amme unterzuschieben. Bleibt die mutterlose Aufzucht als einzige Alternative und hat das Jungtier noch kein Kolostrum erhalten, ist es auf jeden Fall sinnvoll, homologes Kolostrum eines stalleigenen Tieres zu füttern, ansonsten muss Plasma gewonnen und verabreicht werden. Muttermilch ist den Milchersatzpräparaten immer vorzuziehen (HOSKINS, 1995, KIENZLE, 1999). Die Gewinnung von Kolostrum ist nach MUNDT (1989) bei grossen und mittelgrossen Hündinnen kein Problem, das Kolostrum kann auch portioniert eingefroren werden. Trotzdem gibt es einige Situationen, in denen die Welpen zugefüttert beziehungsweise mutterlos aufgezogen werden müssen.

Nach BAINES (1981) sind Indikationen für die künstliche Aufzucht Tod der Hündin, die Nichtannahme eines oder mehrerer Welpen durch die Hündin, die Geburt eines zu grossen Wurfes, für den die Mutterhündin nicht angemessen sorgen könnte und teilweises oder totales Ausbleiben der Laktation bei der Hündin. BJÖRK (1982) nennt ferner schwache oder kranke Welpen, die nicht normal saugen können. Nach MUNDT (1989) machen auch Unerfahrenheit und Krankheit der Mutter eine mutterlose Aufzucht notwendig. KIENZLE und LANDES (1995) sehen lediglich Tod oder Krankheit des Muttertieres als eindeutige Indikation zur mutterlosen Aufzucht. Milchmangel und zu grosse Würfe sind kein Grund, die Welpen mutterlos aufzuziehen. Hier sollte, schon um Verhaltensänderungen zu vermeiden, lediglich zugefüttert werden. Aggressivität, übertriebene Brutpflege oder Nichtannahme des Jungtieres können erbliche Ursachen haben, die Eignung der Elterntiere zur Zucht ist daher fraglich.

2.3.2. Haltung und Pflege

Um Welpen erfolgreich künstlich aufzuziehen, ist eine Simulation der natürlichen Gegebenheiten nötig. So muss neben der korrekten Fütterung auch eine passende Umgebung und genügend Ruhe gewährleistet sein. Körper- und Fellpflege sowie die Stimulation von Kot- und Harnabsatz müssen von der aufziehenden Person übernommen werden. Die Aufrechterhaltung der Umgebungstemperatur ist besonders zu beachten (HOSKINS, 1999).

2.3.2.1. Umgebungsbedingungen

2.3.2.1.1. Umgebungstemperatur

Die Einhaltung einer an die Bedürfnisse der Welpen optimal angepassten Umgebungstemperatur ist bei der mutterlosen Aufzucht von besonderer Bedeutung, da Welpen nur eine geringe Wärmespeicherkapazität haben. Dies liegt an der geringen Menge subcutanen Fettgewebes und einer relativ grossen Körperoberfläche bei relativ kleinem Körpervolumen. Auch die eigene Wärmeerzeugung ist noch nicht ausreichend, da der vasomotorische Mechanismus noch nicht funktioniert und der Zitterreflex (Wärmezittern) erst gegen Ende der ersten Lebenswoche einsetzt. Aus diesen Gründen sind neugeborene Welpen unfähig, ihre Körpertemperatur konstant zu erhalten und müssen in eine Umgebung gesetzt werden, die Wärmeverluste durch Verdunstung, Strahlung, Konvektion und Konduktion so gering wie möglich hält. Das Fell der Welpen muss trocken gehalten werden und sie sollten nicht neben kalte oder nasse Gegenstände gesetzt werden. Da die Welpen zwar Wärme verlieren, aber nicht selber generieren können, muss Wärme zugeführt werden (BJÖRCK, 1982; MOSIER, 1978).

MONSON (1987) schlägt für mutterlos aufgezogene Welpen eine Umgebungstemperatur von 29,4-32,2°C vor. Auch SHEFFY (1978) empfiehlt diese Werte für die ersten fünf Lebenstage, dann eine allmählichen Reduktion auf 26,7°C in den nächsten fünf Tagen und eine weitere Reduktion auf 21,1°C bis zum Ende der

vierten Woche. Nach HOSKINS (1999) und MEYER und ZENTEK (1998) sollte die Temperatur in der ersten Lebenswoche zwischen 30 und 32°C betragen und über die folgenden drei Wochen schrittweise auf 24°C erniedrigt werden.

2.3.2.1.2. Wärmequellen

Bei der natürlichen Aufzucht dient die Mutter als Wärmequelle. Steht diese nicht zur Verfügung muss künstlich für ausreichende Temperaturen gesorgt werden. SHEFFY (1978) empfiehlt Heizkissen und Wärmelampen, wobei bei letzteren der Tag-Nacht-Rhythmus schlecht einzuhalten ist (RÜSSE und SCHWAB, 1990). GRECO und PARTINGTON (1995) raten von der Verwendung von Heizkissen ab, da Heizkissen leicht zu Verbrennungen führen können. Als Ersatz für die mütterliche Wärme werden mit warmem Wasser gefüllte Wärmeflaschen oder Gummihandschuhe und kleine Pappkartons, die mit Decken und Babywindeln ausgelegt sind, empfohlen. Bei allen Methoden der Wärmezuführung ist darauf zu achten, dass Welpen physiologischerweise eine niedrigere Körpertemperatur haben und nicht auf eine für erwachsene Tiere normale Körpertemperatur erwärmt werden dürfen.

2.3.2.1.3. Luftfeuchtigkeit

Bei Einhaltung der oben genannten Umgebungstemperaturen sollte die Luftfeuchtigkeit 55-60 % betragen, um eine Austrocknung der Schleimhäute der Welpen zu verhindern (HOSKINS, 1999).

2.3.2.1.4. Ruhe

Nach HOSKINS (1995) sollten gesunde Welpen in den ersten 2-3 Wochen nur saugen und schlafen. Plötzliche Wechsel der Umgebungsbedingungen sowie Ruhestörungen in der Zeit außerhalb der Fütterungen sollten vermieden werden. Bewegungsübungen, Hygienemaßnahmen und später auch Aktivitäten, die der Sozialisierung dienen, sind damit natürlich nicht gemeint.

SHEFFY (1978) rät dazu, die Welpen in den ersten zwei bis drei Wochen einzeln zu halten, da sie sich üblicherweise stören und gegenseitig besaugen.

2.3.2.2. Stimulation von Kot- und Harnabsatz

Nach KIENZLE et al. (1985) sind Welpen in den ersten beiden Wochen nicht in der Lage, ohne Stimulation, die in der Regel durch die Mutter erfolgt, Kot und Harn abzusetzen. Nach HOSKINS (1999) muss auch in der dritten Woche noch nach jeder Fütterung der reflektorische Kot- und Harnabsatz stimuliert werden. Dazu simuliert man das Lecken der Mutter an der Anogenitalregion des Welpens am besten mit einem feuchten, warmen Tuch. Manchmal reicht auch schon das Entlangstreichen mit einem Finger an der Unterseite des Bauches. Im Alter von drei Wochen sind Welpen gewöhnlich in der Lage, sich ohne simulierte Stimulation zu entleeren. Nach SHEFFY (1978) müssen Kot- und Harnabsatz bei allen Welpen nur in den ersten Tagen stimuliert werden. Die Welpen sollten dann aber regelmäßig beobachtet werden um festzustellen, bis zu welchem Zeitpunkt bei welchem Welpen eine Stimulation noch nötig ist. Wird die Stimulation von Kot- und Harnabsatz vernachlässigt, kann es zur Koprostase kommen. Dies ist auch der Fall, wenn eine Welpen bei Hypothermie von der Mutter verstossen wird (RÜSSE und SCHWAB, 1990).

2.3.2.3. Fell- und Körperpflege

Zur Förderung der Durchblutung und als passive Bewegungsübung sollte der ganze Welpen mehrmals täglich sanft massiert werden (SHEFFY, 1978). Die Fellpflege besteht in erster Linie darin, den Welpen sauber zu halten und ihn ab und zu mit Babyöl zu frottieren. Das Pflegen des Welpen sollte allerdings nicht übertrieben werden, um dem Welpen genügend Ruhe für den nötigen Schlaf zu gewähren.

2.3.3. Milchzusammensetzung und Milchersatz

2.3.3.1. Milchzusammensetzung

Die Zusammensetzung des Milchersatzes sollte sich so genau wie möglich an der Muttermilch orientieren, da diese wie bei anderen Tierarten natürlich das optimale Nahrungsmittel für neugeborene Welpen darstellt. „Optimal“ bezieht sich hierbei jedoch nicht auf das Erreichen des maximalen Wachstums, sondern auf die der jeweiligen Rasse und dem jeweiligen Alter entsprechende Idealgröße, den Gesundheitsstatus und die Abwehrkraft. Bei der Verwendung von Milch anderer Tierarten für die Herstellung für Milchersatz ist auf die differierende Zusammensetzung zu achten. Tab. 2 zeigt, welche grossen Unterschiede zwischen verschiedenen Tierarten bestehen.

Tabelle 2
Zusammensetzung der Milch verschiedener Tierarten (pro 100g)
 (KIENZLE und LANDES, 1995 und KIENZLE, 1999)

	Hund	Rind	Ziege	Schaf	Pferd	Katze	Kaninchen	Igel	Reh	Seehund
Trockensubstanz g	22	13				16	31	32,2	25,0	57,2
Energie kJ	600	313	285	450	240	490	862	796	615	1918
Rohprotein g	8	3,3	3	5,8	1,7	8,1	12,7	12,6	7,9	9,2
N-freie Extraktstoffe (überwiegend Lactose) g	3	5	4,5	4,3	6,2	3	1,1	2,0	3-4,5	
Rohfett g	9	3,8	3,4	6	1,8	6,4	14,8	12,6	9,4	42,0
Fettsäurenmuster										
Ungesättigte FS %	60,9	34,5	30	25		63	27,3			58,9
Linolsäure %	11,7	2,4	2	2		21	12,9			2,8
Fettsäuren < C16 %	6	20,2	23	36		2	37,1			12,9
Calcium mg	245	115	130	194	120	140	610	287	307	104
Phosphor mg	177	95	110	151	73	137	380	213	258	148
Natrium mg	80	40	50	45	23	185	100	88	61	55
Kalium mg	108	145	200	162	70		240	183	147	120
Eisen mg	0,7	0,05	0,06	0,08	0,09	0,8	0,3	5,18		
Kupfer mg	0,33	0,02	0,01	0,02	0,05	0,08	0,1	0,26		
Zink mg	0,11	0,5	0,4	0,4	0,3	0,7	1,8	3,0		

*überwiegend Lactose

Aus Tab. 2 geht hervor, dass Hundemilch zwar einen hohen Rohprotein- und Rohfettgehalt aufweist, aber nur geringe Gehalte an Lactose bzw. N-freien

Extraktstoffen enthält. In diesen Punkten bestehen große Unterschiede in der Milchezusammensetzung von Pferd, Rind und Ziege, die aufgrund ihrer Verfügbarkeit für die Herstellung von Milchersatz in Frage kommen. Sie weisen einen deutlich geringeren Gehalt an Rohprotein und Rohfett, aber einen höheren Lactose-Gehalt auf.

Ein hoher Lactosegehalt sorgt über Osmose immer auch für einen entsprechend hohen Wassergehalt in der Milch. So ist lactosereiche Stuten- oder Kuhmilch deutlich „dünnere“ als die lactosearme, „dickere“ Milch der Fleischfresser (KIENZLE und LANDES, 1995). Wird aus praktischen Gründen reine Kuhmilch an Tierarten verabreicht, die eine deutlich lactoseärmere, also dickere Milch haben, muss mit Durchfällen gerechnet werden. Diese Methode ist zwar für viele Laien naheliegend und einfach, sollte aber trotzdem vermieden werden (KIENZLE, 1999).

Die ebenfalls zur Herstellung von Milchersatz in Frage kommende Schafmilch dagegen kommt hinsichtlich des Protein-, Fett- und Lactose-, sowie auch hinsichtlich des Gesamtenergiegehaltes der Hundemilch am nächsten. Die anderen Milcharten haben einen wesentlich niedrigeren Energiegehalt. Außerdem enthält die Kuhmilch zwar einen ähnlich hohen Mineralanteil wie die Hundemilch, von der Zusammensetzung ist allerdings wiederum Schafmilch besser geeignet (THOMÉE, 1978).

Das Milchfett von Wiederkäuern ist höher gesättigt und kurzkettiger als das der Fleischfresser, denn das Fettsäurenmuster wird von der Nahrung beeinflusst. Bei den Tierarten mit einhöhligen Magen weist das Fettsäurenmuster der Pflanzenfresser ebenfalls höher gesättigte und kürzere Fettsäuren auf als das der Alles- und Fleischfresser (KIENZLE und LANDES, 1995). Die in Tab. 2 angegebenen Werte für das Fettsäurenmuster von Hundemilch unterscheiden sich von den Untersuchungen von THOMÉE (1978), in denen Milch von Beagles und Schäferhunden nach Rasse getrennt ausgewertet wurde. Dabei wurde festgestellt, dass Beagle Milch einen sehr hohen Linolsäureanteil von ca. 20%, Schäferhundemilch dagegen einen deutlich geringeren von nur 8,9% aufweist. Einschränkend wird jedoch darauf hingewiesen, dass der Linolsäureanteil stark durch die Fütterung beeinflusst wird. OFTEDAL (1984) konnte beim Vergleich

verschiedener Studien, die die Zusammensetzung von Milch verschiedener Hunderassen untersuchten, keine rassespezifischen Unterschiede feststellen.

Der Rohproteingehalt ist in den ersten Tagen besonders hoch, was auf den zunächst hohen, im Verlauf der Kolostralperiode abnehmenden Immungobulinanteil zurückzuführen sein dürfte und liegt am ersten Tag bei 11,9 % der US, am zweiten Tag bei 8,7%, am dritten Tag bei 7,6% und am vierten Tag bei 6,4% (THOMÉE, 1978).

2.3.3.2. Milchersatz

2.3.3.2.1. Kommerzielle Milchaustauscher

HOSKINS (1999) empfiehlt kommerziell erhältliche Milchaustauscher. Sie enthalten üblicherweise 4,2-5,2 kJ verdauliche Energie / ml MAT und kommen der Zusammensetzung der Muttermilch im Allgemeinen sehr nahe. Leider gilt dies nicht für alle kommerziellen Milchaustauscher, deshalb muss die Zusammensetzung vor der Verwendung mit der der Muttermilch verglichen werden. Eine gewisse Orientierung bietet die Berechnung des Gehaltes an N-freien Extraktstoffen in der Trockenmasse. Wenn es bereits hier größere Abweichungen zur Muttermilch gibt, ist Vorsicht geboten (KIENZLE, 1999). Wenn Spurenelementen und Vitamine als Zusatzstoffe deklariert sind, ist zu beachten, dass es sich lediglich um die Mengen handelt, die durch Einmischung von Vitamin- und Mineralstoffmischungen enthalten sind. Die tatsächlichen Gehalte sind um die in den Einzelfuttermitteln enthaltenen Mengen höher. Die Angabe des Milchzuckergehaltes unterstellt, dass die N-freien Extraktstoffe ausschließlich aus Milchzucker bestehen. Tatsächlich dürften die Lactosegehalte geringer sein (MUNDT, 1989).

Präparate für Säuglinge oder Kälberaustauschmilch können für die Aufzucht von Welpen nicht verwendet werden. MEIXNER (1968) hat hierbei eine höhere Mortalitätsrate beobachtet. Als Ursache wurde eine geschwächte Widerstandskraft aufgrund der differierenden Zusammensetzung der Milch vermutet. Nach KIENZLE (1999) kann Säuglingsnahrung schon deshalb nicht eingesetzt werden, weil die darin enthaltene Saccharose als Zuckerquelle ungeeignet ist.

Die Zubereitung des Ersatzmilchpulvers mit Wasser richtet sich nach den Empfehlungen der Hersteller. Meist müssen für Welpen in den ersten vier Lebenswochen 1 Teil Milchersatzpulver in 2 bis 2,5 Teile Wasser (38 bis 60°C) eingerührt werden (MUNDT, 1989).

2.3.3.2.2. Selbst hergestellter Milchersatz

Neben einem adäquaten Nährstoffgehalt muss auf hohe Verdaulichkeit und Verträglichkeit, sowie auf einen einwandfreien Hygienestatus geachtet werden. Die unter natürlichen Bedingungen beobachtete hohe Verdaulichkeit der Milchhaltsstoffe (MEYER et al., 1981, MUNDT et al., 1981) kann von den Milchaustauschern sogar ungefähr erreicht werden (MEYER et al., 1984). Auch muss die Relation der Energieträger Fett, Eiweiß und Lactose, der Proteintyp (Kasein, Albumine, Globuline), das Fettsäurenmuster, bei dem teils extreme Speciesunterschiede bestehen, und die Mineralisierung der Hundemilch weitgehend entsprechen. Eiweißsubstitute sollten gut löslich, Fette leicht emulgierbar sein. Abweichungen können zu Verdauungsstörungen, zu ungenügender Entwicklung und im schlimmsten Fall sogar zum Verhungern führen (KIENZLE, 1999; KIENZLE und LANDES, 1995).

Aufgrund oben genannter Gründe hinsichtlich der Unterschiede zwischen Kuh- und Hundemilch bzw. Schaf- und Hundemilch ist ersichtlich, dass sich die Schafmilch von ihrer Zusammensetzung her als Milchersatz für Hunde besser eignen würde (THOMÉE, 1978). Durch Substitution der einzelnen Nährstoffkomponenten kann die Kuhmilch jedoch hundegerecht aufbereitet werden (Tab. 3).

Um die energieliefernden Stoffe zu ersetzen, eignen sich bei Hundemilch insbesondere Quark oder Hüttenkäse als Proteinträger, Speiseöl zur Deckung des Fettgehaltes (langkettige ungesättigte Fettsäuren) und Kuhmilch als Lactoselieferant. Eine gute Proteinquelle ist das Kasein, das für Welpen jedoch in geronnener Form zugesetzt werden muss, um eine lebensgefährdende Klumpenbildung im Magen zu vermeiden. Allerdings stimmt das Aminosäurenmuster im Quark nicht ganz mit dem der Hundemilch überein. Vor allem der Arginingehalt ist in der Kuhmilch deutlich

niedriger als in der Hundemilch. Zusammen mit einem Methioninmangel kann der Argininmangel zur Kataraktbildung bei Welpen führen. Durch Hinzufügen von argininreichem Eigelb, das gleichzeitig als Emulgator dient, oder Arginin und Methionin (60 bzw. 20 mg/100ml MAT) kann das Aminosäurenmuster des Milchersatzes verbessert werden.

Tabelle 3
Rezepte für Milchaustauscher zur mutterlosen Aufzucht von Hundewelpen
(nach LEIBETSEDER, 1989)

		Rezept I	Rezept II	Rezept III	Rezept IV
Kuhmilch	ml	71		86	36
Kondensmilch	ml	42			
Wasser, abgekocht	ml	42			
Rahm, 12 % Fett	ml	18			
Eidotter	g	5	10	8	5
Maiskeimöl	g	2	1	2	4
Speisequark	g				53
Kasein	g	2,9	4,6	3,6	
Zitronensäure	g	0,4			
Vitam. Mineralfutter	g	0,7	0,4	0,4	1,0
In 100 ml sind enthalten:					
verd. Energie	MJ	0,42	0,52	0,48	0,60
verd. Rohprotein	g	5,5	7,2	6,7	10,0
verd. Rohprotein/ 1 MJ verd. Energie	g	13	13,6	14	17
Calcium	mg	280	255	255	270
Phosphor	mg	190	210	200	230
Vitamin A	IE	2400	2500	2500	2400
Linolsäure	g	1,3	0,9	1,3	2,2

Als Fettkomponente kann bei Fleischfressern, deren Milchfett eher ungesättigt und langkettig ist, Speiseöl verwendet werden. Kuhmilchfett ist für Fleischfresser weniger verträglich, deshalb sollte als Wasser- und Lactoselieferant auch keine Vollmilch, sondern nur Magermilch eingesetzt werden. Saccharose ist als Zuckerquelle ungeeignet, Traubenzucker kann als Alternative eingesetzt werden (KIENZLE, 1999; KIENZLE und LANDES, 1995).

Bei längerfristigem Einsatz der Milchaustauscher muss geeignetes Mineralfutter eingemischt werden. Allerdings stellt die Löslichkeit der zugesetzten Mineralstoffe einen kritischen Punkt dar, wenn auf handelsübliche Ergänzungsfuttermittel zurückgegriffen wird, die ja nicht für das Einmischen in Milchaustauscher konzipiert

sind. Aus Praktikabilitätsgründen sind sie dennoch zu empfehlen. Vor dem Portionieren oder Verfüttern sollten sedimentierte Mineralstoffe jedoch aufgerührt werden. Bei sehr häufiger Indikation zu mutterloser Aufzucht wäre die Berechnung und Herstellung einer speziell für diesen Einsatzzweck geeigneten Mischung aus löslichen Mineralstoffverbindungen vorzuziehen (MUNDT, 1989).

KIENZLE (1999) empfiehlt einen unter Praxisbedingungen erprobten Milchersatz aus 40% Magerquark, 5% Eigelb, 48% Magermilch, 6% Speiseöl und 0,7% Mineralfutter, welches 10-20% Calcium und 3-8% Phosphor enthält. Ist die Zusammensetzung des Milchersatzes fehlerhaft, können schwerwiegende gesundheitliche Probleme auftreten, die sogar zum Tod führen können, wie Tab. 4 zeigt.

Tabelle 4
**Mögliche Folgen einer ungeeigneten Zusammensetzung
 des Milchersatzes für Hundewelpen**
 (aus KIENZLE, 1999)

Ursache	Folge
ungenügender Energiegehalt "zu dünn", z.B. verdünnte Kuhmilch	unzureichende Sättigung und Entwicklung, ggf. Gewichtsverluste und Tod
stark abweichendes Gerinnungsverhalten des Milchproteins, insbesondere Kuhmilch oder gerinnungsfähiges Casein* bei Monogastriern	grobfaserige Gerinnung zu gummiartigen Klumpen, Verdauungsstörungen, in Extremfällen letal
überhöhter Fettgehalt und/oder stark abweichendes Fettsäurenmuster, z.B. kurz- bis mittelkettiges gesättigtes Fett bei Fleischfressern	Durchfall oder Verstopfung
überhöhter Lactosegehalt	Durchfall
Abweichungen des Aminosäurenmusters im Protein (z.T. bei gleichzeitig niedrigem Proteingehalt in der Ersatzmilch)	Katarakte
fehlerhafte Versorgung mit Calcium und/oder Phosphor (Mangel oder Überversorgung, Überversorgung vor allem bei grossen Hunderassen kritisch)	Störungen der Skelettentwicklung, Saugwelpen sind besonders empfindlich gegen exzessive Calciumzufuhr
überhöhte Gehalte an Natrium, Kalium und Chlorid	Durchfall, Natriumintoxikation (ZNS-Störungen)
unzureichende Eisen- und/oder Kupfergehalte	Anämie

2.3.4. Milchmenge und Fütterungsfrequenz

Die für neugeborene Welpen nötige Milchmenge sollte weder über- noch unterschätzt werden. Jungwelpen besitzen kein Speicherfett und nur geringe

Glykogenreserven, die innerhalb von drei Stunden post partum bereits zu 50% mobilisiert sind (MUNDT,1989). Eine baldige Nahrungsaufnahme ist deshalb unverzichtbar. Für neugeborene Hunde kann als Richtwert bei Verwendung eines energetisch adäquaten Milchaustauschers (MAT) eine tägliche Milchmenge von 16 ml MAT pro 100 g Lebendmasse angenommen werden. Zu ähnlichen Werte kam HOSKINS (1999) durch Berechnungen über den Energiebedarf von Welpen, den er mit 92,4-109,2 kJ/100g KGW angibt und einem üblichen Energiegehalt kommerziell erhältlicher Ersatzmilchprodukte von 4,2-5,2 kJ verdauliche Energie/ml MAT. Demnach sollten Welpen in der ersten Woche täglich 13 ml, in der zweiten Woche 17 ml, in der dritten Woche 20 ml und in der vierten Woche 22 ml pro 100 g KGW bekommen. Die Milchmenge, die ein Welpen auf einmal aufnehmen kann, wird vor allem durch das Magenvolumen beschränkt. Die meisten Welpen können abhängig von ihrer Körpergröße nur 10-20 ml pro Fütterung aufnehmen (MAPLETOFT et al., 1974). Von der Mutter aufgezogene Welpen würden aber niemals so viel auf einmal aufnehmen, sondern öfters kleine Mahlzeiten zu sich nehmen. Sie passen sich aber schnell an größere, weniger häufige Fütterungen an (BAINES, 1981). KIENZLE und LANDES (1995) machen die Fütterungsfrequenz vom Gesundheits- und Entwicklungsstatus abhängig und empfehlen dementsprechend eine Fütterungshäufigkeit von 4-8 mal täglich. Wenn stündlich gefüttert wird, ist die Zusammensetzung der Milch nicht ganz so wichtig wie bei nur fünfmaliger Fütterung am Tag. Dann muss der Milchersatz nämlich eine ausreichende Nährstoffkonzentration aufweisen. Deshalb sollten die Gehalte des Milchersatzes auch besser auf die ursprüngliche Substanz als auf die Trockensubstanz bezogen werden. Ein ungenügend konzentrierter Milchaustauscher kann also durch die Steigerung der Fütterungsfrequenz durchaus ausreichend sein (BAINES, 1981).

Der Energiebedarf von Welpen, aus dem sich über den Energiegehalt des Milchaustauschers die nötige Milchmenge pro Tag errechnen lässt, ist in Abb. 1 dargestellt.

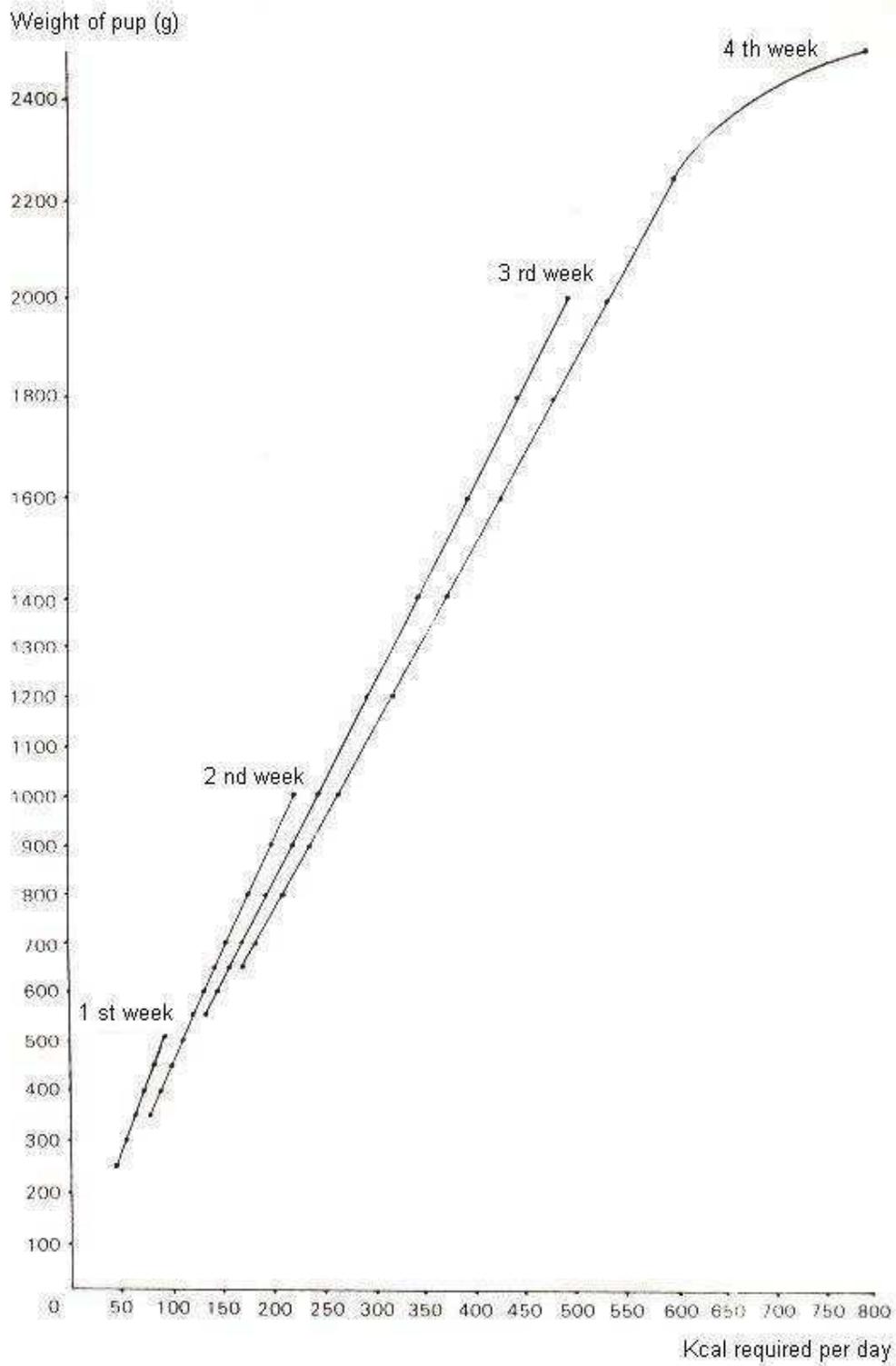


Abb. 1: Energiebedarf von Welpen in Abhängigkeit von Alter und Gewicht (nach BAINES, 1981)

2.3.5. Fütterungstechnik

2.3.5.1. Flaschenfütterung

Aus hygienischen Gründen sollte Milchaustauscher nur für je 48 Stunden angemischt und in für je eine Fütterung ausreichenden Portionen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden. Vor der Fütterung wird je eine solche Portion auf Körpertemperatur aufgewärmt. Am einfachsten und sichersten erfolgt die Fütterung mittels speziell für die Welpenaufzucht entwickelten Fläschchen, es können aber auch Saugflaschen für frühgeborene Kinder verwendet werden (HOSKINS, 1995 und 1999). Beim Vergleich verschiedener Gummisauger erwiesen sich solche mit gleichmäßig langgestreckter Spitze geeigneter als olivenförmige (MEIXNER, 1968). Das Loch im Sauger sollte so gross sein, dass aus der umgedrehten Flasche die Milch langsam heraustropft. Vor dem Einführen des Nippels in das Welpenmaul sollte ein Tropfen herausgepresst werden. Sobald sich der Nippel im Maul befindet, darf nicht mehr auf die Flasche gedrückt werden, um eine laryngotracheale Aspiration der Milch in die Lunge zu vermeiden (HOSKINS, 1999). Bereitet das Einführen des Nippels ins Maul Schwierigkeiten, so kann mit leichtem Druck von Daumen und Mittelfinger auf den Kieferwinkel die Mundspalte etwas geöffnet werden (MEIXNER, 1968). Der Kopf des Welpen wird am besten aufrecht und leicht gestreckt gehalten, die Flasche muss so gehalten werden, dass keine Luft geschluckt werden kann. Bei der Fütterung muss den Welpen das sogenannte Milchtreten ermöglicht werden. Durch leichtes Vor- und Zurückbewegen des Nippels im Maul können die Welpen zum Saugen animiert werden. Es ist zwar wünschenswert, dass der Welpen gut saugt, eine zu schnelle Futteraufnahme sollte aber vermieden werden, da Milch über die Nase ablaufen und über Aspiration eine Pneumonie verursachen kann (RÜSSE und SCHWAB, 1990).

Bei den ersten Fütterungen mit Milchaustauscher sollte weniger als die empfohlene Menge gegeben werden. Die Menge wird dann langsam erhöht, ab dem dritten Tag kann normal gefüttert werden. Nach der Fütterung ist das Abdomen vergrößert, aber nicht übermäßig gespannt und der Welpen sollte sich in ruhendem Zustand befinden. An unterkühlte Welpen oder Welpen, die keinen starken Saugreflex aufweisen, sollte kein Milchaustauscher gefüttert werden. Die Saugflasche sollte nur verwendet

werden, wenn ein guter Saugreflex vorhanden ist (HOSKINS, 1999). Nach drei Wochen kann man die Welpen vom Teller füttern (SHEFFY, 1978).

2.3.5.2. Sondenfütterung

Eine Alternative zur Flaschenfütterung ist die Sondenfütterung. Hierzu können Ernährungs sonden für Kinder verwendet werden. Für Welpen mit einem Gewicht unter 300 g passt eine Sonde der Größe 5, für Welpen mit einem Gewicht über 300 g eine der Größe 8-10. Die Einführtiefe sollte auf der Sonde markiert werden um sicherzustellen, dass die Sonde in den Magen reicht, denn das Sondenende darf nicht im distalen Abschnitt des Ösophagus liegen. Als Richtlänge kann die Distanz von Nasenspitze zur letzten Rippe angenommen werden. Vor dem Einführen sollte die Sonde mittels einer aufgesetzten Spritze mit warmem Milchaustauscher gefüllt werden, um die Luft aus der Sonde zu verdrängen. Die befeuchtete Sonde wird langsam über Zungengrund und Speiseröhre in den Magen geschoben. Wenn das Tier hustet oder ein Widerstand auftritt, bevor die Sonde bis zur Markierung eingeführt ist, liegt die Sonde in der Luftröhre. Im Zweifelsfall muss die korrekte Lage der Sonde überprüft werden, zum Beispiel bei undeutlichem Schluckreflex. Wenn die Sonde richtig liegt, sollte der Milchaustauscher langsam über zwei Minuten appliziert werden, um den Magen nicht zu schnell zu füllen. Sollte eine Regurgitation von Milchaustauscher auftreten, muss das Füttern unterbrochen werden. Die nächste planmäßige Fütterung wird normal durchgeführt.

Die Fütterung mittels Sonde ist die am wenigsten zeitaufwendige Methode und kann mit ein wenig Übung auch vom Tierbesitzer durchgeführt werden. Trotzdem ist wegen der Risiken die Flaschenfütterung vorzuziehen. Um eine Magenüberladung zu vermeiden, muss die in der ersten Woche auf 50 ml/kg KGW beschränkte Kapazität des Welpenmagens beachtet werden. Aspirationen treten häufiger auf. Das Saugdefizit kann zum Körperbesaugen führen (MUNDT, 1989, RÜSSE und SCHWAB, 1990). SHEFFY (1978) warnt davor, schwache und unterkühlte Welpen mittels Sonde zu füttern, da mit Hypothermie oft eine viscerale Paralyse einhergeht. Bei diesen Welpen muss zuerst die Hypoglykämie behandelt werden, indem man eine zu gleichen Teilen aus Ringerlactatlösung und 5%iger Glucoselösung

bestehende, aufgewärmte Lösung in einer Dosierung von 3,5-4 ml pro 100 g KGW subcutan verabreicht. Die Körpertemperatur sollte dann langsam durch eine Umgebungstemperatur von 30 bis 32°C erhöht werden. An diese Erstbehandlung schließt sich die orale Verabreichung von 10%iger Glucoselösung alle 30 Minuten, bis die Rektaltemperatur auf 32,2°C angestiegen ist. Dann kann statt Glucoselösung Milchaustauscher verabreicht werden, allerdings bis der Welpen deutliche Besserung zeigt nicht die volle Portion (MOSIER, 1978).

2.3.6. Beifütterung

2.3.6.1. Beginn der Beifütterung

Über den Beginn der Befütterung herrscht in der Literatur weitestgehend Einstimmigkeit. Es wird empfohlen, im Alter von 3 bis 4 Wochen Festfutter anzubieten. Sobald die Welpen das Festfutter gut genug aus dem Napf fressen, wird die Milchaustauschermenge allmählich reduziert, bis die Welpen ausschließlich Welpenfestfutter aufnehmen. Dieses sollte mindestens dreimal täglich aufgenommen werden (HOSKINS, 1999). Es ist grundsätzlich darauf zu achten, dass alle Änderungen in der Fütterung allmählich vorgenommen werden, um das Auftreten von Unverträglichkeiten, insbesondere Diarrhoen, so weit wie möglich zu vermeiden (SHEFFY, 1978; THOMÉE, 1978). Wenn nötig, kann mit der Beifütterung schon begonnen werden, sobald die Welpen die Augen geöffnet haben (SHEFFY, 1978). Während der Einführung des Beifutters kann dieses zur besseren Akzeptanz in Wasser eingeweicht werden, wobei die Wassermenge nach und nach reduziert wird. Außerdem kann man die Welpen zum Fressen ermutigen, indem man das Maul mit dem Futter in Kontakt bringt, oder einen zuvor ins Futter getauchten Finger in das Maul führt (HOSKINS, 1995).

2.3.6.2. Art des Beifutters

Als Beifutter sollte man speziell für das Wachstum bestimmtes Futter verwenden (HOSKINS, 1995). Beim Einsatz hoher Anteile tierischer und pflanzlicher Proteine in

der Welpenfütterung ist auf hohe Verdaulichkeit und biologische Wertigkeit des Proteins zu achten. Sojaprotein weist zwar eine schlechtere Verdaulichkeit auf als Protein aus Fleisch, Innereien und Ei, führt aber nur selten zu Unverträglichkeiten. Welpen können schon früh Stärke verdauen und vertragen, deshalb können in den ersten Tagen nach dem Absetzen kohlenhydratreiche Produkte wie Getreideflocken oder Reis verwendet werden. Wiederum ist die Verdaulichkeit des Milchzuckers optimal und die der Stärke gut, jedoch werden Pentosane (Dickungsmittel) kaum verdaut (THOMÉE, 1978). Ist die Kohlenhydrat- oder Proteinverdaulichkeit nicht hoch genug, können Verdauungsstörungen auftreten. Dies ist zum Beispiel bei Fütterung übermäßiger Magermilchmengen an erwachsene Hunde der Fall, da sie die Lactose nicht mehr enzymatisch spalten können (MEYER et al., 1984). Wie andere unverdaute Nahrungsbestandteile auch, dient die Lactose im distalen Bereich des Verdauungskanals vermehrt als Substrat für die Entwicklung entsprechender unphysiologischer Keimarten (saccharolytischer und proteolytischer Keime), deren Stoffwechselprodukte zu Durchfall führen können. Unterstützend wirkt dabei noch übermäßig anflutendes Protein. Diese bakterielle Fehlgärung kann zur aufsteigenden Keimbesiedlung führen und unter Umständen auch Pankreas und Leber schädigen, was wiederum zur Verstärkung von Verdauungsstörungen führt. Zur Prophylaxe können geringe Mengen schwerverdaulicher Futterkomponenten wie zum Beispiel Luzernegrünmehl eingesetzt werden. Grundsätzlich sollten möglichst wenig unverdauliche Kohlenhydrate enthalten sein (THOMÉE, 1978).

Fette mit niedrigem Schmelzpunkt und stärkerer Emulgierung (Milchfett) werden besser verdaut als Fette mit hohem Schmelzpunkt (Rindertalg), am besten ist aber eine Mischung hochungesättigter (Soja) und gesättigter Fette (Talg), die eine ähnliche Verdaulichkeit und einen ähnlichen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren haben. Im Fettsäuremuster muss ein ausreichend hoher Gehalt an Linolsäure vorhanden sein. In der Säugeperiode wird der Welpen optimal damit versorgt, wenn die Mutter genug Linolsäure über das Futter bekommt. Im Welpenbeifutter kann der Zusatz von Linolsäure allerdings zu Schwierigkeiten hinsichtlich Akzeptanz, Pelletierfähigkeit und Haltbarkeit führen. Enthält das Beifutter nicht genügend Linolsäure, kann ein Teelöffel Maisöl auf 500 g Welpenfutter gegeben werden.

Innerhalb der ersten beiden Monate ist die Einlagerungsrate für Ca und P (relativ und absolut) überproportional hoch. Diesen Bedingungen sollte ein Welpenmischfutter gerecht werden (290 mg/kg KGW im 2. Monat). Die Mineralstoffe sollten eine möglichst gute Verdaulichkeit haben, Hundemilch enthält nahezu keine unverdauliche Rohasche (THOMÉE, 1978).

Eine bessere Verdaulichkeit als die üblichen Futterarten für Welpen stellen Mischfutter auf Milchbasis dar (MEYER et al., 1984), die Verdaulichkeit der TS liegt bei ca. 94 %. Das Milcheiweiß wird vorwiegend präzäkal abgebaut, wodurch es nur zu geringen mikrobiellen Umsetzungen im Dickdarm beiträgt. Die Proteinversorgung ist jedoch marginal, deshalb muss zusätzlich zu dem milchreichen Alleinfutter noch ca. 20 % Quark gefüttert werden. Tab. 5 gibt die empfohlene Zusammensetzung von Beifutter an.

Tabelle 5
Empfohlene Zusammensetzung von Beifutter für Welpen
bezogen auf die Trockensubstanz
 (nach LEWIS et al., 1987)

Verdaulichkeit	mind. 80 %
Protein	mind. 25 %
Fett	mind. 17 %
KJ verdauliche Energie/kg	16138
Rohfaser	Max. 5 %
Calcium	1-1,8 %, wobei Ca>P
Phosphor	0,8-1,6 %, wobei Ca>P

2.3.6.3. Futtermenge

Der abgesetzte Welpen sollte immer auf das durchschnittliche rassespezifische Wachstum hinzielend gefüttert werden (HEDHAMMAR et al., 1974; LEWIS et al., 1987).

Vor Überfütterung wird gewarnt. Geringgradiges Unterfüttern ist der Überfütterung vorzuziehen. Die ad-libitum-Fütterung ist nicht empfehlenswert, besser ist es, mindestens dreimal am Tag zu füttern, wobei dem Welpen 20 Minuten Zeit gelassen

wird, soviel zu fressen, wie er möchte, und das Futter dann zu entfernen. Frisches Wasser muss aber immer zugänglich sein (HOSKINS, 1995).

Das im Beifutter enthaltene Eiweiß, vor allem aber die Kohlenhydrate werden in der Regel in geringerem Umfang als die in der Milch enthaltenen Komponenten verdaut. Daher ist eine langsame Gewöhnung an die Beifutteraufnahme erforderlich. Dadurch wird einerseits die Induktion von Verdauungsenzymen gefördert, andererseits eine Überlastung des noch nicht adaptierten Verdauungssystems vermieden und so das Durchfallrisiko gesenkt.

2.3.6.4. Überernährung

Neben falschem Fütterungsmanagement und unausgewogenem Futter stellt auch die Überfütterung eine wichtige und häufige Ursache für ernährungsbedingte Probleme dar. Sie resultiert aus der falschen Überzeugung, dass die Maximalgröße im jeweiligen Alter erreicht werden sollte. Bei neugeborenen Welpen ist grünlicher Kot ein Indikator für vermehrte Gallensekretion und beschleunigte Darmpassage. Die Nahrungsaufnahme muss dann sofort reduziert werden (SHEFFY, 1978). Überernährung kann bei Welpen vor allem in der Skelettentwicklung zu Gesundheitsproblemen führen. Dies kann sogar Welpen betreffen, die nicht zu fett sind. Eine an maximalem Wachstum orientierte Fütterung geht nicht mit optimaler Skelettentwicklung einher. So wird bei ausgewogener Futterzusammensetzung durch übermäßige Energiezufuhr das Wachstum aller Gewebe beschleunigt. Die Lipogenese bleibt jedoch auf dem Niveau restriktiv gefütterter Hunde. Am meisten werden die Knochen beeinflusst. Während die Länge und das Volumen der Knochen mit dem Wachstum und dem Gewicht korreliert sind, ist der Aschegehalt und das spezifische Gewicht mit dem Alter korreliert. Klinisch fallen Lahmheit, Vergrößerung der Region am Übergang von Epiphyse zu Metaphyse und Berührungsschmerz auf (HEDHAMMAR et al., 1974).

In den ersten Lebensmonaten ist das Risiko für fütterungsbedingte Erkrankungen des Skeletts gross, besonders grosswüchsige Rassen sind betroffen. Über mittelgrosse Rassen ist bisher wenig bekannt. Durch eine mit Energieübersversorgung gleichzusetzende Überfütterung nimmt die Körpermasse zu, was sich nachteilig auf

das noch unreife Skelett auswirkt. So werden die Gelenkknorpel bei energetisch überversorgten Hunden weniger gut durch knöchernes Gewebe abgestützt. Bei disponierten Tieren kann die Hüftgelenksdysplasie gefördert werden. Überfütterte Junghunde weisen Veränderungen im Hormonhaushalt, insbesondere bei den das Knochenwachstum beeinflussenden Schilddrüsenhormonen, dem Wachstumshormon und dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor I auf (ZENTEK, 1999).

ZENTEK et al. (1995) stellten bei ad-libitum-Fütterung von Doggenwelpen ein vermehrtes Auftreten von Wachstumsstörungen am Skelett fest. Ein forciertes Wachstum begünstigte die Aussenrotation an Vorder- und Hintergliedmaßen. Eine Gewichtsbelastung der restriktiv gefütterten Kontrolltiere konnte die Effekte nicht in vollem Umfang reproduzieren. Da die Mineralisierung des Knochengewebes bei beiden Fütterungsarten auffallend konstant war, kann die Synthese von untermineralisiertem Knochenmaterial als Ursache für die beobachteten Skelettdeformationen ausgeschlossen werden.

Hinsichtlich des Auftretens von Skelettentwicklungsstörungen spielt vor allem der Gehalt an Fett und Kohlenhydraten eine Rolle, die Proteinzufuhr ist von untergeordneter Bedeutung. Zur Prophylaxe von Störungen in der Skelettentwicklung empfiehlt es sich, Welpen und Junghunde restriktiv zu füttern, dabei aber eine bedarfsdeckende Versorgung mit Mengen- und Spurenelementen sowie Vitaminen zu gewährleisten (ZENTEK, 1999).

2.4. Probiotische Substanzen

2.4.1. Einführung

Mit zunehmendem Wissen über die Ernährung steigt deren Stellenwert. Die Nahrung wurde früher lediglich als Bausteinlieferant für Wachstum und Erhaltung der Körpergewebe angesehen. Heute wird gezielt daran gearbeitet, den Einfluss verschiedener Nahrungsmittel auf Krankheitsrisiko und Körperfunktionen zu verstehen. Im Amerikanischen wird für diese gesundheitsorientierten Nahrungsmittel der Ausdruck „functional food“ verwendet. Nach ROBERFROID (2002) kann ein

Nahrungsmittel als funktionell betrachtet werden, wenn nachgewiesen werden konnte, dass durch die Beeinflussung einer oder mehrerer Körperfunktionen entweder das Wohlbefinden und die Gesundheit gesteigert oder das Krankheitsrisiko gemindert wird. Ein Nahrungsmittel kann durch das Konzentrieren, Hinzufügen oder Verbessern einer bestimmten Komponente zu einem „functional food“ gemacht werden. Für diese Komponente wird im Amerikanischen der Ausdruck „neutraceutical“ verwendet. Nach GIBSON und ROBERFROID (1995) handelt es sich dabei um einen Bestandteil von Nahrungsmitteln, der Körperfunktionen dahingehend verändert, dass im Folgenden positive Wirkungen auf den Gesundheitsstatus hervorgerufen werden. Es kann sich dabei um Zusätze wie Vitamine und Mineralstoffe oder aber um Stoffe handeln, die die intestinale Bakterienflora verändern.

Der menschliche Gastrointestinaltrakt stellt eine komplexes mikrobielles Ökosystem dar, das mehrere Hundert verschiedener Bakterienarten beherbergt. Diese Bakterien sind vor allem im Dickdarm zu finden, wobei das Colon mit mehr als 10^{11} Bakterien pro Gramm Coloninhalt sehr dicht besiedelt ist. Diese Organismen und ihre Metaboliten können sowohl positive als auch negative Wirkungen auf die Gesundheit des Wirts haben. Es herrscht ein dynamisches Gleichgewicht in diesem Ökosystem, welches durch Altern, Medikamente, Stress, Zusammensetzung der Nahrung und andere äussere Faktoren zum Negativen hin verändert werden kann. Die Aufrechterhaltung einer bakteriellen Darmflora, in der die nützlichen Arten vorherrschen und so wenig wie möglich proteinabbauende Vorgänge ablaufen, soll wichtig für die intestinale Gesundheit sein und ist natürlich auch stark abhängig von der Art der aufgenommenen Nahrung (CRITTENDEN, 1999). In Europa ist eine grosse Auswahl an Nahrungsmitteln, die Probiotika, Präbiotika und Symbiotika enthalten, auf dem Markt. Jährlich werden mit diesen „neutraceuticals“ weltweit über 100 Milliarden Euro erwirtschaftet (GIBSON und COLLINS, 1999). TEMMERMAN et al. (2002) geben eine Übersicht verschiedener kommerziell erhältlicher probiotischer Nahrungsmittel und verglichen die auf den Produkten deklarierten Mikroorganismen mit eigenen Analyseergebnissen.

Probiotika werden von FULLER (1989) definiert als lebende mikrobielle Nahrungsmittel- bzw. Futterzusatzstoffe, die den Wirtsorganismus durch

Verbesserung des intestinalen mikrobiologischen Gleichgewichts positiv beeinflussen. HAVENAAR und HUIS IN'T VELD (1992) definieren Probiotika als lebende Mikroorganismen, die nach Ingestion eine positive Wirkung bei der Prävention und der Behandlung von spezifischen pathologischen Bedingungen herbeiführen.

Bei einem *Präbiotikum* handelt es sich nach GIBSON und ROBERFROID (1995) um einen unverdaulichen Nahrungsbestandteil, der eine positive Wirkung auf den Wirt hat, indem er das Wachstum oder die Aktivität eines oder mehrerer Bakterien im Colon selektiv stimuliert.

Probiotische Substanzen sind Organismen und Substanzen, die die Darmflora „günstig“ beeinflussen (VELDMAN, 1992).

Ein *Symbiotikum* ist nach ROBERFROID (1998) eine Kombination von Pro- und Präbiotika, die den Wirt positiv beeinflusst, indem sie das Überleben und die Ansiedelung von lebenden mikrobiellen Futterzusatzstoffen im Gastrointestinaltrakt durch Stimulation von Wachstum oder metabolischer Aktivität eines oder mehrerer gesundheitsfördernder Bakterien fördert.

2.4.2. Geschichtliche Entwicklung

Schon vor Jahrzehnten wurde davon ausgegangen, dass der Verzehr fermentierter Milchprodukte eine Palette gesundheitsfördernder Effekte nach sich zieht. Der russische Nobelpreisgewinner Elie Metchnikoff vom Pasteur-Institut Paris hatte die Theorie aufgestellt, dass die Langlebigkeit bulgarischer Bauern in der Aufnahme fermentierter Milchprodukte begründet war (METCHNIKOFF, 1908). Am Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelte er den ersten wissenschaftlichen Versuchsplan zur Untersuchung der Wirkungen von Probiotika.

2.4.3. Probiotische Mikroorganismen

Eine große Gruppe der probiotischen Mikroorganismen stellen die Milchsäureproduzierenden Bakterien dar, zu denen die Genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* und *Enterococcus* zählen (CARR et al. 2002). Am häufigsten werden die Bakterienspezies *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* als Probiotika genutzt (FULLER, 1992), die auch natürlicherweise in der Darmflora des Menschen vorkommen. Vor allem Bifidobakterien stellen sogar einen grossen Teil der Darmflora des Menschen (CRITTENDEN, 1999). Nach MEURMAN et al. (1995) und SILVA et al. (1987) hemmen lactatproduzierende Bakterien in vitro viele verschiedene Pathogene, einschließlich *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* und *Clostridium difficile* und werden sowohl bei Menschen als auch bei Tieren zur Behandlung eines breiten Spektrums von gastrointestinalen Störungen verwendet. Aber auch bestimmte Pilze, wie die erfolgreich beim Durchfall des Menschen angewendeten *Saccharomyces boulardii* (Perenterol®) und einige Hefen besitzen probiotische Wirkungen. In probiotischen Präparaten können auch mehrere verschiedene Mikroorganismen enthalten sein. Tab. 6 zeigt eine Übersicht von bei Mensch und Tier häufig als Probiotika eingesetzten Mikroorganismen.

Tabelle 6

Mikroorganismen, die bei Mensch und Tier als Probiotika eingesetzt werden (nach GOLDIN, 1998)

<i>Bakterien</i>				<i>Hefen und Schimmelpilze</i>
Lactobacillus	Bifidobacterium	Streptococcus	Leuconostoc	<i>A. cerevisiae</i>
acidophilus	bifidum	lactis	Pediococcus	<i>C. pintolopesii</i>
plantarum	infantis	cremoris	Propionibacterium	<i>A. niger</i>
casei	longum	salivarius subsp.	Bacillus	<i>A. oryzae</i>
rhamnosus	thermophilum	thermophilus	Enterococcus	
GG	adolescens	intermedius	E.faecium	
delbrueck subsp.	animalis			
Bulgaricus				
reuteri				
fermentum				
brevis				
lactis				
cellobiosus				

2.4.4. Wirkungen von Probiotika

SANDERS (2000) hat die Wirkungen von Probiotika folgendermaßen beschrieben:

- Antimikrobielle Aktivität
- Antagonistische Wirkung gegen bakterielle Ansiedlung pathogener Keime im Darm
- Immunologische Wirkungen
 - Funktion als Adjuvans
 - Stimulation der Cytokinexpression
 - Stimulation der Phagozytose durch periphere Blutleukozyten
- Antimutagene Effekte
- Antigenotoxische Effekte
- Einfluss auf die Enzymaktivität im Darm
- Enzymbereitstellung im Darm

2.4.5. Wirkungsmechanismen von Probiotika

Es gibt viele Theorien, wie Probiotika ihren Wirt vor Darmerkrankungen schützen können. Alle Vorgänge, bei denen Bakterien die Kolonisation des Darms durch andere Bakterien hemmen, werden als „Kolonisationswiderstand“ zusammengefasst.

2.4.5.1. Produktion von inhibitorischen Substanzen

Probiotische Bakterien produzieren verschiedene Substanzen, die hemmend auf grampositive wie gramnegative Bakterien wirken. Zu diesen Substanzen gehören organische Säuren, Wasserstoffperoxid und Bakteriozine. Sie wirken nicht nur, indem sie die Zahl der lebenden Bakterien reduzieren, sondern auch durch Hemmung des bakteriellen Stoffwechsels und der Toxinproduktion (ROLFE, 2000).

Auch GIBSON und COLLINS (1999) erwähnen bakterielle Stoffwechselprodukte wie organische Säuren, die lokal den pH-Wert unter den für die Vermehrung pathogener Keime erforderlichen Mindestwert senken können. Außerdem

produzieren manche Lactobazillen und Bifidobakterien natürliche antibiotisch wirksame Stoffe, die ein breites Spektrum aufweisen, beispielsweise Nisin und Bifidocin.

2.4.5.2. Blockierung von Anheftungsstellen

Die kompetitive Hemmung von Anheftungsstellen der Bakterien an der epithelialen Oberfläche der Darmschleimhaut ist ein weiterer Wirkungsmechanismus von Probiotika.

2.4.5.3. Nahrungskonkurrenz

Es gibt Überlegungen, dass Probiotika Nährstoffe verwenden, die sonst von pathogenen Mikroorganismen aufgenommen werden würden, jedoch fehlt der Nachweis in vivo.

2.4.5.4. Zerstörung von Toxinrezeptoren

Es wird postuliert, dass *Saccharomyces boulardii* Tiere gegen durch *Clostridium difficile* verursachte Darmerkrankungen schützt, indem es den Toxinrezeptor an der Darmmukosa zerstört.

2.4.5.5. Immunstimulation

Die Stimulation der spezifischen und unspezifischen Abwehr soll ein weiterer Wirkungsmechanismus der Probiotika sein. In dieser Hinsicht haben vor allem die lactatproduzierenden Bakterien Aufmerksamkeit erlangt. So soll vor allem die unspezifische Abwehr, aber auch Zellen der spezifischen Abwehr stimuliert werden. Häufig wird vermehrte Phagozytoseaktivität und ein Anstieg von immunmodulatorischen Molekülen wie sekretorischem Immunglobulin A beobachtet

(GIBSON und COLLINS, 1999). ISOLAURI et al. (1995) demonstrieren über die gleichzeitige Applikation eines oralen Impfstoffes gegen Rotaviren und des Probiotikums *Lactobacillus rhamnosus* GG dessen Adjuvanseffekt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde eine signifikante Erhöhung der Rotavirus spezifischen IgM-Antikörper beobachtet.

2.4.6. Präbiotika

Um die Anzahl gesundheitsfördernder Organismen im Gastrointestinaltrakt zu vermehren, können neben der direkten Applikation von probiotischen Mikroorganismen auch Präbiotika eingesetzt werden. Diese dienen den gesundheitsfördernden Organismen als selektive Nährstoffquelle und verschaffen ihnen einen Vorteil gegenüber anderen Bakterien im Ökosystem. Damit ein Präbiotikum als verdauliches Substrat für Bakterien im Colon dienen kann, ist die erste Voraussetzung, dass es zumindest teilweise unverdaut den Dünndarm erreicht. Wenn es im Colon ankommt, muss es selektiv das Wachstum und/oder die Aktivität von gesundheitsfördernden Bakterien stimulieren und darf dabei keine fördernde Wirkung auf gesundheitsschädliche Bakterien haben. Bifidobakterien und Lactobacillen werden im Allgemeinen als wünschenswert betrachtet und sind das Hauptziel von Präbiotika. Als weitere positive Eigenschaft eines Präbiotikums wird es angesehen, wenn durch seine Verabreichung proteinabbauende und potentiell pathogene Organismen wie Clostridien und Enterobacteriaceae reduziert werden. Durch Nahrungszusätze wird also die Zusammensetzung und das Gleichgewicht der Darmflora verändert (CRITTENDEN, 1999).

2.4.6.1. Anwendungsbereiche für Präbiotika

Folgende Anwendungsbereiche für Präbiotika werden vorgeschlagen (CRITTENDEN, 1999):

- Vorbeugung von exogenen und endogenen Darminfektionen
- Kontrolle über Serumtriglyceride und Cholesterol

- Verbesserung der Mineralaufnahme
- Reduktion von Colonicarcinomen

2.4.6.2. Wirkung von Präbiotika auf die intestinale Mikroökologie

Ein Grund, warum im Colon so viele verschiedene Bakterienarten vorkommen, ist die Vielfalt der Kohlenstoffquellen, die ihnen zur Verfügung steht. Stärke, andere Polysaccharide, unverdaute Zucker, Oligosaccharide, aber auch Proteine können von der Mikroflora umgesetzt werden. Außerdem dienen als endogene Quellen noch Glykoproteine aus dem Mukus, abgestoßene Epithelzellen und Stoffwechselprodukte anderer Mikroorganismen. Den Hauptanteil stellen die unverdauten Kohlenhydrate aus der Nahrung, die im Colon von der Mikroflora vor allem zu kurzkettigen Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat, aber auch zu Lactat und zu Gasen wie Kohlendioxid, Methan und Wasserstoff umgesetzt werden. Die kurzkettigen Fettsäuren werden schnell vom Wirt absorbiert und verstoffwechselt. So wird durch die mikrobielle Aktivität Energie gewonnen, die ansonsten für den Wirt nicht zur Verfügung stehen würde (CUMMINGS und MACFARLANE, 1997).

Die meisten der im Colon vorkommenden Bakterien sind saccharolytisch und wirken bei der Kohlenhydratfermentierung mit, den Hauptanteil dieser Bakterien stellen die Genera Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus und Clostridium. Die meisten bisher verwendeten Präbiotika gehörten zu den Kohlenhydraten. Obwohl die verschiedensten Kohlenhydrate verwendet worden waren, war der Effekt sehr ähnlich - sie alle stimulierten selektiv die Proliferation von Bifidobakterien. Zwar ist die Wirkungsweise noch nicht geklärt, jedoch besitzen Bifidobakterien und auch einige Lactobacillen eine Reihe von Glykosidasen, die es ihnen ermöglicht, sich auf wechselnde Nahrung einzustellen. Außerdem tolerieren sie das durch die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren entstandene saure Milieu und haben so einen Vorteil gegenüber anderen Bakterien (CRITTENDEN, 1999).

2.4.7. Vergleich von Präbiotika mit Probiotika

Nach GIBSON und COLLINS (1999) haben Präbiotika gegenüber Probiotika vor allem hinsichtlich des Überlebens einen Vorteil. So wird Nahrung nach ihrer Aufnahme unter anderem mit Magensäure, Gallensäure und Pankreassekreten konfrontiert. Probiotika werden davon wahrscheinlich in ihrem Wachstum und Überleben negativ beeinflusst. MARTEAU et al. (1993) erachten es für offensichtlich, dass Probiotika diese Hindernisse überwinden können und das Colon unbeeinträchtigt erreichen. Allerdings treten sie dort in Konkurrenz mit der vorhandenen Darmflora, durch die die meisten Bindungsstellen am Darmepithel bereits besetzt sind. Außerdem ist anzunehmen, dass sich gerade diese Darmflora als Anpassung an die bereitgestellte Nahrung und das Darmmilieu etabliert hat. Eventuell existiert sogar eine Anpassung des Bakterienstammes an das Wirtsindividuum, was wiederum die Ansiedlung eines exogenen Stammes verhindern würde. Da Präbiotika auf endogene Bakterien wirken, ist es unwahrscheinlich, dass immunologische Probleme aufgrund exogener Antigenzufuhr entstehen. Auch ist die Verabreichung von Probiotika meist auf Frischprodukte beschränkt, weshalb darauf geachtet werden muss, dass ein ausreichend hoher Gehalt an lebenden Organismen vorliegt (CRITTENDEN, 1999). Folglich könnte es nützlicher sein, mit Hilfe von Präbiotika zu versuchen, die „einheimischen“ probiotischen Mikroorganismen zu fördern.

Als Vorteil der Administration von Probiotika gegenüber der von Präbiotika betrachten GIBSON und COLLINS (1999) jedoch den noch nicht erbrachten Nachweis, daß Präbiotika zusammen mit im Darm residenten Mikroorganismen dieselbe Wirkung entfalten, wie die exogen zugeführten Probiotika. Doch stellt die Fähigkeit zum Überleben der Darmpassage für einige potentielle Probiotika tatsächlich noch ein Problem dar. Dies könnte durch die Kombination von Probiotika mit Präbiotika zu sogenannten Symbiotika gelöst werden. So würde das lebende Probiotikum zusammen mit einem Substrat für sein Wachstum und somit auch für sein Überleben, verabreicht werden. Hierbei wird die Spezifität des Präbiotikums durch die Fähigkeit des geförderten Bakteriums bestimmt, dieses Substrat abzubauen und zu verwerten.

2.4.8. Einsatz probiotischer Substanzen

2.4.8.1. in der Humanernährung

Es stellt sich die Frage, ob die Anstrengungen, die zum Verständnis der Wirkungsmechanismen von Probiotika unternommen werden, zu rechtfertigen sind. Hierzu müssten sie einen deutlichen Unterschied an der Gesundheit des Durchschnittsverbrauchers ausmachen. Einige neue Gesundheitsrisiken könnten den Probiotika in Zukunft eine wichtige Rolle einräumen. So könnten Probiotika durch eine risikofreie Barriere gegen mikrobielle Infektionen und negative Einflüsse der natürlichen Darmflora eine grosse Bedeutung in der Prophylaxe gegen einige neue mikrobielle Gefahren bekommen. Solche Gefahren könnten lebensbedrohliche Shiga-like Escherichia coli-Stämme, Massensterben bei Kindern in Entwicklungsländern verursachende Rotaviren (PARASHAR et al., 1998), Campylobacter jejuni als die Hauptursache der bakteriellen Gastroenteritis (ALTEKRUSE et al., 1999) und die immer häufiger auftretende Immundepression verschiedener Ursache sein. Nach FULLER (1991) stellt schon die normale Darmflora eine natürliche Barriere gegen pathogene und opportunistische Mikroorganismen dar. Nach ROLFE (2000) kommen Probiotika dann zum Einsatz, wenn diese normale Darmflora zum Beispiel durch Antibiotika, andere Medikamente oder Diät gestört ist und der Organismus somit anfälliger für Krankheiten wird. Solche Krankheiten können durch Antibiose verursachter Durchfall, pseudomembranöse Colitis oder „bacterial overgrowth“ des Dünndarms sein.

Schlüsselfunktionen von *Probiotika* in der Humanernährung stellen die Wirkungen auf die gastrointestinale Gesundheit, das Immunsystem und Krebserkrankungen dar. Epidemiologisch lassen sich solche Wirkungen nur schwierig nachweisen. Es ist zwar einfach, Krankheitsrisiken epidemiologisch mit Nahrungsgewohnheiten in Verbindung zu bringen, subtilere Änderungen der Gesundheit lassen sich aber nicht so leicht nachweisen. Problematisch sind auch die komplexen und individuellen Unterschiede in der Nahrungszusammenstellung. Deshalb gibt es nur wenige epidemiologische Untersuchungen.

Über Wirkungen von probiotischen Substanzen auf Colonkrebs berichten GIBSON und COLLINS (1999). Sie vermuten, dass die Ursache der 100fach höheren Häufigkeit von Krebs im Dickdarm als im Dünndarm in der dichteren Besiedlung des Dickdarms mit Bakterien liegt. In der Tat produzieren bestimmte Dickdarmbakterien kanzerogene Stoffe wie Diacylglycerole, Fecapentaene und Nitrosamine. Die Akkumulation von solchen Produkten kann möglicherweise folgendermaßen verhindert werden: Manche Bakterien produzieren Stoffe wie Butyrat, die die Apoptose fördern und die gesunde Darmschleimhaut ernähren. Diese lassen sich durch eine ausgewogene Steigerung der Kohlenhydratzufuhr fördern. Es kann auch versucht werden, die Gesamtheit der Darmbakterien in ihrem Stoffwechsel weg von der Proteolyse hin zur Saccharolyse zu verschieben und so die Anzahl von Clostridien und Bacteroides zu vermindern. Vor allem Clostridien produzieren in Anwesenheit von bestimmten Fetten das Karzinogen Diacylglycerol im Dickdarm. Auch *Präbiotika* könnten über die Modulation der intestinalen Darmflora und der Produktion von kurzkettigen Fettsäuren das Risiko für die Entstehung eines Colonkarzinoms reduzieren, da die Zusammensetzung und die Aktivität der Mikroflora eine Rolle in der Entstehung eines Colonkarzinoms spielen. So produzieren einige von Bakterien stammende Enzyme genotoxische Produkte (ROWLAND, 1995). Bifidobakterien und Lactobacillen haben im Gegensatz zu Eubakterien und Clostridien nur niedrige Aktivitäten dieser Enzyme. Präbiotika könnten eingesetzt werden, um die Enzymkonzentration zu verringern.

Ein weiterer Punkt in der Entstehung von Colonkarzinomen ist die Umwandlung von primären zu sekundären Gallensäuren, die eine Rolle in der Ätiologie von Colonkarzinomen spielen. Da diese nur bei einem pH von über 6,5 gebildet werden, könnten Präbiotika dem über die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren und damit einhergehender Senkung des pH-Wertes entgegenwirken (CRITTENDEN, 1999).

Ein weiterer Effekt ist die Wirkung auf Blutlipide. Nach FERNANDES et al. (1987) ist es wahrscheinlich, dass oral aufgenommene lactatproduzierende Bakterien eine senkende Wirkung auf den Cholesterolspiegel haben und somit eine positive Wirkung auf das Risiko koronarer Herzerkrankungen haben könnten. Jedoch konnte dies bisher noch nicht einheitlich nachgewiesen werden. Weiter muss noch untersucht werden, welche bakteriellen Stoffwechselprodukte den Fett- und Cholesterolspiegel beeinflussen könnten, ob lactatproduzierende Bakterien

Cholesterol direkt verwerten können und ob die Cholesterolaufnahme im Darm vermindert werden kann.

Als Wirkungen auf Pathogene erwähnen GIBSON und COLLINS (1999) die lactatproduzierende Mikroflora des menschlichen Gastrointestinaltraktes, die eine wichtige Rolle als Kolonisierungswiderstand spielt. GIBSON et al. (1993) beschreiben die Reduktion bakteriell und viral bedingter Darminfektionen durch probiotische Mikroorganismen. Eine besonders bedeutende antimikrobielle Wirkung haben GIBSON und COLLINS (1999) bei den Bifidobakterien entdeckt: Deren antimikrobielle Wirkung richtet sich sowohl gegen gram-positive als auch gegen gram-negative Darmbakterien und schließt den verocytotoxischen E. coli-Stamm O157:H7 ein. Es wird ein Zusammenhang zwischen dem verringerten Vorkommen von Bifidobakterien bei älteren Menschen und dem gehäuften Vorkommen von pathogenen Keimen vermutet.

Präbiotika erhöhen den Kolonisierungswiderstand vermutlich dadurch, dass die von ihnen geförderten Lactobacillen und Bifidobakterien den intestinalen pH-Wert erniedrigen. Viele intestinale Pathogene und proteinabbauende Bakterien bevorzugen aber ein neutrales Milieu. So kann auch die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren, die von der Präbiotikafermentierung stammt, zur erschwerten Ansiedlung der oben genannten Organismen führen (CRITTENDEN, 1999).

2.4.8.2. bei Nutztieren

Im Nutztierbereich können Probiotika gute Erfolge beim Durchfallgeschehen erzielen. Die Bakterienflora ist während einer Durchfallerkrankung verändert. Bifidobakterien, Lactobacillen und Bacteroides sind weniger zahlreich, Coliforme dagegen vermehrt vorhanden (ROBINSON et al., 1984). Probiotika können durch die Veränderung der Darmflora Durchfallerkrankungen vorbeugen. Ferkel, denen von Geburt an Lactobacillen gefüttert worden waren, wiesen eine geringere Menge an Coliformen im Kot auf. Das Verhältnis von Lactobacillen zu Coliformen hatte sich von 2:1 (Kontrolltiere) auf 1280:1 verändert. Dieses veränderte Verhältnis schützte die

Schweine vor Krankheit, als sie mit einem enteropathogenen E.Coli-Stamm konfrontiert wurden (MURALIDHARA et al., 1977).

2.4.8.3. bei Hunden

MOLITOR (1996) untersuchte die Wirkung von *Enterococcus faecium* auf adulte Hunde und früh abgesetzte Welpen. Es wurde eine erhöhte Enterokokkenzahl im Kot und Chymus festgestellt. Allerdings war diese Erhöhung nicht von Dauer, nach Absetzen der Probiotikumgaben stellte sich die ursprüngliche Anzahl wieder ein. *Enterococcus faecium* konnte sich also nicht dauerhaft Ansiedeln. Im Ileumchymus war der Lactatgehalt erhöht und der pH-Wert reduziert.

WEESE und ANDERSON (2002) demonstrierten, dass *Lactobacillus rhamnosus* GG die Passage durch den Gastrointestinaltrakt von Hunden überlebt, da dieses Bakterium im Kot wiedergefunden wurde. Es waren verschiedene Dosierungen verabreicht worden, bei der Gruppe mit der höchsten Dosierung (5×10^{11} KbE pro Tag) wurden signifikant mehr *Lb. rhamnosus* GG im Kot nachgewiesen als bei niedriger dosierten Gruppen. Allerdings konnten sich die Bakterien ebenfalls nicht dauerhaft im Darm ansiedeln.

PASUPATHY et al. (2001) konnten bei der Verabreichung von *Lactobacillus acidophilus* an 10-wöchige Welpen keine signifikanten Veränderungen feststellen. Während der 13-wöchigen Versuchsperiode zeigte die Versuchsgruppe etwas höhere Zunahmen als die Kontrollgruppe und die *Lactobacillen* zeigten eine kompetitive Ansiedlung im Magen-Darm-Trakt. Der durch die Supplementierung mit *Lactobacillus acidophilus* erreichte positive Effekt während der Wachstumsphase wurde jedoch als bedeutungslos für das weitere Leben erachtet.

2.5. Blutparameter bei Hundewelpen

2.5.1. Rotes Blutbild

2.5.1.1. Erythrozyten

Der Embryo besitzt fast ausschließlich kernhaltige, sehr grosse rote Blutkörperchen (primitive Erythroblasten = Megaloblasten), die im Dottersack außerhalb des Embryos gebildet werden. In der frühen Fetalphase übernimmt die Leber die Blutbildung (hepatische Erythropoese), die Milz ist in geringem Maße beteiligt (lienale Erythropoese). Schon etwa ab der Mitte der Gravidität beginnt die Bildung roter Blutzellen auch im fetalen Knochenmark (myeloische = medulläre Erythropoese). Bis zur Geburt wird die hepatische Erythropoese langsam von der medullären Blutbildung abgelöst und bald nach der Geburt ganz eingestellt (WALSER, 1990).

Beim Neugeborenen sind nach WALSER (1990) noch unreife Erythrozyten zu finden, deren Durchmesser größer ist als bei Erythrozyten Erwachsener (Tab. 7). Typisch für die Neugeborenenperiode ist neben dieser Makrozytose eine Anisozytose (ungleich grosse Erythrozyten). Es kommen auch Poikilozytose und manchmal Mikrozyten und Howell-Jolly-Körper vor (EARL et al., 1973).

Die hohe Erythrozytenzahl des Neugeborenen bleibt über kurze Zeit bestehen und sinkt dann während der ersten drei Lebenswochen ab (WALSER, 1990; KIENZLE et al., 1985). Ab der dritten Woche ist sie deutlich erniedrigt, normalisiert sich aber nach Einsetzen der Beifütterung im Laufe von 3-4 Wochen (KIENZLE et al., 1985). WALSER (1990) beschreibt einen Anstieg der Erythrozytenzahl ab der vierten Lebenswoche und das Erreichen des bleibenden Wertes bis zum 6. Monat. MEIXNER (1968) stellte in seinen Untersuchungen bei mutterlos aufgezogenen Welpen eine stärkere Anämie in der dritten Lebenswoche fest als bei natürlich aufgezogenen Welpen. Fraglich ist allerdings, inwiefern die damals eingesetzten kommerziellen Milchaustauscher in ihrer Zusammensetzung mit der Muttermilch übereinstimmten und ob die stärkere Anämie durch die mutterlose Aufzucht begründet werden kann oder auf die Ernährung zurückzuführen ist.

2.5.1.2. Hämoglobin

Der Hämoglobingehalt ändert sich parallel zur Erythrozytenzahl. Zum Zeitpunkt der Geburt ist er relativ hoch und sinkt dann in den ersten drei Lebenswochen auf einen Tiefpunkt ab (WALSER, 1990; KIENZLE et al., 1985). Das Hämoglobin (Hb) normalisiert sich ebenfalls nach dem Beginn der Beifütterung (KIENZLE et al., 1985). Nach WALSER (1990) steigt der Hämoglobinwert ab der vierten Woche und erreicht den bleibenden Wert bis zum 6. Monat. Bei mutterlos aufgezogenen Welpen stellte MEIXNER (1968) im Vergleich zu natürlich aufgezogenen Welpen einen um ca. 15 % erniedrigten Hämoglobinwert in den ersten drei Wochen fest. Er beobachtete ein etwas steileres Absinken bei den mutterlos aufgezogenen Welpen mit einem Tiefpunkt an Tag 18. Danach stieg der Gehalt wieder an und normalisierte sich mit dem Einsetzen der Beifütterung bald auf das Niveau normal aufzogener Welpen (MEIXNER, 1968). Dies spricht dafür, dass nicht die mutterlose Aufzucht, sondern der von MEIXNER verwendete Milchaustauscher für die niedrigen Erythrozyten- und Hämoglobinwerte verantwortlich zu machen ist.

2.5.1.3. Erythrozytenindices

In der Neugeborenenphase sind Durchmesser und Volumen der Erythrozyten (MCV, mean corpuscular volume) kleiner, der Hb-Gehalt des einzelnen Erythrozyten (MCH, mean corpuscular hemoglobin) und die Hb-Konzentration der Erythrozyten (MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration) verringern sich allmählich. Dieser Übergang vollzieht sich von einem Zeitpunkt lange vor der Geburt bis zu seinem Abschluss nach dem Säuglingsalter (WALSER, 1990).

2.5.2. Weißes Blutbild

Das weiße Blutbild (Tab. 7) alleine eignet sich zwar selten direkt zu einer Diagnose, es gibt jedoch oft Hinweise auf zugrundeliegende Krankheiten (BOUNOUS et al., 1995). Die Leukozytenzahl und das Differentialblutbild von Hunden unter sechs Monaten liegen im Allgemeinen an der oberen Grenze der durchschnittlichen Werte

adulter Hunde und variieren bei manchen Rassen. So haben Beagles im Vergleich zu anderen Rassen üblicherweise eine leicht erhöhte Leukozytenzahl (JAIN, 1986). Untersuchungen des Blutes von Beaglewelpen (BULGIN et al., 1970, EARL et al., 1973, LATIMER und MEYER, 1989) haben ergeben, dass die Leukozytenzahl von der Geburt (16.500/ μ l) bis zum Alter von 2-3 Monaten (17.900/ μ l) hoch ist, mit einem vorübergehenden Abfall in der frühen Saugphase (10.500/ μ l). Nach MEIXNER (1968) ist bei mutterlos aufgezogenen Welpen in der dritten Woche ein höherer Anstieg der Leukozytenzahlen zu beobachten als bei natürlich aufgezogenen Welpen. Die Veränderungen der Neutrophilenzahl verlaufen hierzu parallel, mit nur wenigen stabkernigen, neutrophilen Granulozyten und Metamyelozyten. Die Lymphozyten steigen nach der Geburt von einem Durchschnittswert von 2500/ μ l auf 4100/ μ l und erreichen ihren Höhepunkt von 6000/ μ l im Alter von 1,5-2 Monaten. Die Gesamtleukozyten, Neutrophilen und Lymphozyten fallen bis zum Alter von 6 Monaten auf das Niveau adulter Hunde.

Nach BUSCHMANN (1990) ist trotz des eindeutigen Verlaufs der Durchschnittswerte die erhebliche Streuung der Einzelwerte zu beachten. Bei Jungtieren muss damit gerechnet werden, dass eine einwandfreie Blutentnahme mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist und das Tier sich aufregt, was zu fehlerhaften Werten führen kann. Damit lassen sich auch die nicht selten widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse erklären. Für die durch Aufregung verursachte physiologische Leukozytose gibt JAIN (1986) als typische Werte über 20.000 Leukozyten/ μ l, eine milde Neutrophilie mit 15.000-20.000/ μ l und eine Lymphozytose mit über 6.000 Lymphozyten/ μ l an.

2.5.2.1. Neutrophile Granulozyten

Sowohl infektiöse als auch nicht-infektiöse krankhafte Vorgänge erhöhen über Entzündungsprozesse den Bedarf an neutrophilen Granulozyten im Körper. Der Grad der Neutrophilie entspricht, unabhängig vom Alter des Hundes, im Allgemeinen der Schwere des Entzündungsprozesses, der Grad der Linksverschiebung entspricht der Schwere der Krankheit. Meist machen Stabkernige den Hauptteil der Linksverschiebung aus. Ist der Bedarf und Verbrauch an Neutrophilen im Gewebe

jedoch deutlich höher als der Nachschub aus dem Knochenmark, treten auch jüngere, unreifere Formen wie Metamyelozyten und Myelozyten auf und weisen auf eine gesteigerte Granulopoese als Antwort auf den erhöhten Bedarf an Granulozyten hin. Leukopenie und Neutropenie an sich sind schon ein Anzeichen für einen schwerwiegenden Entzündungsprozess, doch wird die Prognose um so schlechter, je schwerer Leukopenie und Neutropenie sind und je mehr die Linksverschiebung 1000/ μ l übersteigt (JAIN, 1986).

2.5.2.2. Lymphozyten und Monozyten

Eine 6000 Leukozyten pro μ l übersteigende *Lymphozytose* tritt häufig bei jungen Hunden auf, die kurz vor der Blutentnahme Aufregung, Angst oder emotionalem Stress durch Hospitalisierung ausgesetzt waren. Eine absolute Lymphopenie bei Junghunden unter 6 Monaten kommt in der frühen Phase von viralen, bakteriellen und durch Rickettsien verursachten Erkrankungen vor, wie zum Beispiel bei durch Parvovirus 2 oder Coronavirus verursachter Enteritis, Staupe oder Salmonellose.

Eine *Monozytose* geht oft mit einer neutrophilen Leukozytose bei eitrigen Entzündungen, granulomatösen Erkrankungen oder dem Austritt von Blut in Gewebe oder Körperhöhlen einher. Außerdem kann eine Monozytose bei Stress und als Antwort auf exogene Kortikoidzufuhr auftreten (JAIN, 1986).

2.5.2.3. Eosinophile und basophile Granulozyten

Eine *Eosinophilie* (über 1300/ μ l) tritt bei Hunden unter 6 Monaten nur selten bei Parasitenbefall von Haut, Lunge und Magen-Darmtrakt auf. Dabei rufen aber nur solche Parasitosen eine Eosinophilie hervor, bei denen ein dauerhafter, intensiver Kontakt zwischen Parasiten und Körpergeweben vorliegt. Ein Befall mit Ankylostomen, *Toxocara* spp., *Toxascaris* spp. oder Flöhen werden beim adulten Hund von einer Eosinophilie begleitet. Nicht-parasitäre Ursachen für eine eosinophile Pneumonie kommen bei Hunden unter 6 Monaten praktisch nicht vor.

Eine *Eosinopenie* (unter 100/ μ l) tritt als Antwort auf exogene oder endogene Kortikosteroide auf oder kann eine systemische Krankheit begleiten.

Eine *Basophilie* tritt bei Krankheiten auf, die die IgE-Produktion stimulieren, wie bei allergischen Reaktionen vom Spättyp. Eine Basophilie wird fast immer von einer Eosinophilie begleitet, tritt also bei jungen Hunden selten auf, ausgenommen bei Hunden mit Hyperlipidämie (JAIN, 1986).

Tabelle 7
Blutwerte von gesunden, wachsenden Beaglewelpen
 (nach ANDERSON und GEE, 1958; EARL et al., 1973;
 HOSGOOD und HOSKINS, 1995)

Parameter	Alter (Tage)							
	0	7	14	21	28	42	56	84
	Durchschnitt Referenzbereich							
Hämatokrit (%)	47,5 45,0-52,5	40,5 33,0-52,0	31,8 29,0-34,0	31,7 27,0-37,0	29,9 27,0-33,5	32,5 26,5-35,5	34,8 31,0-39,0	40,9
Erythrozyten ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	5,1 4,7-5,6	4,6 3,6-5,9	3,9 3,4-4,4	3,8 3,5-4,3	4,1 3,6-4,9	4,7 4,3-5,1	4,9 4,5-5,9	6,3
Hämoglobin (g/dl)	15,2 14,0-17,0	12,9 10,4-17,5	10,0 9,0-11,0	9,7 8,6-11,6	9,5 8,5-10,3	10,2 8,5-11,3	11,2 10,3-12,5	14,3
MCV (fl)	93	89	81,5	83	73	69	72	64,6
MCH (pg)	30	28	25,5	25	23	22	22,5	
MCHC (%)	32	32	31,5	31	32	31,5	32	35,3
Retikulo- Zyten (%)	6,5 4,5-9,2	6,9 3,8-15,2	6,7 4,0-8,4	6,9 5,0-9,0	5,8 4,6-6,6	4,5 2,6-6,2	3,6 1,0-6,0	NA
Leukozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	12,0 6,8-18,4	14,1 9,0-23,0	11,7 8,1-15,1	11,2 6,7-15,1	12,9 8,5-16,4	16,3 12,6-26,7	15,0 12,7-17,3	17,1
Stabkernige ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,23 0-1,5	0,50 0-4,8	0,21 0-1,2	0,09 0-0,5	0,06 0-0,3	0,05 0-0,3	0,08 0-0,3	0,08
Segmentker- nige ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	8,6 4,4-15,8	7,4 3,8-15,2	5,2 3,2-10,4	5,1 1,4-9,4	7,2 3,7-12,8	9,0 4,2-17,6	8,5 6,2-11,8	9,8
Lymphozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1,9 0,5-4,2	4,3 1,3-9,4	3,8 1,5-7,4	5,0 2,1-10,1	4,5 1,0-8,4	5,7 2,8-16,6	5,0 3,1-6,9	5,7
Monozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,9 0,2-2,2	1,1 0,3-2,5	0,7 0,1-1,4	0,7 0,1-1,4	0,8 0,3-1,5	1,1 0,5-2,7	1,0 0,4-1,7	0,9
Eosinophile ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,4 0-1,3	0,8 0,2-2,8	0,6 0,08-1,8	0,3 0,07-0,9	0,25 0-0,7	0,5 0,1-1,9	0,4 0-1,2	0,4
Basophile ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	-	0,01 (0-0,02)	-	-	0,01 0-0,15	-	-	-

Bei allen aufgelisteten Parametern wurde kein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt (EARL et al., 1973). Nach MEIXNER (1968) unterscheidet sich der Blutstatus von mutterlos aufgezogenen Welpen verschiedener Rassen nur geringfügig von dem der mit Muttermilch ernährten Jungtiere, wobei, wie oben

erwähnt, auch die Zusammensetzung des Milchaustauschers für die Abweichungen in seinen Versuchen verantwortlich gemacht werden könnte.

2.5.3. Blutchemie

Saugwelpen verschiedener Rassen weisen einen niedrigeren Globulingehalt und einen in den ersten drei Tagen variablen Glucosegehalt auf, der sich jedoch im Laufe der ersten Woche bei 100-115 mg/dl stabilisiert. Das Gesamteiweiß ist in der Neugeborenenphase relativ konstant, wobei der Albuminspiegel dem adulter Hunde nahekommt, der Globulinspiegel jedoch niedriger ist. Beim Harnstoff war ein deutlicher Rückgang von der ersten bis zur vierten Lebenswoche zu konstatieren. Die Gesamtlipide stiegen im Verlauf der Laktation von der ersten bis zur vierten Lebenswoche (KIENZLE et al., 1985). Tab. 8 gibt die blutchemischen Werte gesunder, natürlich aufgezogener Welpen an.

CHANDLER et al. (1993) untersuchte die Blutchemie und –lipidzusammensetzung neonataler Beaglewelpen, die fünf Wochen lang mit selbst hergestellten Milchaustauschern gefüttert wurden. Dazu wurde eine Kontrollgruppe bei der Mutter belassen und zwei Versuchsgruppen mit selbst hergestelltem Milchaustauscher auf Kuhmilch-Eigelb-Basis, wovon einer mit Calcium und Phosphor supplementiert war, gefüttert. Obwohl diese Milchaustauscher oft für Hundewelpen empfohlen werden, unterscheiden sie sich nicht unerheblich von der Muttermilch, denn sie weisen weniger Protein, Energie, Calcium und Phosphor auf. Außerdem ist der Cholesterolgehalt im Vergleich zur Muttermilch erhöht. Die Blutuntersuchungen ergaben niedrigere Gehalte an Blutharnstoff, Albumin und CO_2 und höhere Gehalte an Phosphor, Globulinen, Natrium, Chlorid und Cholesterol bei den mit Milchersatz aufgezogenen Welpen. In der Triglycerid- und HDL_2 –Konzentration gab es keinen Unterschied, jedoch waren die HDL_1 - und LDL - Cholesterolfractionen bei den künstlich aufgezogenen Welpen höher und für den Anstieg des Gesamtcholesterols verantwortlich. Keine Unterschiede wurden zwischen den drei Gruppen bei den Parametern Glucose, Creatinin, gesamtes Serumcalcium, Gesamtproteingehalt, Gesamtbilirubin, alkaliner Phosphatase, Alaninaminotransferase, Anionenlücke und pH-Wert festgestellt. Bei Blutharnstoff, Albumin, Albumin-Globulin-Verhältnis und

Tabelle 8
Blutchemie von wachsenden, gesunden Welpen
(nach CHANDLER, 1992)

	Alter in Wochen				
	0,5-1 (n*=10)	3 (n=12)	5 (n=18)	8-12 (n=10)	12-24 (n=200)
	Durchschnitte Referenzbereiche				
Glucose (mg/dl)	123 (104-132)	126 (109-140)	131 (110-146)	114 (88-131)	111 (85-133)
Harnstoff (mg/dl)	30 (22-37)	23 (15-23)	15 (10-21)	24 (21-30)	13 (7-19)
Kreatinin (mg/dl)	0,5 (0,4-0,6)	0,4 (0,3-0,5)	0,4 (0,3-0,5)	0,5 (0,5-0,6)	0,6 (0,3-0,9)
Gesamtprotein (g/dl)	4,2 (3,8-4,7)	4,1 (3,6-4,6)	4,7 (0,3-0,5)	4,6 (3,9-5,0)	5,1 (4,6-5,8)
Albumin (g/dl)	2,6 (2,3-2,9)	2,7 (0,2-0,5)	3,3 (2,4-4,3)	2,9 (2,0-3,3)	2,8 (2,4-3,1)
Gesamtbilirubin (mg/dl)	1,0 (0,5-1,8)	0,4 (0,2-0,5)	0,5 (0,2-0,7)	0,2 (0,1-0,5)	0,4 (0,2-0,9)
Alkaline Phosphatase (IU/l)	706 (371-1297)	378 (249-512)	355 (150-539)	569 (411-705)	117 (77-199)
Alaninaminotrans- ferase (IU/l)	45 (25-82)	18 (10-24)	24 (6-61)	38 (26-56)	19 (9-30)
Calcium (mg/dl)	12,4 (8,7-11,8)	11,4 (10,7-12,3)	11,1 (10,3-12,6)	11,5 (10,5-12,1)	11,0 (9,8-12,4)
Phosphor (mg/dl)	10,4 (8,7-11,8)	9,1 (7,8-10,1)	8,8 (7,0-9,8)	10,5 (10,1-11,3)	9,0 (7,2-10,1)
Natrium (mEq/l)	144 (143-145)	144 (142-148)	142 (138-145)	149 (146-153)	152 (138-160)
Kalium (mEq/l)	5,6 (5,1-6,5)	4,8 (4,2-5,5)	5,7 (4,0-6,8)	5,5 (5,2-6,6)	5,3 (4,3-6,2)
Chlorid (mEq/l)	102 (99-105)	105 (102-108)	108 (102-117)	106 (104-109)	105 (103-114)

*n=Anzahl der ausgewerteten Tiere

Gesamt-CO₂ wurde kein Unterschied innerhalb der Versuchsgruppen festgestellt, jedoch lagen die Werte beider Versuchsgruppen deutlich niedriger als die der Kontrollgruppe, Phosphor, Globulin, Natrium und Chlorid dagegen waren höher als bei der Kontrollgruppe. Der Kaliumgehalt der ohne Supplementierung gefütterten Gruppe lag höher als bei der Kontrollgruppe. Die Autoren kamen zu der Schlussfolgerung, dass die längerfristige Fütterung selbst hergestellter Milchaustauscher mit von der Muttermilch differierender Zusammensetzung neben dem Stress bei der mutterlosen Aufzucht mitverantwortlich für die veränderten Blutparameter ist. Ob diese Veränderungen langfristig Konsequenzen haben, ist noch unbekannt, deshalb empfehlen die Autoren die Verwendung kommerziell hergestellter Milchaustauscher, deren Zusammensetzung ihrer Meinung nach der

Muttermilch eher entspricht. Da die von CHANDLER et al. (1993) verwendeten Milchaustauscher offensichtlich nicht genügend Protein und Energie aufwiesen, kann die Zusammensetzung der Milchaustauscher durch Hinzufügen von Magerquark als Energieträger sowie Öl als Energielieferant optimiert werden (KIENZLE, 1999). Neben den Mineralstoffen Calcium und Phosphor sind bei längerfristigem Einsatz auch die anderen Mineralstoffe und Vitamine beizumischen. Es ist also durchaus möglich, ausgewogene Milchaustauscher selbst herzustellen. Zu untersuchen bleibt, ob die blutchemischen Werte sich denen natürlich aufgezogener Welpen beim Einsatz eines solchen ausgewogenen Milchaustauschers mehr angleichen.

2.6. Immunität beim Fetus und Neugeborenen

2.6.1. Problematik der Immunität neonataler Tiere

Tiere mit kurzer Trächtigkeit haben noch kein vollentwickeltes Immunsystem. Tiere mit längerer Trächtigkeit haben zwar ein gut entwickeltes, aber noch nicht voll funktionsfähiges Immunsystem. Sie sind auf die Hilfe des mütterlichen Immunsystems angewiesen und bekommen auf diese Weise sowohl passive systemische als auch passive lokale Immunität. Ohne einen ausreichenden Spiegel an mütterlichen Antikörpern würde ein lebensgefährlicher Zustand vorliegen. Für das Erlangen der vollen Funktion des eigenen Immunsystems wird eine Stimulation durch Antigene benötigt (TIZARD, 2000). Welpen unter drei Wochen können zwar auf manche Antigene mit Antikörperbildung reagieren, jedoch ist die Antwort geringer als die von adulten Tieren (BANKS, 1982).

2.6.2. Entwicklung des Immunsystems

Die Entwicklung des Immunsystems läuft nach einem konstanten Muster ab. Der Thymus entwickelt sich zuerst, dann folgen die sekundären Lymphorgane. B-Zellen folgen der Entwicklung von Milz und Lymphknoten. Antikörper werden, wenn überhaupt, erst spät im Fetalleben gebildet. Nachdem die Lymphorgane voll entwickelt sind, steigt die Fähigkeit Antikörper zu bilden rapide an. Nicht alle

Antigene können aber die Antikörperbildung gleich effektiv stimulieren – die Antikörperbildungsfähigkeit nimmt parallel zur Zunahme der somatischen Mutationen allmählich zu. Die zelluläre Immunität entwickelt sich gleichzeitig.

2.6.3. Immuntransfer von der Mutter zum Nachwuchs

Der Immunschutz kommt bei den verschiedenen Tieren auf unterschiedliche Weise zustande. Bei der menschlichen Placenta, einer Placenta hämochorialis, hat der Trophoblast direkten Kontakt mit dem mütterlichen Blut. Nur Immunglobulin G kann die Placenta passieren und so in den fetalen Kreislauf gelangen. Deshalb entspricht der Immunglobulin-G-Spiegel des menschlichen Babys dem der Mutter (TIZARD, 2000). Bei Nagern und Igel gelangt der Hauptteil der Antikörper über die Placenta hämoendothelialis ins Blutsystem des Fetus. Nager und Igel können deshalb auch ohne Kolostrum erfolgreich aufgezogen werden (KIENZLE und LANDES, 1995). Bei der Placenta von Hund und Katze, einer Placenta endotheliochorialis, kontaktiert das Chorionepithel das Endothel der mütterlichen Kapillaren. Auf diesem Weg kommt der Welpen zu 5-10% seines Gesamt-IgG-Spiegels, der Hauptteil wird aber über das Kolostrum aufgenommen. Die Absorption findet in zwei Schritten statt. Zuerst werden die Makromoleküle mittels Pinozytose in die Epithelzellen aufgenommen und dann ins Blut weitertransportiert (TIZARD, 2000). Die Darmschranke bleibt ca. 24 Stunden nach der Geburt für die Immunglobulinpassage geöffnet, der maximale Übergang findet nach acht Stunden statt. Der genaue Mechanismus der Darmschranke ist noch nicht geklärt, jedoch wird der Schluss durch höheren Proteingehalt in der Nahrung beschleunigt. Interessanterweise findet bei gleichem Proteingehalt der Schluss der Darmschranke bei mutterlos aufgezogenen Welpen eher statt als bei saugenden Welpen, was nahelegt, dass andere Faktoren im Kolostrum mitverantwortlich sein könnten (POFFENBARGER et al., 1991).

Bei der Placenta der Wiederkäuer, einer Placenta syndesmochorialis, steht Uterusgewebe mit dem Chorionepithel in Kontakt. Bei den Placenten von Pferd und Schwein, einer Placenta epitheliochorialis, trifft das Chorionepithel auf intaktes Uterusepithel. Dabei ist kein transplacentarer Übergang von Immunglobulinen möglich. Umso wichtiger ist hier die Kolostrumaufnahme.

2.6.4. Sekretion und Zusammensetzung von Kolostrum

Unter dem Begriff Kolostrum versteht man das über die letzten Wochen der Trächtigkeit akkumulierte Sekret der Milchdrüse und die aus dem Blut durch aktiven Transport in die Milchdrüse gelangenden Proteine. Dieser Transport wird durch die Hormone Östrogen und Progesteron gesteuert. Kolostralmilch enthält viele Immunglobuline, insbesondere die Immunglobuline G (65-90% aller Antikörper) und A, aber auch M und E, wie Tab. 9 zeigt.

Tabelle 9
Immunglobulinspiegel im Kolostrum und in der Milch der Hündin
 (nach BUSCHMANN, 1990)

	IgA	IgM	IgG
Referenzwerte in mg/100ml			
Kolostrum	500-2200	14-57	120-300
Milch	110-620	10-54	1-3

Hundekolostrum enthält am ersten Tag noch mehr IgG als IgA, jedoch ändert sich dieses Verhältnis vom ersten Tag an sehr schnell. Kolostrum hemmt die neonatale Immunität, indem durch das Vorhandensein von mütterlichen Immunglobulinen das Einsetzen der Antikörperbildung der Zellen des Neugeborenen verzögert wird. Damit es zum Einsetzen der eigenen Antikörperbildung kommt, muss der Spiegel der mütterlichen Immunglobuline auf ein kritisches Niveau gesenkt werden. Wann dieser Zustand eintritt, hängt von der Menge und der Klasse der Immunglobuline ab, die unterschiedliche Halbwertszeiten haben. BANKS (1982) gibt für IgG eine Halbwertszeit von 6 Tagen und einen Verbrauch von 97 % nach 30 Tagen (entspricht der fünffachen Halbwertszeit) an. Die Halbwertszeiten von IgA und IgM schätzt er auf 2 bzw. 4 Tage.

2.6.5. Absorption der Antikörper durch die Darmschleimhaut

Beim Kalb werden Antikörper aufgrund der geringen Proteinverdauungskapazität und dem Vorhandensein von Trypsininhibitoren in der Milch nicht verdaut. Sie binden sich

im Darm an spezielle Fc-Rezeptoren der Epithelzellen (FcRn), die vermutlich bei allen Säugetieren vorkommen. Die Antikörper werden anschließend von den Epithelzellen durch Pinozytose aufgenommen, an die Kapillaren weitergegeben und gelangen so in den systemischen Blutkreislauf. Allerdings besteht die Möglichkeit zur Darmpassage nur eine beschränkte Zeit lang. So werden die Antikörper in den ersten 6 Stunden optimal aufgenommen, aber schon nach 24 Stunden praktisch überhaupt nicht mehr. Erstaunlicherweise fördert die Anwesenheit der Mutter die Aufnahme. Der höchste Antikörperspiegel findet sich nach 12-24 Stunden, dann beginnt der physiologische Abbau. Je nach Anfangskonzentration dauert es länger oder kürzer bis zur Ineffektivität. Ohne Kolostrumaufnahme stehen den Welpen nur sehr wenige Antikörper zur Verfügung.

Die im Anschluss an das Kolostrum sezernierte Milch enthält bei Hunden nur noch Immunglobulin A, bei Rindern zusätzlich noch IgG. Sekretorisches IgA hält sich länger im Darm, wenn andere Immunglobuline schon verdaut werden und stellt somit den wirksamsten Faktor gegen Darminfektionen dar.

Probleme in der Absorption können zu Septikämie und Darminfektionen führen. Septikämien können entstehen, wenn nicht genügend Antikörper in den Blutkreislauf gelangt sind, also vor allem durch Probleme in der Kolostrumaufnahme und –absorption während des ersten Tages. Darminfektionen hingegen können entstehen, wenn keine konstante Aufnahme auch über den ersten Tag hinaus stattfindet.

Die drei Hauptgründe für einen ungenügenden Immunschutz stellen wenig oder schlechtes Kolostrum (production failure), eine zu geringe Aufnahme (ingestion failure) oder ungenügende Absorption trotz genügender Aufnahme (absorption failure) dar (TIZARD, 2000).

Ursachen für eine ungenügende oder schlechte Kolostrumproduktion können Frühgeburten oder zu frühes Einsetzen der Laktation sein. Eine zu geringe Aufnahme kann ihre Ursache in schlechter Brutfürsorge der Mutter, in Schwäche oder im mangelhaften Saugtrieb der Welpen oder in körperlichen Problemen wie Zitzenverletzungen oder Kieferdeformationen haben. Absorptionsprobleme treten beim Hund eher selten auf.

Welpen sollten innerhalb der ersten 12-24 Stunden Kolostrum aufgenommen haben, um maximalen Transfer von Immunglobulinen zu gewährleisten und Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. So enthält das Kolostrum einen hohen Gehalt an Vitamin A, wodurch der Vitamin-A-Gehalt in der Welpenleber ansteigt, wie MEYER et al. (1985) in Untersuchungen über die Körperzusammensetzung von Welpen festgestellt haben. HEIRD et al. (1984) untersuchten das Wachstum der Darmmucosa bei Beaglewelpen. Die Welpen, die in den ersten 24 Stunden ausschließlich künstlich ernährt wurden, wiesen überhaupt kein Mucosawachstum auf. Im Gegensatz dazu konnte bei den von der Mutter gesäugten Welpen über die Mucosamasse und den Protein- und DNA-Gehalt ein deutliches Wachstum festgestellt werden. Diese starke Veränderung der Mucosa ist eine Anpassung des Darmtraktes daran, ab dem Zeitpunkt der Geburt die Ernährung des Neugeborenen zu übernehmen und trat nur bei Welpen auf, die bei der Mutter Kolostrum aufnehmen konnten.

Einem Welpen, der noch kein Kolostrum aufgenommen hat, wird am besten Kolostralmilch des Muttertieres oder eines anderen Tieres (das Kolostrum kann auch eingefroren sein) aus derselben Umgebung verabreicht, um das Jungtier gegen alle Antigene der jeweiligen Umgebung zu schützen. Kolostrum von Tieren aus einer anderen Umgebung oder gar von anderen Tierarten verspricht nicht genügend Schutz und kann nicht empfohlen werden. Ist kein Kolostrum eines Tieres aus derselben Umgebung verfügbar, muss Plasma eines solchen Tieres gewonnen und dem Jungtier verabreicht werden. Jedoch haben POFFENBARGER et al. (1991) festgestellt, dass weder die orale noch die subcutane Verabreichung von Serum adulter Tiere an Welpen den Schutz geben kann, der durch Aufnahme von Kolostrum gegeben ist, obwohl die gleiche Menge an Gammaglobulinen verabreicht worden war, die ein Welpen durchschnittlich über das Kolostrum aufnimmt. Nur bei den mit Kolostrum ernährten Tieren konnte ein IgA-Gehalt im Blut gemessen werden. Der IgG-Spiegel stieg bei den Tieren, die nach der Geburt Plasma entweder oral oder subcutan verabreicht bekamen, innerhalb der ersten 35 Lebenstage kontinuierlich an, mit einem deutlicheren Anstieg in den ersten beiden Tagen. Ein signifikant größerer Anstieg konnte im Blut der kolostrumernährten Welpen an den ersten beiden Tagen gemessen werden. Die Welpen, die Serum subcutan verabreicht bekamen, hatten dafür einen signifikant höheren IgM-Spiegel. Es bleibt noch zu

untersuchen, ob größere Erfolge mit einer höheren Dosierung erreicht werden können. In einer ähnlichen Untersuchung von BOUCHARD et al. (1992) wurde mit der subcutanen Verabreichung von 16 ml Serum zum Zeitpunkt der Geburt der grösste Effekt erzielt. Durch subcutane Applikation von je 8 ml bei der Geburt und 12 Stunden später sowie durch die orale Verabreichung wurde nur ein geringerer IgG-Spiegel erreicht.

2.6.6. Immunologische Besonderheiten bei mutterlos aufgezogenen Welpen

Nach MEIXNER (1968) zeigen die Serumeiweißbefunde bei Muttermilchernährung einen steilen Anstieg der Gammaglobuline bis zum 4. Lebenstag und einen langsamen Abfall danach. Mutterlos aufgezogene Welpen erreichen trotz allmählichem Anstieg der Gammaglobuline innerhalb der ersten und Anfang der zweiten Lebenswoche diesen Spiegel nicht, sind also passiv schlechter geschützt. Andererseits kommt es bei diesen Welpen anscheinend zu einer Aktivierung der Abwehrmechanismen, die sich in einer Erhöhung der Zahl der weißen Blutkörperchen, vor allem der Lymphozyten äussert.

2.6.7. Impfungen bei Welpen

Impfungen bei Welpen sind mit Schwierigkeiten verbunden. Dies spielt vor allem für die Wahl des Zeitpunkts der Impfung eine Rolle. TIZARD (2000) gibt einige Anhaltspunkte zur Immunisierung. So hängt die Wahl des Impftermins von der Halbwertszeit und der Ausgangsmenge der maternalen Antikörper ab. Beispielsweise beträgt die Halbwertszeit von Antikörpern gegen Staupe und Hepatitis contagiosa canis 9,5 Tage. Bei normal erfolgter Kolostrumaufnahme liegt der früheste Impftermin in der 6. bis 9. Lebenswoche und die Wiederholungsimpfungen in der 9.-12. und 13.-16. Woche. Nur sehr gefährdete Welpen sollten früher geimpft werden. Ab der 10. Lebenswoche sind auf jeden Fall alle Welpen impfbereit, nur wäre eine grundsätzlich bei allen Welpen erst in der 10. Woche stattfindende Erstimmunisierung zu riskant, da viele Welpen den Impfschutz schon früher benötigen und so eine Zeitlang ungeschützt sind. Der beste Schutz wäre eine kontinuierliche Impfung in kurzen

Intervallen (ca. alle 3 Wochen) bis zur 12. Woche. Auch modifizierte Lebendvakzinen führen zu einer besseren Immunität, da sie die Wirtszelle infizieren und trotz maternalen Antikörper eine Immunität auslösen. Über Impfungen bei mutterlos aufgezogenen Welpen liegen in der Literatur keine Daten vor.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Versuchsplan

3.1.1. Versuchsdauer

Die Versuchsdauer betrug bei beiden Versuchen 14 Wochen. Nach Versuchsende wurden die Welpen des Lactoferrinversuchs (OWF-Versuch, s.u.) an Privatbesitzer vermittelt, die des Enterococcus faecium- Versuchs (GSF-Versuch, s.u.) in der Versuchstierhaltung des GSF Forschungszentrums belassen.

3.1.2. Versuchsgruppen

Um die Aufnahme von Kolostrum zu gewährleisten, verblieben die neugeborenen Welpen die ersten 3 Lebenstage (Tag 0, 1 und 2) bei dem Muttertier. 0-2 Welpen wurden auch weiterhin zur Mastitisprophylaxe bei der Mutter belassen, die genaue Anzahl wurde von den Leitern der Institutionen bestimmt, an denen die Hunde gezüchtet wurden (s.u.). Die anderen Welpen wurden am Tag 3 von den Muttertieren getrennt und randomisiert nach Gewicht und Geschlecht in fünf (Lactoferrinversuch) bzw. zwei (Ec. faecium-Versuch) Versuchsgruppen aufgeteilt (Tab. 10).

Tabelle 10
Versuchsgruppen

	Lactoferrinversuch		Ec.faecium-Versuch	
	Lactoferrindosis in der TS (ppm)		Gesamtkonzentration in KbE/ 100g Futter-TS	
	MAT	Beifutter		
Gruppe 1	0	0		
Gruppe 2	30	30		
Gruppe 3	60	95		
Gruppe 4	60	60		
Gruppe 5	120	120		
Gruppe 6			0	
Gruppe 7				1×10^8

Ab Tag 3 erfolgte die Aufzucht mutterlos, es wurde selbst hergestellter Milchersatz gefüttert. Ab der 4. Woche wurde Trockenfutter für Hundewelpen zugefüttert. In der 8. Woche wurde die Fütterung von Milchersatz eingestellt, so dass nur noch festes Welpenfutter gefüttert wurde.

3.1.3. Untersuchte Parameter

3.1.3.1. Allgemeine und spezielle Untersuchung

Anfangs wurde täglich das Allgemeinbefinden, Habitus, Ernährungszustand, Puls, Temperatur, Atmung, Schleimhäute, Lymphknoten, Haut und Fell, Respirations-, Zirkulationsapparat und Verdauungstrakt untersucht und Futteraufnahme und Gewichtszunahme festgestellt. Aus Zeitgründen war dies während der parallelen Aufzucht von mehreren Würfen nicht mehr möglich, die Untersuchung wurde dann auf das Allgemeinbefinden, die Futteraufnahme und die Gewichtszunahme beschränkt.

3.1.3.2. Untersuchungen im Blut

Zu den Zeitpunkten Tag 3, Tag 7, Woche 2, 4, 8, 10, 12 und 14 (Abb. 2) wurde Blut nach der unter 3.2.7. beschriebenen Methode entnommen. Es wurden jeweils 2 Proben für die immunologische Untersuchung und 2 Proben für die Bestimmung des antioxidativen Status vorbereitet und bei -80°C bis zur Bestimmung tiefgefroren. Ab Woche 4 wurde zusätzlich ein Blutbild erstellt.

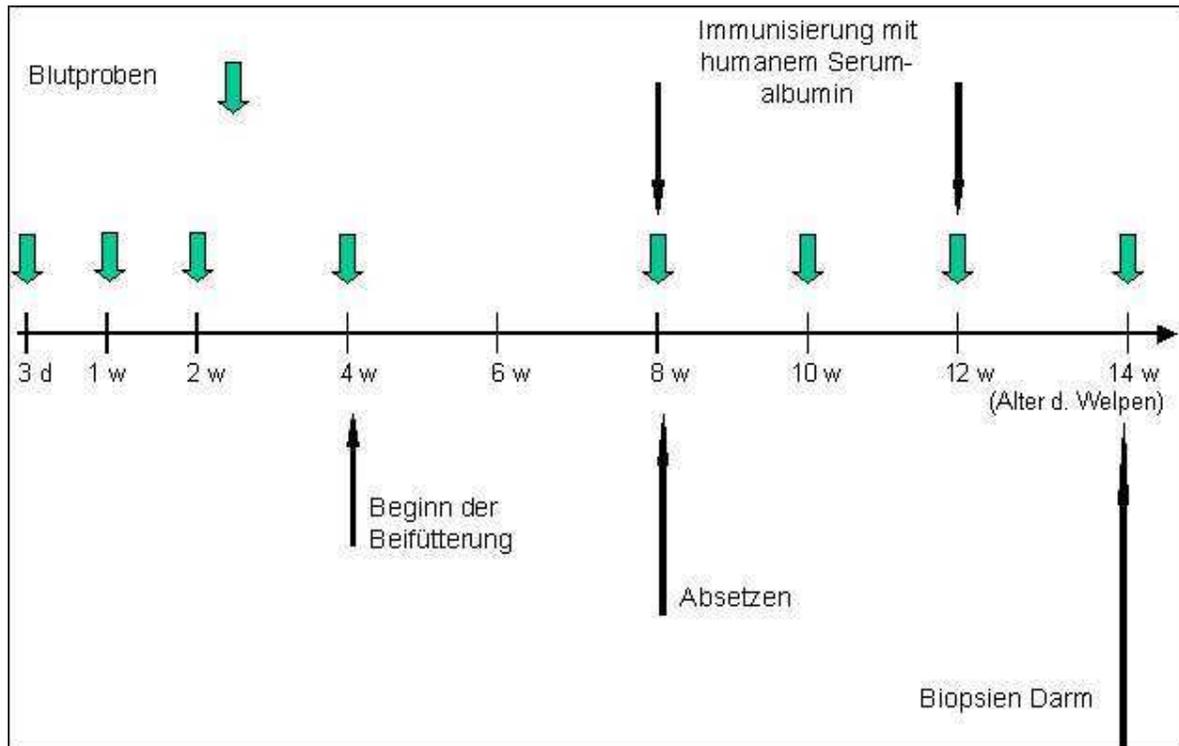


Abb. 2: Übersicht über den Versuchsaufbau

3.1.3.3. Immunologische Untersuchungen

3.1.3.3.1. IgG/IgA-Bestimmung

Zu allen Blutentnahmezeitpunkten wurden IgG- und IgA-Titer mittels Sandwich-ELISA bestimmt.

3.1.3.3.2. Nachweis der spezifischen IgG- Immunantwort

Für die Bestimmung einer spezifischen IgG-Immunantwort wurden die Tiere in der 8. und 12. Woche mit humanem Serumalbumin immunisiert. Diese Zeitpunkte entsprechen dem normalen Impfprogramm. Die Antikörperkonzentration gegen humanes Serumalbumin wurde in den Blutproben der Wochen 10, 12 und 14 mittels direktem ELISA bestimmt.

3.1.3.4. Bestimmung des Antioxidativen Status

Der Antioxidative Status der Tiere wurde an den Proben der acht Blutentnahmezeitpunkte bestimmt. Hierzu wurden die Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), die antioxidativ wirksamen Vitamine E und C, die Metaboliten Harnsäure und Bilirubin sowie freies Eisen, Lactat und die Enzyme CK und GOT in verdünnten Plasmaproben (PBS 1:10) bestimmt. Die Bestimmung des Antioxidativen Status erfolgt im Rahmen der Dissertation von Julia Schwarzer (München, 2003) und soll hier nicht näher beschrieben werden.

3.1.3.5. Blutbild

Ab der vierten Woche konnte zu den weiteren Blutentnahmezeitpunkten eine ausreichende Menge Blut für die Erstellung eines weißen und roten Blutbildes gewonnen werden. Es wurden Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten, Hämatokrit und Hämoglobin bestimmt.

3.1.3.6. Untersuchungen im Kot

3.1.3.6.1. pH, Ammoniak und Lactat

Zu den Zeitpunkten Tag 3, Woche 4, Woche 8 und Woche 14 wurden Kotproben zur Bestimmung von pH, Ammoniak und Lactat genommen. Der pH wurde sofort bestimmt, die Proben für Ammoniak und Lactat vorbereitet und bis zur Bestimmung bei -20°C eingefroren.

3.1.3.6.2. Trockensubstanz

Weitere Kotproben wurden zur Bestimmung der Trockensubstanz einmal pro Woche gruppenweise gesammelt.

3.1.3.7. Untersuchungen der Darmwand

In Woche 14 wurden Darmgewebsproben mittels endoskopischer Biopsie aus dem Darm gewonnen. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -200°C gelagert und im folgenden histologisch und immunhistologisch untersucht.

3.1.4. Versuchsgenehmigung

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

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Zuchtmanagement

3.2.1.1. Mutterhündinnen

Für den Lactoferrinversuch wurden vor allem eigene Beagle-Hündinnen des Instituts für Tierernährung der LMU München verwendet, aber auch Hündinnen bzw. Welpen zugekauft (Gynäkologische Tierklinik, LMU München und GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg). Für den Ec.faecium-Versuch wurden ausschließlich Hündinnen des GSF Forschungszentrum verwendet.

3.2.1.2. Vaterrüden

Für den Lactoferrinversuch wurden Rüden aus der Andrologie (Gynäkologische Tierklinik, LMU München) und dem GSF Forschungszentrum für Umwelt und

Gesundheit GmbH, Neuherberg, zum Natursprung verwendet. Für den Ec.faecium-Versuch wurden ausschließlich Vaterrüden des GSF Forschungszentrum verwendet.

3.2.1.3. Züchtung

Die ersten Mutterhündinnen wurden während der Läufigkeit im Frühling 2002 belegt. Weitere Hündinnen wurden außerhalb der Saison belegt, indem die Läufigkeit mit einem Prolaktinhemmer eingeleitet wurde. Dazu bekamen die Hündinnen einmal täglich 5µg Cabergolin /kg Körpergewicht (Galastop®, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf) oral verabreicht.

3.2.1.4. Welpen

Die Welpen wurden nach Wurf und Gruppe getrennt und aus Tierschutzgründen mindestens zu zweit gehalten. Die räumliche Trennung der verschiedenen Gruppen war erforderlich um einerseits sicher zu gehen, dass die probiotische Substanz weder über Futter noch über Kot oder Umgebung zu einer anders dosierten Gruppe gelangte, andererseits um die gegenseitige Beeinflussung der Mikroflora zu verhindern. Aus letzterem Grund wurden die älteren auch von den jüngeren Welpen getrennt, auch wenn sie derselben Gruppe angehörten.

Für den Lactoferrinversuch wurden 23 Welpen aus fünf Würfen verwendet. Die Würfe bestanden aus sechs, fünf, acht, drei und fünf Welpen, wobei von den ersten vier Würfen jeweils ein Welpen bei der Mutter blieb. Ein weiterer Wurf (7 Welpen, Geburt 4.12.02) fiel aus technischen Gründen nach vier Wochen aus, die Werte wurden nur teilweise in den Ergebnissen verwendet. Zwei Hündinnen waren gedeckt, aber nicht trächtig geworden und ein Wurf konnte nicht in den Versuch eingehen, weil er aus einem einzigen Welpen bestand.

An Tag 3 wurden die Welpen, wie Tab. 11 zeigt, nach Gewicht und Geschlecht randomisiert. Das durchschnittliche Tag-3-Gewicht von Gruppe 1 lag bei 378,5 g, das

von Gruppe 2 bei 427,6 g, von Gruppe 3 bei 407,0 g, von Gruppe 4 bei 474,1 g und von Gruppe 5 bei 381,2 g.

Tabelle 11
Einteilung der Welpen in die Versuchsgruppen des Lactoferrinversuchs

Hund	Geschlecht	Gruppe*	Geburt (Wurf)	Tag-3-Gewicht
1	männlich	1	8.5.02 (1)	417
2	männlich	1	8.5.02 (1)	366
3	weiblich	1	8.5.02 (1)	389
4	männlich	5	8.5.02 (1)	454
5	weiblich	5	8.5.02 (1)	371
6	männlich	1	1.6.02 (2)	382
7	weiblich	1	1.6.02 (2)	336
8	männlich	5	1.6.02 (2)	364
9	weiblich	5	1.6.02 (2)	388
10	männlich	2	15.6.02 (3)	431
11	weiblich	2	15.6.02 (3)	410
12	weiblich	2	15.6.02 (3)	387
13	männlich	3	15.6.02 (3)	393
14	weiblich	3	15.6.02 (3)	426
15	weiblich	3	15.6.02 (3)	353
16	weiblich	3	15.6.02 (3)	456
17	männlich	4	1.11.02 (4)	529
18	weiblich	4	1.11.02 (4)	526
19	männlich	2	6.11.02 (5)	473
20	weiblich	2	6.11.02 (5)	437
21	weiblich	4	6.11.02 (5)	575
22	weiblich	4	6.11.02 (5)	513
23	weiblich	4	6.11.02 (5)	524
24	männlich	1	4.12.02 (6)	376
25	männlich	1	4.12.02 (6)	358
26	weiblich	1	4.12.02 (6)	404
27	männlich	4	4.12.02 (6)	314
28	männlich	4	4.12.02 (6)	338
29	männlich	5	4.12.02 (6)	367
30	weiblich	5	4.12.02 (6)	343

° Aus technischen Gründen konnte Wurf 4 erst an Tag 4 in den Versuch eingehen.

*Gruppe 1: 0 ppm Lactoferrin, Gruppe 2: 30 ppm Lactoferrin, Gruppe 3: 60/95 ppm Lactoferrin, Gruppe 4: 60 ppm Lactoferrin, Gruppe 5: 120 ppm Lactoferrin (s.o.)

Der *Ec.faecium*-Versuch wurde an insgesamt 12 Hundewelpen aus 4 Würfen durchgeführt. Davon gehörten 6 der Kontrollgruppe (im folgenden Gruppe 6) und 6 der Versuchsgruppe (Probiotikum, im folgenden Gruppe 7) an. Die Einteilung war ebenfalls nach Gewicht und Geschlecht erfolgt, in beiden Gruppen waren jeweils drei männliche und drei weibliche Welpen. Das durchschnittliche Tag-3-Gewicht der Kontrollgruppe lag bei 550,2 g, das der Probiotikumsgruppe bei 516,8 g. Die Einteilung der Welpen ist in Tab. 12 aufgeführt.

Tabelle 12
Einteilung der Welpen in die Versuchsgruppen des Ec.faecium –Versuchs

Hund	Geschlecht	Gruppe*	Geburt (Wurf)	Tag-3-Gewicht
1	weiblich	6	12.04.02 (7)	594
2	weiblich	6	12.04.02 (7)	626
3	männlich	6	29.04.02 (8)	544
4	männlich	6	29.04.02 (8)	538
5	männlich	7	29.04.02 (8)	503
6	männlich	7	29.04.02 (8)	545
7	weiblich	7	01.07.02 (9)	526
8	weiblich	7	01.07.02 (9)	525
9	männlich	6	03.09.02 (10)	528
10	weiblich	6	03.09.02 (10)	471
11	männlich	7	03.09.02 (10)	526
12	weiblich	7	03.09.02 (10)	476

*Gruppe 6: Kontrolle, Gruppe 7: Probiotikum (s.o.)

3.2.2. Fütterung

3.2.2.1. Herstellung des Milchaustauschers

- 50 g Eigelb (Hofmarkt Freiland Eier, Ländli-Eier aus Freilandhaltung, Waldenburg)
- 30 g Öl (Bonita reines Sonnenblumenöl, Penny-Markt GmbH, Köln)
- 5 g Mineralstoffmischung (Tab. 13a,b)
- 200 g Magerquark (Kleefeld Speisequark, Magerstufe, Penny-Markt, Köln)
- 215g Milch (Kleefeld H-fettarme Milch, ultrahoherhitzt, homogenisiert, 1.5% Fett, Penny-Markt, Köln)

Alle Zutaten wurden in einem Mixer („WARING commercial blender“, Bender&Hobein, Zürich) gemixt und der fertige Milchaustauscher im Kühlschrank aufbewahrt. Der Milchaustauscher wurde jeden Tag frisch hergestellt, die Saugflasche (Karlle®Saugflaschen-Set, 150ml, D-Haaren) wurde jeweils nur einmal aufgewärmt und dann ausgespült.

Tabelle 13a
Zusammensetzung der Mineralstoffmischung

<u>Mineralstoff-zusätze</u>	Menge in g		<u>Vitaminzusätze</u>	Menge in g
CaCO ₃	34,0		Vit. A (5x10 ⁵ IE/g)	0,060
Viehsalz	16,2		Vit. B2 (80%)	0,0650
K-Citrat	11,8		Vit. B6 (99%)	0,0850
Mono-Ca(H ₂ PO ₄) ₂ +H ₂ O	9,0		Biotin (2%)	0,0250
Mg-Oxid	0,5		Nikotins. (100%)	0,1000
Fe-II-fumarat	0,61		Ca-Panthothenat	0,0050
KJ	0,015			
Cu-acetat	0,115			
MnSO ₄ +H ₂ O	0,0065			
Zn-acetat	0,1925			
SUMME	71,8925		SUMME	0,34
GESAMTSUMME 72,2325 g; für 100 g Mineralstoffmischung wurde mit Stärke auf 100 g aufgefüllt				

Tabelle 13b
Mineralstoff- und Vitamingehalte der Mineralstoffmischung pro 100 g

Gehalt an			Gehalt an	
Ca	15,0 g		Vit. A	30.000 IE
P	2,0 g		Vit. D3	0 IE
Na	6,2 g		Vit. E	0 mg
Mg	0,3 g		Vit. B1	0 mg
K	4,5 g		Vit. B2	52,0 mg
Fe	20,13 mg		Vit. B6	69,7 mg
J	11,4 mg		Vit. B12	0 µg
Co	0,00 mg		Biotin	500 µg
Cu	40,25 mg		Nikotinsäure	100,0 mg
Mn	2,11 mg		Cholin	0 mg
Mo	0,00 mg		Folsäure	0 µg
Se	0,00 mg		Panthothensäure	5 mg
Zn	70,2 mg		Vit. C	0 mg
Cl	9.720,0 mg		Carotin	0 mg

In beiden Versuchen wurden die probiotischen Substanzen in die Mineralstoffmischung und somit auch in den Milchaustauscher eingemischt.

3.2.2.2. Fütterungstechnik

Der nach obigem Rezept hergestellte Milchaustauscher wurde 10-15 Minuten in der Saugflasche mittels Babyflaschenwärmer („Petra electric“-Babykostwärmer, Typ BF1 LZ 025 106, 230V, 100W, Deutschland) auf ungefähr 37°C erwärmt.

Bei gesunden, kräftigen Saugwelpen genügte es, den Nuckel ins Welpenmaul zu stecken und den Kopf des Welpens mit der Flasche in der Hand zu fixieren. Bei lustlosen, saugschwachen Welpen wurde ein Tropfen Milchaustauscher auf die Zunge der Welpen gepresst. Wenn die Welpen nicht von sich aus abschluckten, halfen meistens Bewegungen mit der Flasche im Welpenmaul und eine leichte Massage des Kehlkopfes von aussen. Drei an Durchfall erkrankte Welpen (die somit aus dem Versuch ausgeschieden waren) waren zu schwach um abzuschlucken. Ihnen wurde eine Nasenschlundsonde (B/Braun Ernährungssonde, 50cm, 1x1.5mm, B/Braun-AG, D-Meisungen) geschoben und mit Klebeband um das Maul und den Kopf fixiert. Durch die Sonde wurde alle 30 Minuten 20 ml Milchaustauscher und 20 ml Elektrolytlösung (Elotrans®Pulver, Elektrolyt-Glucose-Mischung bei Durchfallerkrankungen, NIDDApharm, Bad Vilbel) verabreicht.

3.2.2.3. Fütterungsfrequenz

Nach der Trennung von der Mutter am dritten Lebenstag wurde Milchaustauscher gefüttert. Dies erfolgte in der ersten Woche tags alle drei Stunden, nachts alle vier Stunden (0 Uhr, 4 Uhr, 8 Uhr, 11 Uhr, 14 Uhr, 17 Uhr, 21 Uhr), in der zweiten Woche tags alle vier Stunden mit einer Nachtpause von 6 Stunden (7 Uhr, 11 Uhr, 15 Uhr, 19 Uhr, 22 Uhr, 1 Uhr) und in der dritten Woche tags alle vier Stunden mit einer Nachtpause von acht Stunden (0 Uhr, 8 Uhr, 12 Uhr, 16 Uhr, 20 Uhr, 24 Uhr). Ab der vierten Woche wurde nur noch viermal täglich gefüttert, ab der achten Woche nur noch dreimal täglich.

3.2.2.4. Beifütterung

Ab Tag 32 wurde mit der Beifütterung von Trockenfutter (Lactoferrinversuch) bzw. Feuchtfutter (Ec.faecium-Versuch, Pedigree® mit 5 Sorten Geflügel von Masterfoods GmbH, Verden) begonnen (Tab. 14). Bis Tag 56 wurde die Beifuttermenge kontinuierlich gesteigert und gleichzeitig die dargereichte Menge Milchaustauscher reduziert. Am Tag 56 wurden die Welpen ganz abgesetzt, also nur

noch mit Festfutter gefüttert. Das Lactoferrin des OWF-Versuchs war in die Futterpellets eingearbeitet worden. Das Probiotikum des Ec.faecium-Versuchs wurde vor der Fütterung auf das Feuchtfutter aufgestreut.

Tabelle 14
Zusammensetzung der Beifuttermittel für Welpen

		Lactoferrinversuch					Ec. faecium -Versuch
		Trockenfutter mit					
		0	30	60	95	120	
		ppm Lactoferrin					
TS der US	%	94,43	94,43	92,70	94,79	94,69	21,0
TS (gemahlen)	%	95,11	94,93	93,50	94,58	94,26	20,0
Asche	%	6,38	6,87	6,70	6,84	6,39	2,8
Rp*	%	27,5	26,9	27,4	26,0	26,3	
Rp in US	%	27,3	26,72	25,60	26,06	26,42	7,6
Rfa*	%	2,62	2,65	2,40	2,78	2,89	
Rfa in US	%	2,6	2,63	2,2	2,79	2,9	0,24
Rfe*	%	10,0	10,6	9,2	10,6	10,0	
Rfe in US	%	9,93	10,53	8,6	10,62	10,05	5,8
Nfe	%	48,22	47,68	47,00	48,48	48,94	
Ca in US	g/kg	11,15	12,88	12,34	11,83	12,22	4,23
K in US	g/kg	3,96	4,59	4,54	4,13	3,65	1,89
Na in US	g/kg	2,44	2,50	2,70	2,53	2,33	2,23
P in US	g/kg	3,82	4,04	4,06	3,74	3,63	2,99
Zn in US	mg/kg	90,53	95,87	94,97	81,33	105,43	36,42
Cu in US	mg/kg	9,66	10,93	11,59	12,67	9,3057	3,00
Mg in US	mg/kg	501,9	520,27	471,50	441,53	488,4	185,35
Fe in US	mg/kg	130,27	148	153,80	136,87	116,00	24,55
Ca ⁺⁺	g/kg	11,72	13,57	13,20	12,38	12,97	21,59
K ⁺⁺	g/kg	4,17	4,83	4,86	4,31	3,87	9,63
Na ⁺⁺	g/kg	2,56	2,63	2,89	2,65	2,47	11,38
P ⁺⁺	g/kg	4,01	4,25	4,34	3,91	3,85	15,24
Zn ⁺⁺	mg/kg	95,18	100,99	101,57	85,99	111,85	173,43
Cu ⁺⁺	mg/kg	10,16	11,55	12,40	13,40	9,87	14,26
Mg ⁺⁺	mg/kg	527,70	548,05	504,28	466,84	518,14	882,62
Fe ⁺⁺	mg/kg	136,96	155,90	164,49	144,71	123,06	116,90

⁺⁺ bezogen auf TS der gemahlene Substanz

* in gemahlener ungetrockneter Substanz

3.2.2.4.1. Methode der Futteranalyse

Es wurden die Gehalte an Calcium, Kalium, Natrium, Phosphor, Zink, Kupfer, Magnesium und Eisen im Beifutter bestimmt. Dazu wurden die Futterproben gemahlen und verascht. Zuerst wurde ein Mixer (Moulinette, Typ 647, Moulinex) und dann eine Mahlmaschine (Retsch ZM-100, Retsch-GmbH, Haan) benutzt. Im Anschluss wurde von jeder Probe ca. 0,5 g abgewogen und in einem Glas mit 5 ml

65 %iger Salpetersäure versetzt. Das mit Deckel versehene Glas wurde in einen mit 5 ml Aqua dest. und 1 ml 30%igem H₂O₂ befüllten Porzellankolben gegeben und 40 Minuten in einem Mikrowellengerät (mls 1200 mega, high performance microwave digestion unit, Microwave Laboratory Systems) verascht. Die Veraschungsflüssigkeit wurde mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt.

Bestimmung von Calcium, Kalium und Natrium

40 µl der Veraschungslösung (bzw. Serum-Standard-Stammlösung für die vorhergehende Eichung) wurden automatisch (Diluter 5213, Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) ad. 1000 µl mit Lithiumlösung (nur Lithiumlösung für den Leerwert) aufgefüllt und in einen Probebecher (4 ml, Eppendorf) gegeben. Die Messung erfolgte vollautomatisch mit einem Flammenphotometer (Elex 6361, Eppendorf). Vor dem Messen eines anderen Mengenelements wurde das Gerät mit einem Leerwert (Lithiumlösung, 0 mmol Ca/l) und einem Standard (Serum-Standard-Stammlösung, 2,5 mmol Ca/l) geeicht.

Herstellung der Lösungen (alle Produkte von der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg):

Lithiumlösung: 10 ml Lithium-Stammlösung (500mmol/l Li, Nr. 0030 306.007) wurden auf 1000 ml mit Aqua dest. H₂O verdünnt.

Serum-Standard-Stammlösung:

Na = 143,5 mmol/l

K = 3,84 mmol/l

Ca = 2,50 mmol/l

PO₄ = 0,97 mmol/l

Berechnung: Atomgewicht von Calcium = 40,08
 Atomgewicht von Kalium = 39,10
 Atomgewicht von Natrium = 22,99

$$\text{g Ca/kg} = \frac{40,08 \text{ [g/mol]} \times \text{Messwert [mmol/l]} \times \text{Verdünnung (10 [ml] aus Veraschung)}}{1000 \times \text{Einwaage [g]}}$$

Diese Formel gilt entsprechend auch für Kalium und Natrium.

Bestimmung von Phosphor

Die Bestimmung des Gesamtphosphorgehaltes erfolgte photometrisch (Spektralphotometer Genesys, 10 UV, ThermoSpectronic, Rochester NY, USA).

Herstellen der Lösungen (alle Reagenzien von Merck, Darmstadt):

0,6 n Trichloressigsäure:

98 g Trichloressigsäure wurden in 1 l Aqua dest. eingemischt

Molybdat-Lösung:

500 ml H₂O wurden in einem 1000 ml-Messkolben vorgelegt und 49,4 g Molybdat ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ × 4H₂O) eingewogen und darin gelöst. Weiter wurden 130 ml H₂SO₄ (98%ig) zugegeben und auf 1l mit Aqua dest. aufgefüllt.

Vanadat-Lösung:

500 ml H₂O wurden in einem 1000 ml-Messkolben vorgelegt und 2,46 g Vanadat (NH₄VO₃) eingewogen und darin gelöst. Weiter wurden 20 ml HNO₃ (65%ig) zugegeben und auf 1l mit Aqua dest. aufgefüllt.

Für den Blindwert wurden 1 ml Trichloressigsäure, 1ml Molybdat-Lösung und 1 ml Vanadat-Lösung zusammengegeben. Für den Standard wurden zusätzlich noch 0,1 ml Standard hinzugegeben.

0,1 ml Veraschungslösung wurden mit 2 ml Trichloressigsäure in PP-Rundbodenröhrchen (10 ml) gefüllt und mittels Reagenzglas-Schüttler gemischt. Nach 10 Minuten wurden 2 ml Molybdat-/Vanadat-Lösung (1:1) zugegeben,

geschüttelt und das Gemisch wiederum 10 Minuten stehengelassen. Die Messküvetten (Einmalküvetten Plastibrand®, 2,5 ml Makro, 1 cm Schichtdicke, Abmessung 12,5x12,5x45 mm, Cat No. 759005) wurden gefüllt und es wurde in gleichen Zeitabständen im Photometer bei 366 nm gemessen.

Berechnung:

$$\text{g P/kg} = \frac{\text{Messwert} \times 10,5 \times \text{Verdünnung (10 [ml] aus Veraschung)}}{\text{Standard (0,34)} \times 100 \times \text{Einwaage [g]}}$$

3.2.3. Unterbringung

Die Welpen des Lactoferrinversuchs wurden im Schweine- und im Pferdestall des Instituts für Tierschutz und Tierhygiene, Aussenstelle Oberwiesenfeld, in Abferkelboxen und Pferdeboxen untergebracht. In unmittelbarer Nachbarschaft befanden sich zwei Pferde und meist zwei trächtige Sauen oder Muttersauen mit Ferkeln. Aus technischen Gründen konnte keine Kontinuität in der Umstallung in den Pferdestall gewahrt werden. So waren manche Welpen durchgehend im Schweinestall untergebracht, die meisten verbrachten dort wenigstens die ersten Wochen, jedoch wurde zu Winterbeginn aus Temperaturgründen ein Zimmer im Keller des Instituts für Tierernährung für die dreitägigen Welpen benutzt, die dort bis zum Alter von 4 Wochen in Kisten aufgezogen und dann ans Oberwiesenfeld umgestallt wurden.

Der Betonboden wurde mit Heu ausgelegt. Darauf wurden im Bereich der Wärmelampen Hundedecken und Handtücher gelegt. Wenn sich zwei verschiedene Gruppen in einer Box befanden, wurden die Bereiche durch Heuballen abgetrennt und sämtliche potentiellen Schlupflöcher mit Heu ausgestopft. Als Spielzeug wurden Bälle, Spieltaus für Hunde, Stofftiere, Pappschachteln, Quietschies und dergleichen angeboten.

Im Stall herrschten wetterbedingt unterschiedliche Temperaturen. Der Stall wurde ständig mittels Unterdruckentlüftung entlüftet, da die Nachbarboxen von tragenden

bzw. säugenden Sauen belegt waren. Hohe Temperaturen herrschten deshalb auch im Sommer nie, aber leichte Zugluft ließ sich aus demselben Grund nicht vermeiden. Generell herrschte im Stall relativ oft ein feucht-kaltes Klima, ein Ausgleich wurde mit vermehrter Heueinstreu und Wärmelampen versucht. Die Temperatur unter den Wärmelampen betrug zwischen 29°C und 32°C, die Stalltemperatur betrug zwischen 18°C und 25 °C. Bei kühlen Aussentemperaturen wurde der Stall geheizt.

Die Welpen des *Ec.faecium*-Versuchs wurden in einem Hundestall des GSF Forschungszentrums gehalten. Nach Alter und Gruppe getrennt wurden sie in den ersten zwei Wochen in Wurfkisten aufgezogen und später auf die vier ca. 8 Quadratmeter grossen Boxen aufgeteilt. Die Boxen waren so angeordnet, dass ein Kontakt unter den Gruppen nicht möglich war. Dadurch war gewährleistet, dass die Kontrolltiere nicht mit dem Probiotikum in Berührung kamen. Im Alter von vier Wochen wurde den Welpen Zugang zu den an die Boxen anschließenden ca. 16 Quadratmeter grossen Auslaufflächen ermöglicht.

Der Stallboden bestand aus Beton. Als Schlafplatz wurde den Welpen Hundedecken in eine Ecke gelegt und darüber eine Wärmelampe angebracht. Den Welpen wurde Spielzeug und Kartons zur Verfügung gestellt. Die betreuenden Personen beschäftigten sich täglich zusätzlich zu den Fütterungen mit den Welpen, um eine gute Sozialisation zu gewährleisten. Die Raumtemperatur betrug ca. 24 °C, eine Ecke der Boxen wurde zusätzlich mit Wärmelampen beheizt. Über den Wurfkisten waren ebenfalls Wärmelampen installiert.

3.2.4. Klinische Überwachung

3.2.4.1. Gewichtsentwicklung

Die Futtermittelaufnahme wurde pro Fütterung anhand der Gewichtszunahmen während der Fütterung gemessen. Dazu wurde eine elektronische Waage (Mettler Toledo, 5-8100g, Switzerland, SNR 2115506721) verwendet.

3.2.4.2. Entwicklungszustand

Der Entwicklungszustand wurde anhand der Geburtsgewichte, der Gewichtszunahmen, des Öffnens der Augen und Ohren, dem spontanem Harn- und Kotabsatz und am Gehvermögen beurteilt.

3.2.4.3. Allgemeinuntersuchung

Aus zeitlichen Gründen wurde eine Allgemeinuntersuchung (Allgemeinbefinden, Puls, Atmung, Temperatur, Schleimhäute, Kapillare Füllungszeit, Lymphknoten) nur anfangs durchgeführt. Später wurde lediglich auf das Allgemeinbefinden geachtet.

3.2.4.4. Verhalten

Genauere Untersuchungen über das Verhalten bei der mutterlosen Aufzucht werden im Rahmen einer weiteren Dissertation von Jeanette Haug, München, durchgeführt.

3.2.5. Pflege

3.2.5.1. Stimulation von Kot- und Harnabsatz

Bis zum regelmäßig auftretenden spontanen Kot- und Harnabsatz wurde nach jeder Fütterung stimuliert. Hierzu wurde ein Tuch oder Zellstoff mit Babyöl oder warmem Wasser verwendet und die Genital- und Analregion massiert.

3.2.5.2. Hygiene

Spontan abgesetzter Kot, verschmutzte Decken und Heu wurden bei jeder Fütterung entfernt. Je nach Bedarf wurde die ganze Box ausgemistet, im Schnitt alle drei Tage.

Mit Kot verschmierte Welpen wurden mit warmem Wasser abgewaschen, trockenfrottiert und unter die Wärmelampe gesetzt.

3.2.6. Probengewinnung und tierärztliche Maßnahmen

3.2.6.1. Blutentnahme

Blut wurde nach der im folgenden beschriebenen Methode an Tag 3, Tag 7 und in den Wochen 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 genommen. Die Proben wurden ab Tag 3 zur Bestimmung des Antioxidativen Status und zur Messung des IgG- und IgA-Gesamt titers verwendet, ab Woche 4 wurde zusätzlich ein rotes und weißes Blutbild erstellt.

3.2.6.2. Kot

Kot wurde einmal wöchentlich, bzw. bei kleinen Mengen über die ganze Woche, zur Bestimmung der Trockensubstanz und des Lactoferringehalts gesammelt und portionsweise eingefroren. Da der Kot nur teilweise einem bestimmten Welpen zugeordnet werden konnte, wurde immer auch Gruppenkot gesammelt. In den Zeiträumen von Tag 3 - 14, Woche 4, 8 und 14 wurde frisch abgesetzter Kot für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendet.

3.2.6.3. Entwurmung

Ab der zweiten Woche wurde wöchentlich mit Fenbendazol (Banminth®-Paste, Pfizer) entwurmt.

3.2.6.4. Tätowierung

Die für Versuchstiere vorgeschriebene Tätowierung wurde im Zeitraum fünfte bis siebte Woche vorgenommen.

3.2.6.5. Impfung

Geimpft wurde in den Wochen 8 und 12 (virbagen®canis SH(A2)P, Staupe-Hepatitis-Parvovirose-Lebendimpfstoff (gefriergetrocknet) für Hunde, virbac Bad Oldesloe).

Zur Messung der spezifischen humoralen Immunabwehr wurde ebenfalls in den Wochen 8 und 12 humanes Serumalbumin subcutan verabreicht. Dazu wurden 10 mg HSA (Albumin, human 97-99%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in 250 µl Adjuvans (5 mg PCSL in 5 ml PBS, pH 7,4) aufgelöst (PCSL = Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ x 3 HCl, EMC microcollections) und 750 µl PBS zugegeben.

3.2.7. Blutentnahme

Die Microvetten (Microvette®200LH, System zur Kapillarblutgewinnung, Inhalt: Lithium-Heparin, Sarstedt, Nümbrecht) und Blutröhrchen (Röhre für hämatologische Bestimmungen, 5 ml, 75 x 13 mm, Inhalt: Kalium-EDTA, 1,6 mg EDTA/ml Blut) wurden beschriftet und Ersatzmicrovetten bereitgestellt. Der Schlauch eines Butterflys („Unolock“ Luer Lock Infusion Set, 0,63 x 19 mm, HMD healthcare LTD, Horsham, UK) wurde bis auf ca. 0,5 cm abgeschnitten. Bei größeren Welpen wurden größere Butterflys verwendet (Microperfuseur, 0,7 mm, G22, Laboratoires Pharmaceutiques VYCON, Ecoen, Frankreich). Der Unterarm des Welpen wurde mediocranial (Lokalität wie bei der Blutentnahme aus der vena cephalica antebrachii beim erwachsenen Hund) rasiert (A5® 2 Speed Clipper, Oster Professional Products), gereinigt und desinfiziert (Alcohol Pads, 70%iger Isopropylalkohol, B/Braun, Meisungen) und ein Stauschlauch (der abgeschnittene Teil des Luer Lock Infusion Sets hat sich gut geeignet) angelegt. Der Butterfly wurde in die vena cephalica antebrachii eingestochen. Wenn die Vene nicht sichtbar war, wurde medial in der Mitte des Welpenunterarms in lateroproximaler Richtung eingestochen. Es

erwies sich als sinnvoll, einige Sekunden zu warten und erst dann mit der Kanüle nach der Vene zu suchen, da diese oft richtig lag, das Blut aber sehr langsam lief. Sobald Blut aus dem kurzen Ende des Infusionsschlauchs trat, wurden die Blutropfen mit der Microvette aufgesaugt. Durch die langsame Fließgeschwindigkeit des Blutes konnte es vorkommen, dass das Blut in der Microvettenkapillare koagulierte. Dies ließ sich teilweise durch vorsichtiges Klopfen der Microvette auf beispielsweise den Handrücken verhindern. Ansonsten wurde umgehend eine neue Microvette verwendet. Auf die Einstichstelle wurde unmittelbar nach der Blutentnahme eine Minute Druck angewendet, um die Bildung eines Hämatoms zu verhindern. Anschließend wurde die Blutentnahmestelle mit Hirudoid®Gel (Wirkstoff Chondroitinpolysulfat aus Rindertracheen, Sankyo Pharma GmbH) eingerieben.

Mit dieser Methode gelang es immer, mindestens 20 µl Blut zu entnehmen. In der Regel ließen sich in der ersten Woche mindestens 50 µl Blut entnehmen, später entsprechend mehr. In der vierten Woche konnte von allen Welpen genügend Blut (1 ml) für die Erstellung eines roten und weißen Blutbildes gewonnen werden.

3.2.8. Blutbild

Das rote und weiße Blutbild wurde automatisch im Cell-Dyn® 3500R (Abott GmbH & Co.KG, Weisbaden-Delkenheim erstellt.

3.2.9. Untersuchungen mittels ELISA

Alle zu den Blutentnahmezeiten (Tag 3, Tag 7, Woche 2, 4, 8, 10, 12, 14) entnommenen Proben wurden auf ihren Gesamtgehalt an Immunglobulin G und Immunglobulin A untersucht. Hierzu wurde die von ERHARD et al. (1995) für bovines IgG angewandte Methode für Hunde modifiziert. Außerdem wurde vor der Impfung mit humanem Serumalbumin eine Blutprobe als Leerwert genommen (Woche 8). Die nachfolgenden Blutproben (Woche 10, 12, 14) wurden auf ihren spezifischen Antikörpergehalt gegen humanes Serumalbumin (HSA) untersucht. Da für die Bestimmung der Antikörper gegen HSA kein genormter Standard verfügbar war,

wurden lediglich die Extinktionswerte des ELISA-Readers untereinander verglichen. Diese sind proportional zur Konzentration an HSA.

3.2.9.1. Vorbereitung

Zu allen Blutentnahmezeiten (Tag 3, Tag 7, Woche 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14) wurde heparinisiertes Blut zentrifugiert, das Plasma 1:100 mit PBS-Puffer (pH 7,2) verdünnt und bis zur Untersuchung bei -80°C eingefroren.

Herstellung von Puffer und Lösungen

(soweit nicht anders aufgeführt sind alle Chemikalien von der Fa. Merck, Darmstadt)

PBS: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

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

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

Waschpuffer: PBS-Tween

TMB-Puffer: Natriumacetat-Citrat-Puffer pH 5,0

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

Stammlösung: Tetramethylbenzidin-Lösung

0,06 g Tetramethylbenzidin
10 ml Dimethylsulfoxid

Substratlösung:

332 µl Stammlösung
10,0 ml TMB-Puffer
3,00 µl 30% H₂O₂

Stoppreagenz: 1-molare Schwefelsäure pH 1

472 ml Aqua bidest.
28 ml 96%ige Schwefelsäure

3.2.9.2. Bestimmung von IgG und IgA im vorverdünnten Plasma

Der Nachweis von IgG und IgA im vorverdünnten Plasma wurde durch das Sandwich-ELISA-Verfahren nach ERHARD et al. (1995) in folgenden Schritten durchgeführt.

3.2.9.2.1. Beschichtung (1. Tag)

An eine 96-Loch-ELISA-Platte aus Polystyrol (Maxisorb, Nunc®, Wiesbaden) wurde der Antikörper (caprine IgG-Antikörper Aal31 gegen Hunde-IgA in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), 1,0 mg IgG/ml, Serotec Kidlington, Oxford, UK) fixiert. Die Konzentration betrug 5 µg Antikörper pro ml Beschichtungspuffer (50

μg Anti-Immunglobulin-G-Antikörper in 10 ml Beschichtungspuffer (pH= 9,6)). In jede Kavität der Platte wurden 100 μl pipettiert und anschließend über Nacht (18 h) bei + 4°C inkubiert.

3.2.9.2.2. Waschvorgang

Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBS-Tween in einem mechanischen Wascher (ELX 405 AutoPlateWasher, Bio-Tec. Instruments Inc.) wurde diese anschließend auf Zellstoff zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft.

3.2.9.2.3. Blockierung (2. Tag)

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 zu blockieren, wurden in jede Kavität 200 μl dieser Lösung pipettiert und die Platte danach bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

3.2.9.2.4. Waschvorgang: wie unter Punkt 2 beschrieben

3.2.9.2.5. Auftragen der Proben

Die 1:100 vorverdünnten Plasmaproben wurden mit PBS-Tween auf die Endverdünnungen 1:5000 bei IgG, 1:1000 bei HSA und 1:200 bei IgA verdünnt und in die oberste Kavität einer jeden Spalte aufgetragen. In jeder Spalte wurde daraufhin eine zweierlogarithmische Verdünnungsreihe angelegt, so dass am Ende jede Vertiefung mit 50 μl beladen war (Vorlegevolumen 50 μl). Als Standard wurde canines IgG (Canine Immunglobulin Reference Serum) in einer Anfangskonzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in eine Spalte pipettiert und ebenfalls in zweierlogarithmischen Schritten verdünnt. Als Leerwert wurden 50 μl PBS-Tween in eine Kavität gefüllt. Es folgt wiederum 1 Stunde Inkubation bei 37°C.

3.2.9.2.6. Waschvorgang: wie unter Punkt 2 beschrieben

3.2.9.2.7. Hinzufügen des Konjugats

Als Konjugat wurden an Peroxidase gekoppeltes Ziegen-anti-Hund-IgA bzw. Kaninchen-anti-Hund-IgG (Aal31P goat-anti-canine-IgA:HRP, purified IgG conjugated to Horseradish Peroxidase, 1.0 mg/ml bzw. rabbit anti-dog IgG, whole molecule, peroxidase conjugate, affinity isolated antibody, A6792, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) (Ig-POD-Konjugat 1:10)) in einer Konzentration von 1:50 000 (2 µl Konjugat in 10 ml PBS-Tween) verwendet. Davon wurden je 100 µl in jede Kavität pipettiert und die Platten wiederum für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

3.2.9.2.8. Waschvorgang: wie unter Punkt 2 beschrieben

3.2.9.2.9. Hinzufügen des Substrats

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

3.2.9.2.10. Stoppen der Reaktion

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

3.2.9.2.11. Auswertung

Im ELISA-Reader (EAR 400 AT, SLT-Labinstruments, Overath) ist die Farbintensität bei 450 nm innerhalb 30 Minuten gemessen worden. 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 die Endkonzentration in mg/ml.

3.2.10. pH-Wert-Messung im Kot

Frischer Kot wurde mit Aqua dest. im Verhältnis 1:5 gemischt, um einen guten Kontakt des Kotes zur Elektrode zu gewährleisten. Das Messgerät (pH 325, WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien) wurde auf pH geschaltet und die pH-Elektrode (SenTix 97/T, WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien) bis zur Konstanz des pH-Wertes in die Kotsuspension gehalten.

3.2.11. Ammoniakbestimmung im Kot

3.2.11.1. Probenvorbereitung

Der frische Kot wurde 1:10 in einer Röhre (No. 55.463, 14 ml, 105x16mm, Sarstedt, Nümbrecht) mit Aqua tridest. versetzt, homogenisiert und zentrifugiert (Typ 2006, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). 5 ml des Überstandes wurden mit 0,4 ml 1:4 verdünnter, rauchender HCl versetzt und sofort bis zur Untersuchung in Eppendorf-Cups eingefroren. Die Messung erfolgte in der aufgetauten Probe.

3.2.11.2. Arbeitsablauf der Ammoniummessung

Die Standardlösung mit 10 g/l Ammonium (ES/NH₄, WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien) wurde zur Erstellung einer Eichkurve in einer Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von 1: 10 000 in Zehnerschritten verdünnt.

Die erwarteten Probenmesswerte sollten möglichst eingeschlossen sein. Das pH-Meßgerät (pH 325, WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien) wurde auf mV geschaltet und auf 25°C kalibriert. Die durch das Anschlußkabel (AS/DIN, WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien) mit dem Messgerät verbundene Ammoniumelektrode (Gas-sensitive Einstabmesskette mit Steckkopf für die Ammoniak/Ammonium-Messung NH 500/2, WTW Mess- und Analysengeräte GmbH,

Wien) wurde in die erste Standardlösung getaucht, so dass der gesamte Messkopf mit Flüssigkeit bedeckt war und sich keine Luftblasen bildeten. Dann wurde 2% Natriumhydroxidlösung (10 mol/l, MZ/NH₃/CN, WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien) zugegeben, wodurch das Ammonium in Ammoniak umgewandelt wurde. Die im Wasserbad auf 25°C erwärmten Proben wurden während der Messung gerührt. Das Ablesen erfolgte, sobald der Wert stabil war. Ebenso wurde mit den übrigen Standardlösungen verfahren. Zwischen den einzelnen Messungen wurde der Messkopf mit destilliertem Wasser gespült. Die Auswertung der Kalibrierung erfolgte auf halblogarithmischem Papier, sie kann aber auch errechnet werden. Die Proben wurden mit 2% Natriumhydroxidlösung versetzt und die mV-Spannung in der Probenmesslösung gemessen. Anhand der Kalibriergeraden wurde der Konzentrationswert der Messlösung ausgewertet.

Zur Arbeitszeitverkürzung wurden die Proben nach Konzentration vorsortiert. Dadurch verkürzte sich die Ansprechzeit der Elektrode, die für eine Konzentrationsänderung um das Zehnfache ungefähr acht Minuten beträgt. Zur groben Konzentrationsmessung wurde ein Schnelltest verwendet (Ammonium-Test, Analysestäbchen und Reagenz zum Nachweis und zur halbquantitativen Bestimmung von Ammoniumionen, Merck, Darmstadt). Das im Set enthaltene Testglas wurde mehrmals mit der zu prüfenden Lösung gespült und dann bis zur 5-ml-Markierung gefüllt. 10 Tropfen Reagenz (Natronlauge) werden zugetropft und vorsichtig umgeschwenkt. Das Teststäbchen wurde mit der Reaktionszone 3 Sekunden so in die Lösung eingetaucht, dass die Reaktionszone vollständig benetzt wird. Das Teststäbchen wurde herausgenommen und überschüssige Flüssigkeit abgeschüttelt. Nach 10 Sekunden wurde die Reaktionszone mit der Farbskala verglichen und die Konzentration abgelesen.

3.2.12. Bestimmung des L-Lactatgehaltes im Kot

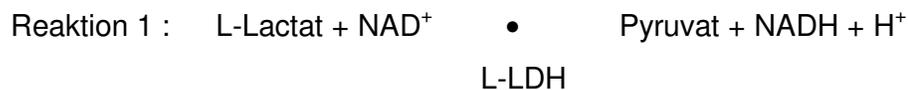
3.2.12.1. Vorbereitung

Ein Teil Kot wurde in Röhrchen (REF 55.463, Sarstedt, Nürnberg) mit 10 Teilen 0,6 molarer Perchlorsäure versetzt, homogenisiert und zentrifugiert (EBA 3 S-Zentrifuge,

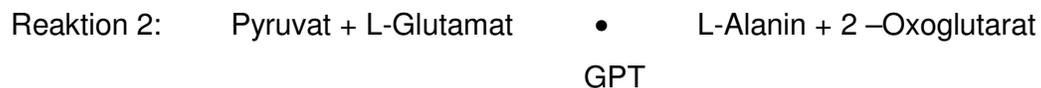
Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde in Eppendorfcups pipettiert und eingefroren.

3.2.12.2. Prinzip

L-Lactat wird durch NAD^+ (Nicotinamid-adenin-dinucleotid) in Gegenwart von L-LDH (L-Lactatdehydrogenase) oxidiert. Dabei entstehen Pyruvat und NADH (Reaktion 1).



Da das Gleichgewicht der Reaktion auf Seite des Lactats liegt ist es notwendig, dass das Pyruvat mittels des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat in einer Folgereaktion weiterreagiert (Reaktion 2). Das Gleichgewicht von Reaktion 1 wird dadurch auf die Seite des Pyruvats verschoben, so dass das gesamte Lactat umgesetzt und bestimmt werden kann.



3.2.12.3. verwendete Chemikalien

Boehringer (Katalogseite, Artikelnummer)

NAD (S. 459; Nr.621650)

GPT (S. 445; Nr.737127)

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

Fluka (Katalogseite, Artikelnummer)

L-Glutaminsäure (S.715; Nr.49450)

Gly-Gly (S. 725; Nr. 50200)

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

3.2.12.4. Herstellung der Chemikalien

Glycylglycinpufferlösung (pH 10)

4,75 g Glycylglycin und 0,88 g L-Glutaminsäure werden in ca. 50 ml Aqua bidest. gelöst. Mit Natronlauge (8 g NaOH, Aqua bidest. ad 100 ml (Natronlauge 8%)) wird der pH -Wert auf 10 eingestellt. Die Lösung wird mit Aqua bidest. auf 60 ml aufgefüllt. Sie ist bei 4°C drei Monate haltbar.

NAD-Lösung

210 mg NAD werden in 6 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

Die Lösung ist bei 4°C vier Wochen haltbar.

L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH)

aus Schweinemuskel:

10 mg/ml (1%) in Glycerin/Wasser-Mischung (Massenkonzentration 50 g/100 ml), etwa 550 U/ml. Diese 1%ige Suspension ist bei 4°C ein Jahr haltbar.

Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)

aus Schweineherz, Kristallsuspension, 80 U/mg)

10 mg/ml (1%) in Ammoniumsulfatlösung (Konzentration 3,2 mol/l). Die GPT- Lösung ist bei 4°C 1 Jahr haltbar.

3.2.12.5. Messvorgang

Die Messung erfolgte im Spektralphotometer (Genesys 10 UV Photometer der Firma ThermoSpectronic, Rochester NY, USA) bei einer Wellenlänge von 365 nm. Die Temperatur betrug 25°C, die Messung erfolgte gegen einen Leerwert.

Bei im folgenden beschriebenen Vorgehen ist darauf zu achten, dass mit Handschuhen gearbeitet wird. Dadurch wird vermieden, dass im Handschweiß enthaltene Milchsäure in Kontakt mit Materialien oder Geräten kommt und zur Verfälschung der Werte führen kann.

In Einmalküvetten (Plastibrand®, 2,5 ml Makro, 1 cm Schichtdicke, Abmessung 12,5x12,5x45 mm, Cat No. 759005) wurden folgende Reagenzien zur Herstellung der Proben- und Leerwertmesslösungen pipettiert:

	Leerwert	Probe (doppelt)
Glycylglycin-puffer	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 Minuten 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 Probenwert bestimmt. Bei jeder Probe wurde anschließend der Probenleerwert vom Probenwert subtrahiert und so der Extinktionskoeffizient DeltaE errechnet.

Die Lactatkonzentration wurde nun mittels folgender Formel errechnet:

$$c = \frac{V \times MG \times F}{\Delta \times d \times v \times 1000} \times \text{DeltaE}$$

c = Lactatkonzentration [g/l]

V = Testvolumen [ml] (hier: 1,120 ml)

- MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol] (hier: 89,1 g/mol für L-Lactat)
- F = Verdünnungsfaktor (hier: 10; die Proben wurden in der Vorbereitung 1:10 verdünnt)
- ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH bei 365 nm [l/(mmol x cm)] (hier: 3,4)
- d = Schichtdicke [cm] (hier: 1 cm)
- v = Probevolumen [ml] (hier: 0,050ml)

Daraus ergibt sich für L-Lactat:

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

Bei einer Analyse der Reinsubstanz sind Ergebnisse von ca. 98 % zu erwarten. Als Standard wurde Lithium-L-Lactat (Molmasse 96,0 g/mol) verwendet und in den Konzentrationen 0,050; 0,100; 0,150 und 0,300 g Li-L-Lactat/l angesetzt.

3.2.13. Bestimmung der Trockensubstanz des Kotes

Für die Bestimmung der Kot-Trockensubstanz wurde wöchentlich Kot in vorgewogenen Urinbechern gesammelt, gewogen und eingefroren. Das Trocknen erfolgte bei 100°C im Trockenschrank (Typ T 0042, Heraeus, Hanau). Nach 36 h wurden die Proben bis zur Abkühlung in einen Exsikkator (Duran 8011, Glaswerk Wertheim) verbracht und sofort gewogen (Waage: Mettler AE 160, Mettler Waagen GmbH, Gießen). Das Gewicht des getrockneten Kotes errechnet sich durch das Gesamtgewicht abzüglich des Bechergewichtes. Die Trockensubstanz in Prozent errechnet sich durch Division des Gewichtes des getrockneten Kotes durch das Gewicht der Einwaage mal hundert.

3.2.14. Mikrobiologische Untersuchung

Kotproben für die mikrobiologische Untersuchung wurden jeweils in den ersten beiden Lebenswochen (eine zeitlich einheitlichere Probennahme war wegen der oft nicht erreichten Mindestmenge von 1 Gramm Kot nicht möglich), vor Beginn der Beifütterung im Alter von 4 Wochen, vor dem Einstellen der Milchersatzfütterung im Alter von 8 Wochen und am Ende der Versuchsdauer im Alter von 14 Wochen genommen.

Die Proben wurden am Institut für Tierschutz und Tierhygiene der LMU München auf ihre Gesamtkeimzahl und sowohl qualitativ als auch quantitativ auf E.Coli, Enterokokken, Lactobacillen und Clostridien untersucht.

3.2.14.1. Materialien

Tabelle 15
Für die mikrobiologische Untersuchung verwendete Nährböden

untersuchte Keimgruppe	Bezeichnung des Nährbodens	Zusammensetzung des Nährbodens
Gesamtkeimzahl	Caso (Merck)	Casein, Pepton, Sojamehl, Agar Agar
E. Coli	MacKonkey (Merck)	Pepton aus Fleisch und Casein, Lactose, Gallensalz, Neutralrot, Kristallviolett, Agar Agar
Enterococcen	CNA (Biomérieux)	Pepton, Hydrolysat pflanzl. und tierischer Proteine, Herzpepton, Maisstärke, NaCl, Hammelblut, Antibiotikamischung, Agar, Agar
Lactobacillen	Rogosa (Merck, selbstgegossen)	Pepton, Hefeextrakt, Glucose, Kaliumdihydrogenphosphat, Ammoniumcitrat, Tween® Natriumacetat, Magnesiumsulfat, TweenEisensulfat, Mangansulfat
Clostridien	RCM (Merck, selbstgegossen)	Pepton, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Glucose, Stärke, Salz, Natriumacetat, Cysteiniumchlorid, Agar-Agar, Polymyxin B

Weitere Materialien

- Petrischalen (Greiner Labortechnik)
- Enterotube II BBL (Becton Dickinson, Reutlingen)
- MRS-Agar (Biomérieux, Nürtingen)
- Standard-I-Agar (Merck, Darmstadt)

- API-Strep System (Biomérieux, Nürtingen)
- API-20A-System (Biomérieux, Nürtingen)
- Anaerocult C® (Merck, Darmstadt)
- Anaerocult A (Merck®, Darmstadt)
- Oxidasestäbchen (Baktident® Oxidase von Merck, Darmstadt)
- Kovacs-Reagenz (Merck, Darmstadt)
- VPI (KOH) (Biomérieux, Nürtingen)
- VPI2 (alpha-Naphtol) (Biomérieux, Nürtingen)

3.2.14.2. Vorbereitung

Ein Gramm Kot (aus der Mitte des Kotes entnommen, sofern es die abgesetzte Menge zuließ) wurde zur Erstellung einer Verdünnungsreihe verwendet. Die Verdünnung erfolgte mit steriler Kochsalzlösung in Zehnerschritten. Für den ersten Verdünnungsschritt (1:10) wurden 2 ml Kochsalzlösung mit dem einen Gramm Kot in einer Petrischale aufgeschlämmt und in ein mit weiteren 7 ml Kochsalzlösung beschicktes Röhrchen pipettiert. Für alle weiteren Verdünnungsschritte wurde je ein Milliliter aus der niederen Verdünnungsstufe in ein mit 9 ml Kochsalzlösung beschicktes Röhrchen pipettiert und vermischt. Dies wurde bis zur Verdünnungsstufe 1:10 Milliarden durchgeführt. Je nach erwarteten Ergebnissen wurden für die verschiedenen Untersuchungen verschiedene Verdünnungsstufen verwendet (Tab. 16).

Tabelle 16

Verdünnungsstufen der Kotproben für die mikrobiologische Untersuchungen

untersuchter Parameter	Verdünnung
Gesamtkeimzahl	1:100 000 bis 1:10 Mrd
E.Coli	1:10 000 bis 1:1 Mrd
Enterokokken	1:10 000 bis 1:1 Mrd
Lactobacillen	1:1000 bis 1:100 Mio.
Clostridien	1:1 Mio bis 1:10 Mrd

3.2.14.3. Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Je 0,1 ml der unterschiedlichen Verdünnungsstufen wurde unter sterilen Bedingungen auf Casein-Pepton-Sojamehl-Platten (Caso-Platten) verimpft, ausgestrichen und 24h aerob bei 38°C bebrütet. Danach wurden die Kolonien ausgezählt und in CFU/g (colony forming units pro Gramm) umgerechnet.

3.2.14.4. Qualitative und quantitative Bestimmung von Escherichia coli

Hierfür wurden MacKonkey-Platten (Fleischpepton, Casein, Lactose, Gallensalze, Neutralrot, Kristallviolett, Agar-Agar) verwendet. Es wurde wiederum 24h aerob bei 38°C bebrütet und ausgezählt. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den Kolonien um E.colis handelte, wurden mehrere Kolonien mittels Gram-Färbung untersucht und die gramnegativen Stäbchen auf Standard I Agar verimpft und nochmals 24h bei 38°C bebrütet. Die aus dieser Bebrütung hervorgegangenen Kolonien wurden auf das Vorhandensein von Oxidase untersucht (Oxidasestäbchen Baktident®, Oxidase von Merck, Darmstadt). Eine oxidasenegative Kolonie wurde anschließend auf Enterotube II BBL (Becton Dickison, Reutlingen) verimpft und 24h bei 38°C bebrütet. Die meisten Reaktionen liefen spontan ab, lediglich für die Indolreaktion musste noch Kovacs-Reagenz hinzugegeben werden, für die Volges-Proskauer-Reaktion noch VPI (KOH) und VPI2 (a-Naphtol). Die Auswertung erfolgte anhand der beiliegenden Anleitung, indem die positiven Reaktionen mit einer bestimmten Zahl bewertet wurden, welche aufaddiert zur Identifikation des Keimes führten.

3.2.14.5. Bestimmung der Enterokokken

Hierfür wurde CNA-Medium verwendet (Pepton, Hydrolysat pflanzlicher und tierischer Proteine, Herzpepton, Maisstärke, NaCl, Hammelblut, Agar-Agar, Antibiotikummischung). Die Bebrütung erfolgte 24h bei 44°C. Zur sicheren Identifikation wurde ebenfalls eine Gramfärbung angefertigt, die grampositiven Bakterien auf Standard-I-Agar verimpft und 24h bei 38°C bebrütet. Anschließend wurde der Katalasetest durchgeführt, bei dem eine Kolonie mit einem Tropfen

3%igem H₂O₂ auf einem Objektträger verrieben wird. Die katalasenegativen Enterokokken dürfen dabei keine Blasen bilden. Die Kolonien wurden jetzt ausgezählt.

Zur weiteren Identifikation wurden die Keime für das API-20 Strep-System (Biomérieux, Nürtingen) vorbereitet. Dazu wurde eine Kolonie in 300 µl sterilem Wasser suspendiert, die Suspension auf eine Hammelblutplatte gegossen und die Platte 24h anaerob bei 44°C bebrütet. Die Kolonien wurden mit einem Tupfer abgenommen, in sterilem Wasser suspendiert und (teilweise erst nach Übertragung in ein API-GP-Medium) auf das API-System überimpft. Nach vierstündiger aerober Bebrütung erfolgte die erste Auswertung durch das computergestützte API Auswertungsprogramm. Wenn die Auswertung kein eindeutiges Ergebnis lieferte, musste nach einer weiteren 20-stündigen Bebrütung eine zweite Auswertung vorgenommen werden.

3.2.14.6. Bestimmung der Lactobacillen

Hierfür wurde Rogosa-Agar (Pepton, Hefeextrakt, Glucose, Kaliumdihydrogenphosphat, Ammoniumcitrat, Tween® Natriumacetat, Magnesiumsulfat, Eisensulfat, Mangansulfat) verwendet. Die mikroaerophilen Lactobacillen wurden im Anaerobiertopf mit Anaerocult C® (Merck, Darmstadt) bei 38°C 72h bebrütet. Es folgte die Auszählung und eine Gramfärbung. Zur weiteren Identifikation wurden die Kolonien auf MRS-Agar (Biomérieux, Nürtingen) übertragen und 24h anaerob bei 38° bebrütet. Sämtliche Kolonien wurden mit einem Tupfer abgenommen und in 2 ml sterilem Aqua dest. suspendiert. Einige Tropfen dieser dichten Suspension wurden in eine Ampulle Suspensionsmedium übertragen. Die Trübung entsprach McFarland 2. Nun wurde die doppelte Anzahl der oben verwendeten Tropfen in eine Ampulle API 50 CHL Medium verbracht und damit das API-50-System beimpft. Das mit Paraffinöl überschichtete System wurde 24 h bei 38°C bebrütet und durch ein Computerprogramm ausgewertet.

3.2.14.7. Bestimmung von Clostridien

Hierfür wurden RCM-Platten (Pepton, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Glucose, Stärke, Salz, Natriumacetat, Cysteiniumchlorid, Agar-Agar und Polymyxin B) bei 38°C im Anaerobiertopf mit Anaerocult A (Merck®, Darmstadt) für 48 Stunden bebrütet. Danach wurde (s. Enterokokken) auf Katalaseaktivität untersucht. Clostridien sind wie Enterokokken katalasenegativ.

Zur Vorbereitung auf das API-20A-System (Biomérieux, Nürtingen) wurden zwei Blutplatten mit auf den RCM-Platten gewachsenen Kolonien beimpft und aerob und anaerob 24 h bebrütet. Anhand dieser Methode lassen sich unerwünschte Bazillen unter den gewachsenen Keimen identifizieren, die im Gegensatz zu Clostridien auch unter aeroben Bedingungen wachsen können. Alle auf der anaerob bebrüteten Platte gewachsenen Keime wurden auf das API-20A-System verimpft, 24 Stunden bebrütet, mit den vorgeschriebenen Reagenzien versehen und mittels Computerprogramm ausgewertet.

3.2.15. Untersuchungen der Darmwand

Zur Untersuchung der Darmwand und des intestinalen Immunsystems wurden in der 14. Lebenswoche endoskopisch Schleimhautbiopate aus Duodenum und Colon/Rektum entnommen. Die Biopotentnahme erfolgte an der I. Medizinischen Tierklinik der LMU München durch Frau Ute Buscher unter der Leitung von Herrn Prof. Zentek (Wien). Durch Herrn Prof. Zentek wurden die Proben im Weiteren immunhistologisch und histologisch (ZENTEK et al., 2002) untersucht.

3.2.15.1. Vorbereitung

Um ein möglichst sauberes Arbeitsfeld im Dünndarm und Dickdarm zu erhalten wurde 48 Stunden vor der Narkose nicht mehr gefüttert und die Boxen wurden vollständig von Heu und jeglichen potentiell essbaren Gegenständen (wie Spielzeug) befreit. Aufgrund der kühlen Aussentemperatur und des Futterentzugs wurden wieder

Wärmelampen aufgehängt. Einmalig wurden je 20 ml 5%ige Glucoselösung subcutan verabreicht (Sterofundin®VG-5, Lösung zur intravenösen Infusion, B/Braun, Meisungen). Am Vorabend wurde das Rektum zweimal, am Morgen der Biopsie einmal mit Paraffinöl (Paraffin dünnflüssig, Merck, Darmstadt) und warmer Kochsalzlösung (Isotonische Natriumchlorid-Lösung, WDT) gespült (B/Braun Ernährungssonde, 50 cm, 1x1.5 mm, B/Braun-AG, D-Meisungen). Dieses Vorgehen wurde durch die Erfahrung bei der Biopsie des ersten Wurfes folgendermaßen optimiert: Auf die Glucoselösung wurde verzichtet, da die subcutane Injektion schmerzhaft war und die Verabreichung von Glucoselösung an 14-wöchige Hundewelpen nicht nötig ist. Das Heu wurde schon 10 Tage vorher aus den Boxen entfernt, da sich im Rektum noch eine Ansammlung von mit Kot, Paraffinöl und Kochsalzlösung vermengten Heuhalmern befand, die das Arbeiten erheblich erschwerten. Das Rektum wurde aus oben genanntem Grund schon zwei Tage vorher fünfmal täglich mit erheblich größeren Mengen an Paraffinöl und Kochsalzlösung (je ca. 60 ml) gespült.

3.2.15.2. Narkose

Zur Narkoseeinleitung wurden Propofol und Valium (Diazepam-ratiopharm®10 Injektionslösung), zur Erhaltung Isofluran (in der Anflutungsphase 4%, dann 2%) und Sauerstoff verwendet.

3.2.15.3. Biopstatentnahme

Es wurden jeweils 15 hirsekorn-grosse Proben aus Duodenum und Colon/Rektum entnommen. Verwendet wurden dazu ein flexibles Videoendoskop (Olympus GIF 160) mit einer fenestrierten Alligator-Biopsiezange (Olympus FB-36K-1).

3.2.15.4. Prinzip der Auswertung

Die quantitative histomorphometrische Untersuchung auf CD3-, CD4- und CD8-Lymphozyten, Plasmazellen, sowie Immunglobulin A, G und M erfolgte mittels Markern. Dazu wurden die markierten Zellen pro Fläche gemessen. Lymphozyten und Plasmazellen wurden in der Lamina propria mittels computergestützter Morphometrie pro als Einheit definiertem Areal (Zottenspitze, Zottenbasis und Krypte) quantifiziert oder wurden in der Epithelschicht manuell pro 100 Epithelzellen ausgezählt. CD³⁺-T-Zellen und IgA- oder IgM-Plasmazellen wurden in formalinfixierten Gewebeschnitten (5 Biopate) nach Antigenfreisetzung durch Trypsinovorverdauung identifiziert.

3.2.15.5. Immunhistochemie

3.2.15.5.1. Aufbereitung der Proben

Zur Erstellung von Gefrierschnitten für die Immunhistochemie wurden jeweils fünf Biopate aus Duodenum und Colon sofort in Optimal cutting tissue (embedding matrix von Lamb, Eastbourne) verbracht, welches sich in mit Korkeinlagen versehenen Alugefäßen befand. Diese Gefäße wurden dann mit den Proben in Isopentan getaucht und in flüssigen Stickstoff enthaltenden Behältern auf -80°C eingefroren. Der weitere Transport erfolgte auf Trockeneis.

3.2.15.5.2. Nachweis von IgA, IgG und IgM

Aus den formalinfixierten Biopaten wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 4 µm angefertigt. Diese wurden auf beschichtete Objektträger aufgebracht und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Anschließend wurden sie mit Aqua dest. gespült und für jeweils 30 Minuten in 37°C warmer Kalzium-Trypsinlösung (0,1 % erwärmtes Trypsin, 0,1 % CaCl₂ in Aqua dest., pH 7,8), in 0,5 % H₂O₂ in 50 % Methanol/PBS und in 5 %igem Kaninchenserum inkubiert. Zwischen den

Inkubationen wurde mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern in einer feuchten Kammer (1 h). Es wurde wieder mit PBS gewaschen, woran sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper anschloss (rabbit anti goat IgG conjugated to peroxid, Fa. DAKO, verdünnt 1:200 in PBS). Wieder wurde mit PBS gewaschen. Dann wurde 0,05 % DAB mit 0,01 % H₂O₂ in TRIS Puffer (4,75 ml Tris HCl 0.05 M, pH 7,6; 10 µl 30 % H₂O₂, 250 µl DAB-Reagens (DAB Peroxidase substrate kit, Vector, Burlingame) 20x vorverdünnt) hinzugefügt, zwei Minuten gewartet und mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden 30 Sekunden lang mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt, mit Leitungswasser, Alkohol in ansteigender Konzentration (70-100 %) und Roticlear® gereinigt und mit Neomount (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

3.2.15.5.3. Nachweis von CD³⁺- T- Zellen

Die Vorbereitung der Präparate wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper unter Zusatz von Mäuse IgG in einer Verdünnung von 1:200 für 60 min. Als sekundärer Antikörper wurden anti-Maus Antikörper von Kaninchen (rabbit anti mouse IgG biotinylated DAKO) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Anschließend wurde mit Streptavidin-Peroxidase (ABC Kit, 2 Tropfen A plus 2 Tropfen B/10 ml PBS, Vector, Burlingame) inkubiert und mit PBS gewaschen. Die weitere Bearbeitung einschließlich Gegenfärbung erfolgte wie oben.

3.2.15.5.4. Nachweis von CD4⁺ - und CD8⁺ -T-Zellen

CD4⁺ - und CD8⁺ -T-Zellen wurden in Gefrierschnitten ausgezählt (5 Bioplate). Hierzu wurden Schnitte von tiefgefrorenem Gewebe auf Objektträger verbracht, für 2-3 Stunden luftgetrocknet, mit eiskaltem Azeton fixiert und für 10 Minuten in PBS gelegt. Anschließend erfolgte eine Blockierung der endogenen Oxigenase mit 0,2 % Periodsäure und Inkubation mit 5 %igem Kaninchenserum. Über Nacht wurde bei 4°C mit den primären Antikörpern und Maus IgGs (Tab. 17) inkubiert. Das weitere

Vorgehen entspricht dem oben beschriebenen. Als sekundärer Antikörper wurde ein Rabbit- anti- mouse-biotinylated DAKO in einer Verdünnung von 1:200 verwendet.

Tabelle 17
Für die Immunhistochemie verwendete Anti-Hunde-Antikörper

Anti-Hd-Ak	Hersteller	Klon	Ursprung	Isotyp
CD3	Serotec ¹	MCA1774	Maus	IgG1
CD4	Custom Monoclonals ²	12125	Maus	IgG1
CD8	Custom Monoclonals ²	1140	Maus	IgG1
IgA	Nordic ³		Ziege	IgG
IgG	Nordic ³		Ziege	IgG
IgM	Nordic ³		Ziege	IgG

¹ Serotec, Oxford, UK.

² Custom Monoclonals, Sacramento, CA.

³ Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande

3.2.15.6. Histologische Untersuchung

Zum Transport wurden die Proben in 10 %ige, gepufferte Formalinlösung getaucht, die sich in Greiner-Falkon-Tubes befand. Diese Formalinlösung diente gleichzeitig der Fixation. Anschließend wurden die Proben in Paraffinwachs eingebettet und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Gewebemorphologie wurde von einem Untersucher in vier verschiedene Klassen (Tab. 18) von 0 (normal) bis 3 (schwere Gewebeschäden) eingestuft, wobei der Untersucher die Herkunft der Probe nicht kannte.

3.2.16. Statistische Methoden

Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen berechnet. Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte durch den t-Test (paarweise Mittelwertanalyse, Tab. 23) und den Wilcoxon-Test (Tab. 26-29) mittels Statistical Analysis System Ver. 6.12. (SAS) durch Herrn Dr. Stanglmeier, Institut für Tierzucht. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde dabei als signifikant und von $p < 0,01$ als hochsignifikant angesehen.

Tabelle 18
Klassifizierung der histologischen Befunde der Darmbiopsien
 (ZENTEK et al., 2002)

Klasse	Schweregrad der Veränderung	Histologischer Parameter
		<i>Duodenum</i>
0	normal	-
1	leicht	leichte bis mäßige Infiltration der Lamina propria, normale Zotten, Kryptenstruktur und Enterozyten
2	mäßig	mäßige Infiltration der Lamina propria, vermehrt intraepitheliale Lymphozyten, milde bis mäßige Odematisierung/Fibrosierung der Lamina propria, leichte Zottenatrophie, irreguläre Krypten
3	schwer	schwere diffuse Infiltration der Lamina propria, vermehrt intraepitheliale Lymphozyten, Zottenatrophie, Abflachung des Epithels, Ulzeration, irreguläre Krypten, Hyperplasie Abszesse, Ödeme und Fibrose der Lamina propria
		<i>Colon</i>
0	normal	-
1	leicht	leichte Entzündungsreaktion, normale Mikroarchitektur, leichte Kryptenerweiterung
2	mäßig	mäßige Infiltration mit Entzündungszellen, eventuell fokale Unterbrechung der Mikroarchitektur
3	schwer	schwere Entzündungsreaktion, weitreichende Unterbrechung der Architektur

4. Ergebnisse

4.1. Zusammensetzung des verwendeten Milchaustauschers

Die Zusammensetzung des in den eigenen Untersuchungen verwendeten Milchaustauschers wurde aus Angaben über die Inhaltsstoffe der Zutaten (MEYER und HECKÖTTER, 1986) berechnet (Tab. 19a-d).

Tabelle 19a
Nährstoffgehalt im verwendeten Milchaustauscher

	TS	Ra	Rp	Rfe	NfE	Rfa	BE	vRp	vE	Linol- säure	vRP/ vE
	g	g	g	g	g	g	MJ	g	MJ	g	g/ MJ
	pro 100 g US										
MAT	21,80	1,676	9,562	7,343	3,214	0	0,4945	7,376	0,526	0,672	21,67

Tabelle 19b
Mineralstoffgehalt im verwendeten Milchaustauscher

	Ca	P	Mg	K	Na	Fe	Cu	Zn	Mn	J
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	µg
MAT	241,5	195,9	15,00	140	140	0,9974	0,4368	1,377	0,0211	115,43

Tabelle 19c
Vitamingehalt im verwendeten Milchaustauscher

	A	D3	E	B1	B2	B6	B12	Biotin	Nikotin säure	Pantot. säure	Cholin
	I.E.	I.E.	mg	mg	mg	mg	µg	µg	µg	µg	mg
	Pro 100 g US										
MAT	688	0,0129	14,318	0,1181	1,501	0,9024	2,006	2,006	1,523	1,875	61,92

Tabelle 19d
Aminosäuremuster im verwendeten Milchaustauscher

	Ile	Leu	Lys	Met	Cys	Phe	His	Thr	Trp	Val	Arg
	in g/100g US										
MAT	0,559	1,0028	0,8292	0,277	0,255	0,5197	0,3047	0,4634	0,1724	0,6058	0,4632

4.2. Futtermittelverwertung

Tabelle 20
Futtermittelverwertung

Fütterungsphase	Lactoferrinversuch					Ec. faecium/Lb. rhamnosus-Versuch	
	Lactoferrindosierung in ppm					Kontrolle (n=6)	Probiotikum ² (n=6)
	0 (n ¹ =5)	30 (n=5)	60 (n=4)	60/95 ³ (n=5)	120 (n=4)		
	Futtermittelverwertung in g Futter / g Zunahme <i>Standardabweichung</i>						
Milchaustauscher	3,34 0,76	3,56 1,19	3,32 0,62	3,38 0,50	3,55 0,79	3,70 0,19	3,80 0,25
MAT+ Beifutter	2,74 1,01	2,59 0,62	2,77 0,30	3,23 1,51	2,65 0,41	5,97 0,56	5,58 0,29
Beifutter	2,72 0,61	2,98 1,26	2,75 0,67	2,67 1,94	2,79 0,70	12,46 1,33	12,50 1,10

¹ n=Tierzahl

² Ec. faecium (1×10^8 KbE/ 100 g Futterrockensubstanz)

³ 60 ppm Lactoferrin im Milchaustauscher, 95 ppm Lactoferrin im Beifutter

Die Futtermittelverwertung (Tab. 20) während der ausschließlichen Milchaustauscherfütterung schwankte zwischen 3,32 und 3,80. Im Lactoferrinversuch lässt sich keine einheitliche Verbesserung oder Verschlechterung der Futtermittelverwertung in Abhängigkeit von der Dosierung feststellen. Die mit 30 und 120 ppm Lactoferrin gefütterten Welpen hatten eine schlechtere Futtermittelverwertung als die Kontrollgruppe und die 60- und 60/95 ppm-Gruppe. Eine deutlich schlechtere Futtermittelverwertung hatten die beiden Gruppen des Ec. faecium-Versuchs, wobei die Probiotikumgruppe die schlechteste hatte.

In der MAT/Beifutterperiode war die Futtermittelverwertung im Lactoferrinversuch im Vergleich zur ausschließlichen MAT-Fütterung in jeder Gruppe besser und schwankte zwischen 2,59 und 3,23. Die beste Futtermittelverwertung hatten jetzt die 30- und 120 ppm-Gruppen, die schlechteste die 60/95-ppm-Gruppe. Der Wert im Ec. faecium-Versuch war mit 5,97 und 5,58 mehr als doppelt so hoch wie der der 30-ppm-Gruppe des Lactoferrinversuchs und damit auch deutlich schlechter als während der reinen MAT-Fütterung. Die Probiotikumsgruppe des Ec. faecium-Versuchs hatte jetzt eine bessere Futtermittelverwertung als die Kontrollgruppe. In der reinen Beifutterperiode schwankten die Werte des Lactoferrinversuchs zwischen 2,67 (60/95 ppm) und 2,98 (30 ppm). Die Futtermittelverwertung der beiden Gruppen aus dem

Ec.faecium-Versuch war mit 12,46 und 12,50 nahezu identisch, aber über viermal so hoch wie die des Lactoferrinversuchs und über doppelt so hoch als die der MAT/Beifutterperiode.

4.3. Entwicklung der Welpen

Die durchschnittlichen Geburtsgewichte der Welpen des Lactoferrinversuchs schwankten je nach Gruppe zwischen 265,50 und 314,00 g. Die Verdopplung des Geburtsgewichtes wurde bei den Gruppen 1 und 5 mit 9,06 und 8,92 Tagen erreicht. Die Gruppen 2, 3 und 4 verdoppelten ihr Geburtsgewicht schon mit 4,88-6,80 Tagen. Auch bei der Verdreifachung des Geburtsgewichtes liegen die Gruppen 1 und 5 mit 16,00 und 16,06 Tagen noch deutlich hinter den anderen Gruppen (10,75-14,20 Tage). Die Gruppen 2 und 3 haben ihr Gewicht am schnellsten verdoppelt und verdreifacht (Tab. 21).

Tabelle 21
Durchschnittliches Geburtsgewicht und Zeitpunkte der Verdopplung und Verdreifachung des Geburtsgewichtes sowie der Öffnung der Augen

Gruppe ¹	Geburts- gewicht in g	Tag-3-Gewicht in g	Gewichts- verdopplung an Tag	Gewichts- verdreifachung an Tag	Öffnung der Augen an Tag
<i>Standardabweichung</i>					
1 (n ³ =8)	303,13 22,91	378,49 25,83	9,06 2,51	16,06 4,12	12,63 0,74
2 (n=5)	295,80 10,40	427,60 32,09	5,40 0,65	10,90 1,02	12,80 1,48
3 ² (n=4)	265,50 22,66	407,00 44,25	4,88 0,25	10,75 1,50	12,00 0,82
4 (n=5)	314,00 66,84	452,80 118,40	6,80 1,64	14,20 0,57	13,60 1,34
5 (n=6)	301,67 23,49	381,30 38,47	8,92 1,97	16,00 1,78	13,33 1,30

¹ Gruppe 1: 0 ppm Lactoferrin, Gruppe 2: 30 ppm Lactoferrin, Gruppe 3: 60/95 ppm Lactoferrin, Gruppe 4: 60 ppm Lactoferrin, Gruppe: 120 ppm Lactoferrin, Gruppe 6: Kontrolle, Gruppe 7: Probiotikum (s.o.)

²60 ppm Lactoferrin im Milchaustauscher, 95 ppm Lactoferrin im Beifutter

³n=Tierzahl; der nach vier Wochen ausgefallene Wurf konnte hier auch ausgewertet werden (n=7), dadurch waren 3 Welpen mehr in Gruppe 1 und je 2 mehr in den Gruppen 4 und 5. Die Geburtsgewichte von Gruppe 6+7 sowie von 2 Welpen der Gruppe 4 sind unbekannt. Wenn die Gewichtsverdopplung abends erreicht worden war, der Welpen bis zum nächsten Morgen aber wieder abgenommen hatte, wurde ein halber Tag dazugerechnet, was die „krummen“ Zahlen erklärt.

Zum Zeitpunkt der Aufteilung der Welpen in die Gruppen an Tag 3 lag das Durchschnittsgewicht von Gruppe 1 mit 378,49 g am niedrigsten, das von Gruppe 4 mit 452,80 g am höchsten. Die Gruppen 1 und 5 lagen im Geburtsgewicht sowie im Tag-3-Gewicht nahe beieinander. Die Öffnung der Augen fand bei Gruppe 3 am frühesten (12,00 Tage) und bei Gruppe 4 mit 13,6 Tagen am spätesten statt.

In den eigenen Untersuchungen waren die Hündinnen an Tag 3 im Schnitt über 100 g schwerer als die Rüden und hatten somit 126% des Gewichtes der Rüden. Am Ende des Versuches wogen sie aber über 750 g weniger und damit nur noch 89% des Gewichts der Rüden (Tab. 22)

Tabelle 22
Gewichte von Rüden und Hündinnen zu Beginn und Ende des Versuchs

	Tag 3	Tag 98
Geschlecht (Tierzahl)	Gewicht in g <i>Standardabweichung</i>	
männlich (n=9)	410,08 40,48	7182,75 649,48
weiblich (n=14)	516,55 71,53	6399,23 502,16

Die durchschnittlichen prozentualen Zunahmen der Welpen pro Tag (Tab. 23) nahmen im Vergleich zum Vortag mit zunehmenden Alter insgesamt ab. Die maximale relative Durchschnittszunahme betrug 12,19 % (Tag 5, ohne Probiotikum). Bis Tag 6 liegen Werte noch im zweistelligen Bereich, ab Tag 7 nur noch im einstelligen Bereich und ab Tag 15 liegen alle Werte unter 5 %. Die Streuung ist insgesamt gross und kommt relativ oft an die Größenordnung der Durchschnittswerte heran. Gelegentlich übertrifft sie sogar den Wert der Zunahme (ohne Probiotikum, Tag 12 und 13,). Obwohl eine abnehmende Tendenz gut zu erkennen ist, sind die Werte starken Schwankungen unterworfen, zum Beispiel fällt in der Kontrolle an Tag 12 eine nicht einmal halb so grosse Zunahme wie an Tag 11 auf, die an Tag 13 aber wieder dem Wert von 11 ähnelt. Auch beim Vergleich der Kontrolltiere mit den probiotisch gefütterten Welpen können aufgrund der starken Schwankungen keine wesentlichen Unterschiede entdeckt werden. Signifikanzniveau ($p < 0,05$) wurde nur an Tag 14 erreicht.

Tabelle 23
**Durchschnittliche Zunahmen der Welpen pro Tag
bei Milchaustauscherfütterung mit bzw. ohne Zusatz probiotisch wirksamer
Substanzen¹**

Alter in Tagen	Mutterlose Aufzucht		
	Milchaustauscher ohne Probiotikum (n ² =14)	Milchaustauscher mit Probiotikum (n=28)	Milchaustauscher mit und ohne Probiotikum (n=42)
	Zunahmen in % des Gewichtes des Vortages ± Standardabweichung		
4	8,18 ± 6,48	9,24 ± 6,13	8,87 ± 6,19
5	12,19 ± 5,55	9,09 ± 4,63	10,49 ± 5,04
6	8,96 ± 4,07	10,16 ± 5,13	10,12 ± 4,83
7	9,70 ± 6,03	7,49 ± 5,39	8,51 ± 5,60
8	5,50 ± 6,40	5,79 ± 2,53	5,81 ± 4,16
9	6,62 ± 2,58	7,10 ± 2,62	6,91 ± 2,58
10	5,02 ± 2,55	4,60 ± 3,94	4,88 ± 3,51
11	8,65 ± 4,48	7,78 ± 4,03	8,39 ± 4,13
12	3,52 ± 10,80	5,12 ± 3,52	4,60 ± 6,76
13	8,80 ± 14,36	5,01 ± 2,82	6,34 ± 8,59
14	6,33 ± 3,10	5,46 ± 3,71	5,81 ± 3,50
15	4,79 ± 4,86	4,39 ± 3,06	4,75 ± 3,70
16	3,98 ± 2,69	4,74 ± 2,68	4,55 ± 2,68
17	3,23 ± 2,17	4,18 ± 3,26	3,95 ± 2,96
18	4,50 ± 1,97	3,81 ± 2,04	4,10 ± 2,01
19	3,73 ± 2,19	4,62 ± 2,81	4,44 ± 2,64
20	3,69 ± 1,51	3,51 ± 2,44	3,72 ± 2,16

¹ genau genommen handelt es sich um ein Pro- und ein Präbiotikum: Ec.faecium (6 Welpen), Lactoferrin (22 Welpen, s.o.)

²n=Tierzahl

Nach KIENZLE et al. (1985) nehmen Welpen aus größeren Würfen trotz der geringeren Milchleistung der Hündin bezogen auf das KGW etwa gleich grosse Milchmengen auf wie Welpen aus kleineren Würfen, da mit zunehmender Wurfgröße nicht nur die Milchmengenleistung pro Welpen, sondern auch das relative Geburtsgewicht abfällt. Jetzt stellt sich die Frage, ob Welpen aus größeren Würfen bei der mutterlosen Aufzucht im Vergleich zu Welpen aus kleineren Würfen relativ besser zunehmen, da die Milchmengenleistung pro Welpen als beeinflussender Faktor wegfällt. Tab. 24 zeigt die durchschnittlichen Zunahmen der Würfe des Lactoferrinversuchs zwischen Tag 3 und Tag 8 sowie die prozentualen Zunahmen in dieser Zeit.

Tabelle 24
Durchschnittliche Zunahmen von Welpen aus kleinen und grossen Würfen

Wurf	Wurfgrösse*	Geburtsgewicht (Durchschnitt)	Durchschnittsgewicht an Tag 3	Durchschnittsgewicht an Tag 8	Zunahme in % (Tag 3-8)
4	3	-	527,5	677,5	28,4
2	5	306,8	367,5	465	26,5
5	5	334,4	504,4	747,6	48,2
1	6	314,8	399,4	630,2	57,8
3	8	278,4	367,5	644,7	75,4

* Es wurden die fünf Würfe des Lactoferrinversuchs ausgewertet, wobei zu beachten ist, dass die Wurfgrösse einschließlich des/der bei der Mutter belassenen Welpen angegeben wurde, das durchschnittliche Geburtsgewicht und die Zunahmen jedoch nur von den Welpen berechnet wurde, die in den Versuch eingingen)

Tab. 24 zeigt, dass die Welpen des kleinsten Wurfes mit 28,4 % die kleinste relative Zunahme aufwiesen. Mit Ausnahme von Wurf 2 zeigten die Welpen mit zunehmender Wurfgrösse größere relative Zunahmen. Der grösste Wurf hatte mit 75,4 % die grösste relative Zunahme erreicht. Beim Betrachten der absoluten Gewichte an Tag 8 fällt auf, dass die Welpen des grössten Wurfes nur noch 33 Gramm leichter waren als die Welpen des kleinsten Wurfes. Die Differenz an Tag 3 betrug dagegen noch 160 Gramm.

Zur Bestätigung und weiteren Veranschaulichung des oben genannten Einflusses der zur Verfügung stehenden Milchmenge werden die Zunahmen in Tab. 25 statt indirekt über die Wurfgrösse direkt auf das Gewicht der Welpen bezogen. Hierzu wurden die 10 zum Zeitpunkt der Geburt leichtesten bzw. schwersten Welpen zusammengefasst und die Zunahmen in den ersten vier Wochen verglichen (Tab. 25).

Tabelle 25
**Gewichtsentwicklung
von Welpen mit geringem und hohem Geburtsgewicht**

	Geburtsgewicht	Zunahme Woche 1	Zunahme Woche 2	Zunahme Woche 3	Zunahme Woche 4
		in % des Gewichtes der vorherigen Woche			
<i>Standardabweichung</i>					
10 leichteste Welpen	261,3 <i>16,86</i>	102,8 <i>18,61</i>	54,72 <i>13,82</i>	28,80 <i>6,40</i>	27,05 <i>3,17</i>
10 schwerste Welpen	340,0 <i>25,90</i>	95,02 <i>34,37</i>	47,10 <i>9,17</i>	33,23 <i>9,04</i>	28,76 <i>13,53</i>

Aus Tab. 25 geht hervor, dass das durchschnittliche Geburtsgewicht der schweren Welpen mit 340,0 g um 78,7 g bzw. 30,1 % höher liegt als das der leichten Welpen. Die relativen Zunahmen in der ersten Woche liegen bei den leichten Welpen um 7,78 Prozentpunkte höher als bei den schweren Welpen. In der zweiten Woche beträgt der Unterschied noch 7,62 Prozentpunkte. In der dritten und vierten Woche wiesen wiederum die schweren Welpen höhere prozentuale Zunahmen auf.

4.4. Blut

4.4.1. Rotes Blutbild

Tabelle 26
Rotes Blutbild von Welpen*
bei unterschiedlicher Haltungform und Fütterung**

	Erythrozytenzahl (10 ⁹ /ml)		Hämatokrit %		Hämoglobin (mmol/l)	
	<i>Standardabweichung</i>		<i>Standardabweichung</i>		<i>Standardabweichung</i>	
	Lactoferrin- versuch	Ec.faecium/ Lb.rhamno- sus-Versuch	Lactoferrin- versuch	Ec.faecium/ Lb.rhamno- sus-Versuch	Lactoferrin- versuch	Ec.faecium/ Lb.rhamno- sus-Versuch
Woche 4	4,09 <i>0,30</i>	4,87 <i>0,15</i>	25,88 <i>1,16</i>	28,77 <i>1,84</i>	5,10 <i>0,32</i>	5,73 <i>0,46</i>
Woche 8	5,20 <i>0,26</i>	6,11 <i>0,56</i>	33,44 <i>1,68</i>	33,18 <i>3,22</i>	7,03 <i>0,39</i>	6,61 <i>0,64</i>
Woche 10	5,87 <i>0,46</i>	6,47 <i>0,47</i>	36,50 <i>2,70</i>	37,25 <i>3,12</i>	7,93 <i>0,61</i>	7,81 <i>0,68</i>
Woche 12	6,05 <i>0,28</i>	6,54 <i>0,27</i>	37,52 <i>1,47</i>	38,77 <i>0,89</i>	8,30 <i>0,21</i>	8,25 <i>0,20</i>
Woche 14	5,95 <i>0,30</i>	6,51 <i>0,32</i>	37,40 <i>1,86</i>	38,65 <i>2,14</i>	8,23 <i>0,40</i>	8,35 <i>0,37</i>

*um Einflüsse der Probiotika auf die Ergebnisse zu vermeiden, wurden nur die Tiere der Kontrollgruppen des Lactoferrinversuchs und des Ec.faecium-Versuchs verglichen

**Haltungform und Fütterung siehe „Material und Methoden“

Die Erythrozytenzahl (Tab. 26) der Welpen aus den Kontrollgruppen beider Versuche nahm mit zunehmendem Alter bis Woche 12 kontinuierlich zu. Von Woche 12 bis Woche 14 war eine geringe Abnahme zu verzeichnen. Die grösste Vermehrung der Erythrozyten um $1,11 \times 10^9$ und $1,24 \times 10^9$ bzw. 27,1% und 25,5% fand zwischen Woche 4 und 8 statt. Während der gesamten Versuchszeit lag die Erythrozytenzahl der Welpen des Ec.faecium-Versuchs um ca. $0,5-1 \times 10^9$ /ml bzw. 8,1-17,5% über der der Welpen des Lactoferrinversuchs. Dabei war der Unterschied in Woche 1

hochsignifikant ($p < 0,01$) und in den Wochen 2 und 4 signifikant ($p < 0,05$). Die Streuung der Einzelwerte war mit maximal 0,56 gering.

Ebenso wie die Erythrozytenzahl stieg auch der Hämatokrit (Tab. 26) bei beiden Gruppen bis zur 12. Woche kontinuierlich an und nahm dann in Woche 14 geringfügig ab. Der grösste Sprung war mit 7,56 und 4,41 Prozentpunkten ebenfalls zwischen Woche 4 und Woche 8 zu verzeichnen. Der Hämatokrit lag mit Ausnahme der Woche 8 ebenfalls bei den Welpen des *Ec.faecium*-Versuchs höher als bei denen des Lactoferrinversuchs und erreichte in Woche 4 Signifikanzniveau ($p < 0,05$). Zu den anderen Zeitpunkten waren die Unterschiede nicht signifikant, die Differenz schwankte zwischen $-0,26$ und 2,89 Prozentpunkten. Die Streuung der Einzelwerte war mit maximal 3,22 wiederum gering.

Der Hämoglobingehalt (Tab. 26) nahm mit dem Alter ebenfalls kontinuierlich zu. Eine minimale Abnahme war nur bei Versuch zwischen Woche 12 und 14 zu beobachten. Die Werte schwankten im Lactoferrinversuch zwischen 5,10 und 8,30, beim *Ec.faecium*-Versuch zwischen 5,73 und 8,35 mmol/l. In Woche 4 wiesen die Welpen aus dem *Ec.faecium*-Versuch einen signifikant höheren Hämoglobingehalt auf als die Welpen des Lactoferrinversuchs, die Unterschiede der anderen Entnahmen waren nicht signifikant. Wiederum fand die grösste Zunahme zwischen Woche 4 und 8 statt. Die Streuung war mit maximal 0,68 gering.

Das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV, Tab. 27) im Untersuchungszeitraum schwankte bei Lactoferrinversuch zwischen 61,98 und 64,34 fl, es fand keine kontinuierliche Entwicklung statt. Die Streuung war in Woche vier mit 4,36 höher als zu den späteren Entnahmezeitpunkten, wo sie zwischen 1,11 und 2,53 lag.

Die Erythrozyten der Welpen des *Ec.faecium*-Versuchs waren deutlich kleiner. Das mittlere korpuskuläre Volumen schwankte in dieser Gruppe zwischen 54,30 und 61,55, im Lactoferrinversuch dagegen zwischen 61,98 und 64,34. Im *Ec.faecium*-Versuch war ab Woche 8 eine kontinuierliche Volumenzunahme zu verzeichnen, zwischen Woche 4 und 8 nahm das Volumen um 8,16 % ab. Bis Woche 14 glich sich der Wert an das Niveau der Gruppe 1 an.

Der mittlere Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (MCH, Tab. 27) nahm in Lactoferrinversuch zwischen Woche 4 und 8 deutlich zu, stieg danach aber nur noch minimal. Im *Ec.faecium*-Versuch sank der Wert zwischen Woche 4 und 8 und stieg danach kontinuierlich und relativ stärker an als in Lactoferrinversuch. Alle Werte des *Ec.faecium*-Versuchs lagen unter denen von Lactoferrinversuch. Besonders auffallend war der niedrige Wert des *Ec.faecium*-Versuchs in Woche 8 von 1,08 fmol, der um 23% unter dem Wert aus Lactoferrinversuch von 1,35 fmol lag. In Woche 14 entsprachen sich die Werte nahezu. Die Streuung war in beiden Versuchen gering.

Die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC, Tab. 27) stieg in beiden Versuchen im Beobachtungszeitraum, eine einzige minimale Abnahme war in Lactoferrinversuch in Woche 14 zu sehen. Die Werte lagen in beiden Versuchen sehr nahe beieinander und blieben trotz tendenziellem Anstieg in der gleichen Größenordnung, nämlich zwischen 19,74 und 22,16. Mit Ausnahme der Woche 4 lagen die Werte des Lactoferrinversuch über denen des *Ec.faecium*-Versuchs, die Unterschiede waren aber mit maximal 1,39 mmol/l in Woche 10 nicht sehr gross.

Tabelle 27
Erythrozytenindices von Welpen*
bei unterschiedlicher Haltungform und Fütterung**

	MCV (fl) <i>Standardabweichung</i>		MCH (fmol) <i>Standardabweichung</i>		MCHC (mmol/l) <i>Standardabweichung</i>	
	Lactoferrin- versuch	<i>Ec.faecium</i> / Lb.rhamno- sus-Versuch	Lactoferrin- versuch	<i>Ec.faecium</i> / Lb.rhamno- sus-Versuch	Lactoferrin- versuch	<i>Ec.faecium</i> / Lb.rhamno- sus-Versuch
Woche 4	63,48 4,36	59,18 4,26	1,26 0,13	1,18 0,11	19,74 0,81	19,87 0,91
Woche 8	64,34 1,11	54,30 2,31	1,35 0,03	1,08 0,07	21,00 0,14	19,95 1,49
Woche 10	62,18 1,28	57,60 2,39	1,35 0,03	1,21 0,06	21,72 0,19	20,33 0,20
Woche 12	61,98 1,65	59,38 2,53	1,37 0,05	1,27 0,06	22,16 0,37	21,28 0,27
Woche 14	62,80 1,12	61,55 1,59	1,38 0,03	1,33 0,66	22,02 0,11	21,93 0,27

*um Einflüsse der Probiotika auf die Ergebnisse zu vermeiden, wurden nur die Tiere der Kontrollgruppen des Lactoferrinversuchs und des *Ec.faecium*-Versuchs verglichen

**Haltungform und Fütterung siehe „Material und Methoden“

4.4.2. Weißes Blutbild

Tabelle 28

Anzahl an Leukozyten, Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten im Blut von Welpen bei unterschiedlicher Haltungform und Fütterung

	Leukozyten (10^9 /L) Standardabweichung		Neutrophile (10^9 /L) Standardabweichung		Lymphozyten (10^9 /L) Standardabweichung	
	Lactoferrinversuch	Ec.faecium/ Lb.rhamnosus-Versuch	Lactoferrinversuch	Ec.faecium/ Lb.rhamnosus-Versuch	Lactoferrinversuch	Ec.faecium/ Lb.rhamnosus-Versuch
Woche 4	12,16 2,38	12,58 3,17	5,74 0,95	5,92 2,07	5,14 2,19	5,47 1,25
Woche 8	19,20 6,99	11,04 3,24	10,61 4,42	5,42 1,55	7,21 8,19	4,43 1,61
Woche 10	14,77 3,46	11,73 2,15	7,19 1,30	5,80 1,86	5,95 3,15	5,00 1,76
Woche 12	15,18 4,68	11,45 1,80	6,99 1,60	5,43 0,79	6,65 3,81	5,28 1,12
Woche 14	15,90 4,56	12,39 2,20	9,39 3,47	5,71 0,80	4,84 2,21	5,87 1,31

*um Einflüsse der Probiotika auf die Ergebnisse zu vermeiden, wurden nur die Tiere der Kontrollgruppen des Lactoferrinversuchs und des Ec.faecium-Versuchs verglichen

**Haltungform und Fütterung siehe „Material und Methoden“

Die Leukozytenzahlen (Tab. 28) der beiden Kontrollgruppen lagen im Beobachtungszeitraum zwischen 12,16 und 19,20 (Lactoferrinversuch) bzw. 11,04 und 12,58 $\times 10^9$ Leukozyten/L (Ec.faecium-Versuch). Die Werte des Ec.faecium-Versuchs schwankten im Gegensatz zu denen aus Lactoferrinversuch in engem Bereich. Auch die Streuung war im Ec.faecium-Versuch niedriger und konstanter als in Lactoferrinversuch. In Woche 4 waren die Werte beider Versuche nahezu gleich gross. In Woche 8 ist jedoch ein deutlicher Unterschied zu sehen. So hatten die Welpen aus Lactoferrinversuch $8,16 \times 10^9$ Leukozyten/L (bzw. 73,9 %) mehr als die aus Ec.faecium-Versuch. Dieser Unterschied war in den nächsten Wochen nicht mehr ganz so gross, aber immer noch sehr deutlich, auch in den Wochen 10, 12 und 14 lagen die Werte des Lactoferrinversuchs noch bis zu $3,73 \times 10^9$ /L höher als die des Ec.faecium-Versuchs, in Woche 10 war der Unterschied sogar signifikant ($p < 0,05$).

Auch bei den Neutrophilen Granulozyten (Tab. 28) fiel die relative Konstanz der Werte im Ec.faecium-Versuch auf. Der niedrigste Wert lag bei 5,42, der höchste bei $5,92 \times 10^9$ /L. Der Wert aus Woche 4 war mit dem aus Lactoferrinversuch vergleichbar. Dagegen lag die Neutrophilenzahl der achtwöchigen Welpen aus dem

Lactoferrinversuch doppelt so hoch wie die der Welpen des Ec.faecium-Versuchs. Im weiteren Verlauf waren die Werte aus Lactoferrinversuch Schwankungen unterworfen, lagen aber immer deutlich, in Woche 14 sogar signifikant, über denen des Ec.faecium-Versuchs. Die Streuung in Lactoferrinversuch war ähnlich inkonstant wie die Neutrophilenzahlen.

Auch die Lymphozytenzahlen (Tab. 28) beider Versuche ähnelten sich in der vierten Woche. Wiederum waren die Werte des Ec.faecium-Versuchs über die Versuchsperiode relativ konstant und lagen zwischen $4,43$ und $5,87 \times 10^9/L$, wogegen die Werte aus Lactoferrinversuch stärkeren Schwankungen unterworfen waren und zwischen $4,84$ und $7,21 \times 10^9/L$ lagen. Die Streuung war wiederum in Lactoferrinversuch deutlich höher und selbst größeren Schwankungen unterworfen.

Tabelle 29

Anzahl an Monozyten, Eosinophilen und Basophilen Granulozyten im Blut von Welpen bei unterschiedlicher Haltungform und Fütterung

Alter der Welpen	Monozyten ($10^9/L$) Standardabweichung		Eosinophile ($10^9/L$) Standardabweichung		Basophile ($10^9/L$) Standardabweichung	
	Lactoferrinversuch	Ec.faecium/ Lb.rhamnosus-Versuch	Lactoferrinversuch	Ec.faecium/ Lb.rhamnosus-Versuch	Lactoferrinversuch	Ec.faecium/ Lb.rhamnosus-Versuch
Woche 4	1,22 0,30	1,05 0,25	0,010 0,010	0,012 0,017	0,076 0,118	0,129 0,066
Woche 8	1,28 0,30	1,01 0,25	0,007 0,006	0,029 0,061	0,118 0,092	0,160 0,109
Woche 10	1,95 0,60	0,78 0,41	0,004 0,003	0,079 0,180	0,067 0,050	0,077 0,059
Woche 12	1,51 0,37	0,65 0,30	0,004 0,003	0,061 0,127	0,045 0,013	0,049 0,042
Woche 14	1,54 0,39	0,76 0,43	0,014 0,021	0,006 0,006	0,099 0,086	0,048 0,030

*um Einflüsse der Probiotika auf die Ergebnisse zu vermeiden, wurden nur die Tiere der Kontrollgruppen des Lactoferrinversuchs und des Ec.faecium-Versuchs verglichen

**Haltungform und Fütterung siehe „Material und Methoden“

Die Monozytenzahlen (Tab. 29) im Lactoferrinversuch lagen zwischen $1,22$ und $1,95 \times 10^9/L$, die im Ec.faecium-Versuch zwischen $0,65$ und $1,05 \times 10^9/L$, also hatten die Welpen des Ec.faecium-Versuchs zu allen Entnahmezeitpunkten weniger Monozyten als die des Lactoferrinversuchs. Die Werte des Lactoferrinversuchs nahmen außer im Intervall Woche 10/Woche 12 zu, während die Werte des Ec.faecium-Versuchs

außer im Intervall Woche 12/Woche 14 abnehmen. Aufgrund der unregelmäßigen Zu- und Abnahmen lässt sich daraus jedoch keine eindeutige Tendenz ablesen.

Die eosinophilen Granulozyten (Tab. 29) waren bei den Welpen des *Ec.faecium*-Versuchs außer in Woche 14 zahlreicher. In Woche 4 war der Unterschied noch gering, in den Wochen 8,10 und 12 jedoch deutlich erkennbar. Besonders auffällig war die Eosinophilenzahl des *Ec.faecium*-Versuchs in Woche 10, die ca. 18 mal höher war als im Lactoferrinversuch. Die Streuung im *Ec.faecium*-Versuch wies einen ähnlichen Verlauf auf, besonders hohe Werte fanden sich in den Wochen 8,10 und 12 im *Ec.faecium*-Versuch, die über doppelt so gross waren wie die gemessenen Eosinophilenzahlen.

Die Welpen des Lactoferrinversuchs wiesen zu den Entnahmezeitpunkten zwischen $0,045$ und $0,118 \times 10^9$ /L, die des *Ec.faecium*-Versuchs zwischen $0,048$ und $0,160 \times 10^9$ /L Basophile Granulozyten (Tab. 29) auf. Die Zahlen sind Schwankungen unterworfen, es lässt sich keine eindeutige Tendenz feststellen. Die Streuung war meist annähernd so gross wie die Basophilenzahl, in Woche 4 überstieg sie diese im Lactoferrinversuch sogar deutlich.

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methode

5.1.1. Versuchsplan

5.1.1.1. Versuchsdauer

Um sicherzugehen, dass die Effekte der Probiotika sich voll entwickeln können, umfasste die Versuchsdauer die komplette Saug- und Absatzphase. Die Welpen wurden in drei verschiedenen Fütterungsphasen (nur Milchaustauscher, Milchaustauscher und Beifutter, nur Beifutter) beobachtet. Die Festlegung der Versuchsdauer auf genau 14 Wochen begründet sich damit, dass die Immunisierung in der 8. und 12. Woche stattfindet und der Antikörperspiegel nach der zweiten Immunisierung noch einmal gemessen werden sollte.

5.1.1.2. Versuchstiere

Für den Zeitpunkt des Absetzens von der Mutter wurde das Alter von drei Tagen festgelegt, damit die Welpen ausreichend Kolostrum aufnehmen konnten. MEIXNER (1968) hatte nämlich einen deutlichen Zusammenhang der Mortalitätsrate mutterlos aufzogener Welpen mit dem Alter der Welpen, in dem sie vom Muttertier getrennt wurden, festgestellt. In seinen Untersuchungen starb kein einziger von 50 Welpen, die nach dem 3. Lebenstag auf Ersatzmilch umgestellt wurden. Im Gegensatz dazu starben in seinen Untersuchungen 17,6 % der 74 mutterlos aufgezogenen Welpen, die in den ersten drei Tagen keine Muttermilch bekamen. Es gibt keine Alternative zur Kolostrumaufnahme, die dem Welpen einen ähnlich guten Schutz geben könnte (BOUCHARD et al., 1992; POFFENBARGER et al., 1991). Nach TIZARD (2000) ist die Darmschranke nach ca. 24 h zwar praktisch nicht mehr durchgängig, jedoch wirken die Antikörper und andere Abwehrfaktoren im Kolostrum auch lokal. Außerdem wird durch die Kolostrumaufnahme der Vitamin-A-Gehalt der Leber erhöht

(MEYER et al., 1985) und das Wachstum der Darmmucosa stimuliert (HEIRD et al., 1984).

Die Anzahl der bei der Mutter belassenen Welpen (0-2) richtete sich nach dem Willen der Besitzer der Hündinnen. So blieben jeweils zwei Welpen pro Wurf bei den Mutterhündinnen der GSF, einer bei den Hündinnen des OWF und keiner bei den Hündinnen der Gynäkologischen Tierklinik München. Bei keiner Hündin traten Mastitisprobleme auf. Die Hündinnen, bei denen kein Welpe blieb, bekamen zur Unterdrückung der Milchsekretion Galastop® injiziert.

Nach HOSKINS (1995) sollten Welpen wegen der Gefahr von Verhaltensstörungen nicht vor 6 Wochen völlig von der Mutter getrennt werden. Für die Durchführung dieses Versuches war das nicht möglich. Der subjektive Eindruck der betreuenden Doktoranden war, dass die Welpen des Lactoferrinversuchs sich im Verhalten nicht von normalen Hunden unterschieden. Die Welpen des GSF-Versuchs (Ec.faecium-Versuch), die deutlich isolierter gehalten wurden, obwohl sich die Doktoranden auch außerhalb der Fütterungen viel Zeit für die Sozialisierung nahmen, zeigten vermehrt Harnabsatz als Verhalten der Unterwürfigkeit. Genaue Verhaltensuntersuchungen sind in der Dissertation von Jeanette Haug (München, 2003) nachzulesen.

5.1.1.3. Versuchsgruppen und Standardisierung

Alle 12 im GSF-Versuch verwendeten Tiere stammten durchweg von Hündinnen und Rüden aus der GSF. Für den OWF-Versuch wurden Mutterhündinnen und Rüden aus verschiedenen Institutionen (GSF, OWF, Gynäkologische Tierklinik) eingesetzt, um die deutlich höhere Anzahl an Versuchstieren zu erreichen. Die Geschlechterverteilung in Kontroll- und Probiotikumsgruppe des GSF-Versuchs war ausgewogen, im OWF-Versuch dagegen waren die Hündinnen überrepräsentiert. Die Haltungsbedingungen in der GSF waren absolut identisch, im OWF variierten sie aus technischen Gründen. So wurden aus Platzmangel Abferkelboxen, Pferdeboxen und Hundeställe benutzt. Ab November wurden die neugeborenen Welpen wegen der Aussentemperaturen in Kisten in einem gut beheizten Zimmer des Instituts solange aufgezogen, bis sie aus Platzgründen in die Ställe verbracht wurden. Auch die

Aufteilung der Würfe auf die beiden Gruppen des GSF-Versuchs waren bis auf zwei Würfe, von denen je nur zwei Welpen in den Versuch eingingen und somit nicht getrennt werden konnten, optimal. Zusammenfassend ist also die Standardisierung des *Ec. faecium*-Versuchs (GSF) besser gelungen als des Lactoferrin-Versuchs (OWF). Neben dem Zufall (Geschlechterverteilung und Anzahl der Welpen der einzelnen Würfe) waren technische Gründe (eingeschränkte Räumlichkeiten) und die größere Anzahl der Gruppen und der benötigten Welpen (Aufteilung der Würfe auf die Gruppen, Herkunft der Welpen) dafür verantwortlich. Im OWF-Versuch muss deshalb mit größeren Einflüssen durch Genetik und Geschlecht gerechnet werden als im GSF-Versuch. Außerdem können unterschiedliche Einflüsse auf die Immunologie und die Mikrobiologie aufgrund der variierenden Haltungsbedingungen beim OWF-Versuch nicht ausgeschlossen werden.

5.1.2. Fütterung

5.1.2.1. Dosierung der probiotischen Substanzen

Die im Lactoferrinversuch verwendeten Dosierungen lagen im Vergleich zu den bisher bei anderen Tierarten verwendeten Größenordnungen relativ niedrig. So supplementierten TERAGUCHI et al. (1995) an Mäuse verfütterte Milch mit 0, 0,5, 1 und 2 % bovinem Lactoferrin (bLF) und beobachteten einen dosisabhängigen bakteriostatischen Effekt des bLF gegen Enterobacteriaceae, sowie eine Tendenz, Darmbakterien außer Bifidobakterien in ihrer Anzahl zu reduzieren. LEE et al. (1998) verwendeten bei Ferkeln eine Dosierung von 2 % und konnten damit eine signifikant verringerte Mortalität bei der Konfrontation mit Endotoxinen erzielen. Ob im Lactoferrinversuch mit höheren Dosierungen größere Effekte erzielt werden können hätten, bleibt noch zu untersuchen.

Die Dosierung des Probiotikums orientierte sich mit einer Konzentration an *Ec. faecium* von 1×10^8 KbE / 100g Futter-TS an MOLITOR (1996), der die Wirkung von *Ec. faecium* auf adulte Hunde und früh abgesetzte Hundewelpen in einer Dosierung von 10^6 bzw. 10^7 KbE/ g Futter untersuchte und an PASUPATHY et al. (2001), die in

ihren Untersuchungen an 10-wöchigen Welpen eine Dosierung von 10^7 KbE eines *Lactobacillus acidophilus* Stammes verwendeten. Da eine kompetitive Ansiedlung der Lactobacillen im Magen-Darm-Trakt mit dieser Dosierung nachgewiesen werden konnte, wurde für den *Ec.faecium*-Versuch eine Dosierung in derselben Größenordnung gewählt.

Deutlich höhere Dosierungen verwendeten WEESE und ANDERSON (2002) in ihren Untersuchungen. Sie verabreichten *Lactobacillus rhamnosus* GG in den Dosierungen 1×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} und 5×10^{11} KbE pro Tag an Beagles. Bei allen Versuchsgruppen konnten viable *Lb. rhamnosus* GG im Kot nachgewiesen werden, in der am höchsten dosierten Gruppe sogar signifikant mehr als in anderen Gruppen. Allerdings konnten sich die Bakterien ebenfalls nicht dauerhaft im Darm ansiedeln. Im Coloninhalt sind 10^{11} Bakterien pro Gramm enthalten (CRITTENDEN, 1999), was zum Vergleich der schon vorhandenen und verabreichten Mengen an Bakterien dienen kann.

Bei der Verabreichung von Präbiotika konnten ROBERFROID et al. (1998) keine Beziehung zwischen der Vermehrung der Bifidobakterien und der verabreichten Dosis an (präbiotischen) Fructooligosacchariden feststellen. Jedoch scheint es eine antiproportionale Beziehung zu geben zwischen der Anzahl an Bifidobakterien vor der Verabreichung des Präbiotikums und der Höhe des Anstiegs der Bifidobakterienzahl, die durch das Präbiotikum hervorgerufen wurde. Es sieht also so aus, als ob die Verabreichung eines Präbiotikums an ein Individuum, das bereits eine grosse Population an Bifidobakterien hat, nicht unbedingt zur Vermehrung dieser Bakterienart führt.

Die Angaben der Dosierung sind wichtig zum Vergleich und zur Nachvollziehbarkeit der Untersuchung. Das getestete Produkt muss standardisiert und definiert, die Anzahl aller lebenden Organismen angegeben und der Bakterienstamm identifiziert sein, da nicht anzunehmen ist, dass beispielsweise alle Stämme von *Lactobacillus acidophilus* dieselben Wirkungen haben (HAMILTON-MILLER, 1999; SALMINEN et al., 1996). Bisher gibt es keine Studien, die die minimale wirksame Dosis von Probiotika bestimmt hätten. LEE und SALMINEN (1995) haben eine Aufnahme von 10^6 bis 10^9 lebenden Organismen pro Tag vorgeschlagen.

5.1.2.2. Darreichungsform der probiotischen Substanzen

Mehrere Möglichkeiten der Applikationsform von probiotischen Substanzen stehen zur Verfügung. So können sie in das Futter eingearbeitet, darübergestreut oder separat verabreicht werden. Durch die direkte orale Verabreichung des Produktes ist nicht gewährleistet, dass die zugesetzten Keime den Verdauungstrakt zeitgleich mit dem Futter passieren. Die Einarbeitung ins Futter hat zwar den Vorteil der optimalen Verteilung, jedoch werden die Keime einer thermischen und mechanischen Belastung beim Mischen und Pelletieren ausgesetzt, die die Anzahl der vermehrungsfähigen Keime unter Umständen reduzieren kann. In einer Studie über die Formulierung von Probiotika untersuchten BOURGE et al. (1998) die Kinetik und Überlebensdauer eines in Trockenfutter eingemischten *Bacillus*-Stammes bei der Verabreichung an Hunde. Sie stellten fest, dass die Einmischung vor dem Trocknungsprozess dem Probiotikum schadete – obwohl die Sporenform verwendet worden war, hatten über 99 % davon diesen Prozess nicht überstanden. Ein deutlich besseres Ergebnis von nur 40 % Verlust konnte erreicht werden, indem das Trockenfutter mit dem Probiotikum überzogen wurde. Die Aufbewahrung des Futters über ein Jahr ging mit weiteren 25 % Verlust einher. Aus diesen Studien geht zwar hervor, dass die Applikation von Probiotika über Trockenfutter möglich ist, ebenfalls zeigt sie aber, dass die Menge des eingemischten Probiotikums nicht gleichzusetzen ist mit der Dosierung, die schließlich im Tier ankommt. Im Lactoferrinversuch wurde das Lactoferrin eingemischt, um eine optimale Verteilung und eine genaue Dosierung zu erreichen. So konnten bei fünf unterschiedlichen Dosierungen genaue Dosis-Wirkungsdaten evaluiert werden. Da es sich bei der probiotischen Substanz nicht um vermehrungsfähige Keime handelt, ist die thermische Belastung beim Herstellungsprozess nicht so gravierend wie beim *Ec.faecium*-Versuch. In diesem war eine exakte Verteilung des Probiotikums nicht von so grosser Bedeutung, da es nur eine Versuchsgruppe gab, die nicht mit anders dosierten Gruppen verglichen werden sollte. Durch Aufstreuen des Probiotikums auf das Futter unmittelbar vor der Fütterung wurde trotzdem versucht, eine möglichst gute Verteilung zu erreichen.

Die Art der Applikation der probiotischen Substanzen bleibt dem Untersucher überlassen. Vor und Nachteile hinsichtlich gleichmäßiger Verteilung, zeitgleicher Darmpassage, Überlebensfähigkeit der Substanzen und Praktikabilität sind abzuwägen.

5.1.2.3. Eignung des eingesetzten Milchaustauschers

Aus praktischen Gründen wurde selbst hergestellter Milchersatz verwendet, weil die Zutaten zu jeder Zeit überall erhältlich sind. Die Mineralstoffmischung wurde einmal in grossen Mengen (ca. 1 kg pro Gruppe) hergestellt und war somit immer vorrätig.

Zur Feststellung, inwiefern sich der verwendete Milchaustauscher für die mutterlose Aufzucht eignet, muss die Zusammensetzung mit der der Muttermilch verglichen werden. Die sich ändernde Zusammensetzung der Muttermilch in den ersten Wochen bereitet in dieser Hinsicht Schwierigkeiten. So steigen die Gehalte an Calcium und Phosphor in der Muttermilch während der ersten vier Wochen kontinuierlich an, wobei durch einen relativ stärkeren Ca-Anstieg das Ca:P-Verhältnis im Laufe der Laktation etwas weiter wird. Der Natriumgehalt geht etwas zurück, die Gehalte an Magnesium und Kalium ändern sich kaum. Da Welpen in den ersten beiden Wochen vor allem einen Zuwachs an Weichgeweben aufweisen, in den nächsten beiden Wochen jedoch vor allem das Skelettwachstum forciert wird (MEYER et al., 1981), ist es wohl ratsam, den Calcium- und Phosphoranteil im Milchaustauscher eher dem der Muttermilch in der 3.-4. Laktationswoche (MEYER und ZENTEK, 1998) anzupassen. Der in den eigenen Untersuchungen verwendete Milchaustauscher kommt der Muttermilch in dieser Hinsicht recht nahe. Auch die Gehalte an Magnesium, Natrium und Kalium sind ähnlich hoch wie die der Muttermilch. MUNDT (1989) hält einen Milchaustauscher mit sich ändernder Zusammensetzung, unter anderem mit einer auf das Alter der Welpen bezogenen Abstufung der Kalzium- und Phosphatgehalte, für optimal, jedoch nicht für zwingend erforderlich. Wenn als Mineralzusatz auf handelsübliche vitaminisierte Ergänzungsfuttermittel zurückgegriffen wird, die ja nicht für das Einmischen in Milchaustauscher konzipiert sind, stellt die Löslichkeit der zugesetzten Mineralstoffe einen kritischen Punkt dar. Da diese Mischungen aber praktisch und überall erhältlich sind, sind sie trotzdem zu empfehlen. Vor dem Portionieren oder Verfüttern sollten

sedimentierte Mineralstoffe aber aufgerührt werden. Bei sehr häufiger Indikation zur mutterlosen Aufzucht ist die Berechnung und Herstellung einer speziell für diesen Einsatzzweck geeigneten Mischung aus löslichen Mineralstoffverbindungen vorzuziehen (MUNDT, 1989), was in den eigenen Untersuchungen auch gemacht wurde.

Die Nähr- und Mineralstoffgehalte des verwendeten Milchaustauschers kommen der Hundemilch (KIENZLE, 1999) sehr nahe. Sogar der Bedarf an Linolsäure, den MEYER und ZENTEK (1998) für Welpen mit 250 mg/kg KGW und Tag angeben, wird durch das pflanzliche Öl gedeckt. Alleine durch Kuh-, Ziegen- oder Schafmilch wäre dies nicht gewährleistet, da Hundemilch ein Sechsfaches an Linolsäure enthält. Einen Linolsäuremangel kann man am rauhen Haarkleid, Parakeratose, Haarausfall, erhöhter Infektionsneigung der Haut und schlechter Wundheilung erkennen. Andere kommerzielle oder selbst hergestellte Milchaustauscher, die der Zusammensetzung der Muttermilch möglichst ähneln, können ebenso verwendet werden.

Die Berechnungen der Inhaltsstoffe (Tab. 19a-d) zeigen, dass der Lactosegehalt des eingesetzten Milchaustauschers dem der Hundemilch nahe kommt. Es ist also nicht mit Durchfall aufgrund eines überhöhten Lactosegehalts zu rechnen, welcher durch osmotische Aktivität und Gärvorgänge im Dickdarm ausgelöst werden kann. Auch eine unzureichende Sättigung und Entwicklung als Folge eines zu dünnen Milchersatzes kann bei vorliegendem Lactosegehalt ausgeschlossen werden.

Der Fettgehalt liegt nur minimal über dem der Hundemilch. Das Fettsäuremuster wurde durch Verwendung von Pflanzenfett mit langkettigen, ungesättigten Fettsäuren dem der Hundemilch angepasst, um Durchfälle und Verstopfung zu vermeiden.

Da das Casein im Quark schon geronnen ist, kann die Problematik der Klumpenbildung im Magen von Monogastriern durch Ausfällung von Kuhmilch-Casein umgangen werden.

Beim Vergleich der Gehalte essentieller Aminosäuren von Hundemilch (MEYER und HECKÖTTER, 1986) und Milchaustauscher stellt man fest, dass jede essentielle Aminosäure im Milchaustauscher in größeren Mengen vorkommt als in der Hundemilch. Für Methionin und Cystein gaben MEYER und HECKÖTTER (1986)

einen gemeinsamen Wert in der Hundemilch von 0,3g/100g an, der Milchaustauscher enthält 0,277 g Methionin und 0,255 g Cystein pro 100 g. Aus der Summe ist erkenntlich, dass beide Aminosäuren in ausreichendem Maß im Milchaustauscher vertreten sein müssten. Auch Arginin ist durch den Zusatz von Eigelb bedarfsdeckend enthalten. Durch Abweichungen des Aminosäurenmusters im Protein verursachte Katarakte (Tab. 4) sind bei Verwendung des in den eigenen Untersuchungen verfütterten Milchersatzes also nicht zu erwarten. Da auch der Proteingehalt (Tab. 19a) höher ist als der der Hundemilch (Tab. 2), sind die absoluten Mengen an essentiellen Aminosäuren auf jeden Fall ausreichend.

Der Calciumgehalt ist nahezu identisch mit dem der Hundemilch, der Phosphorgehalt liegt ein wenig höher, das heißt, das Calcium-Phosphor-Verhältnis ist nur minimal schlechter. Störungen der Skelettentwicklung sind nicht zu erwarten, eine exzessive Calciumzufuhr mittels Milchersatz ist auch nicht gegeben, deshalb würde sich der Milchaustauscher auch zur Aufzucht grossrassiger Welpen eignen.

Auch Eisen- und Kupfergehalte liegen knapp über dem der Hundemilch. Die anämische Situation der Welpen in den ersten Lebenswochen dürfte also durch Eisen- oder Kupfermangel nicht ausgeprägter vorliegen als bei natürlich aufgezogenen Welpen. Erwartungsgemäß war somit durch Anwendung dieses Milchaustauschers eine problemlose Aufzucht der Hundewelpen möglich.

5.1.2.4. Fütterungstechnik

Die Fütterungstechnik orientierte sich an Literaturangaben und an den am Lehrstuhl für Tierernährung bereits vorliegenden Erfahrungen. Die Häufigkeit der Fütterungen insbesondere in den ersten Wochen war auch im Vergleich zu Empfehlungen aus der Literatur relativ hoch. Einerseits sollte damit erreicht werden, dass jegliche Änderungen des Gesundheitszustandes der Welpen vor allem in den ersten Tagen rechtzeitig erfasst würden, andererseits begründete es sich in der (anfänglichen) Unerfahrenheit der betreuenden Doktoranden. In der Phase des Laufenlernens waren die Welpen tendenziell eher zu fett als zu mager, was sich mit vermehrter Bewegung jedoch schnell wieder korrigierte.

Um die Standardbedingungen einzuhalten musste darauf geachtet werden, dass alle Welpen gleich oft gefüttert wurden. Damit auch weniger saugfreudige Welpen problemlos unter Standardbedingungen aufgezogen werden konnten, wurde von Anfang an eine ausreichend hohe Fütterungsfrequenz festgelegt.

5.1.2.5. Bestimmung der aufgenommenen Futtermenge

Die aufgenommene Futtermenge wurde anfangs mittels Differenzwägung und später mit direktem Wiegen der Futtermenge bestimmt. Die Differenzwägung wurde in den ersten Wochen deshalb vorgenommen, da nur ein Teil der Milch im Welpen ankam und ein nicht unerheblicher Teil verkleckert wurde. In dieser Zeit hielten die Welpen auf der Waage auch noch recht still. Später wurde das Wiegen durch die Bewegungsaktivität der Welpen erschwert, dafür waren sie dann aber in der Lage, das Futter ohne Verluste aufzunehmen. Es wurde dann vorgezogen, die Welpen nur einmal täglich zu wiegen, dafür aber jeden Welpen einzeln mit abgewogenem Futter zu füttern.

Die Differenzwägung wurde in der Literatur allerdings schon mehrfach hinsichtlich ihrer Genauigkeit bezüglich der tatsächlich aufgenommenen Milchmenge angezweifelt (OFTEDAL, 1984; KIENZLE et al., 1985).

OFTEDAL (1984) hat in seinen Versuchen eine Futtermilchverwertung von Muttermilch bei Beaglewelpen in der dritten bzw. vierten Lebenswoche von 4,4 bzw. 4,8 festgestellt, was den Ergebnissen von MUNDT et al. (1981) und den der eigenen Untersuchungen (1,7-3,0 bzw. 3,4) widersprach. MUNDT et al. (1981) hatten zur Feststellung der Futteraufnahme die Methode der Differenzwägung benutzt, während OFTEDAL (1984) den Welpen Deuteriumoxid verabreichte und durch die Verdünnung den Körperwassergehalt, den Wasserumsatz und über diesen auch die Milchaufnahme berechnete. Diese Methode kommt den tatsächlichen Werten näher. Durch die Differenzwägung wird die festgestellte Milchaufnahme um ca. 20-30 % unterschätzt. Dies bestätigten auch KIENZLE et al. (1985), die die Methode der Differenzwägung ebenfalls nicht für fehlerfrei erachten. Aufgrund von Berechnungen

der Milchaufnahme, den Gewichtszunahmen und dem Energieansatz getöteter Welpen kamen sie zu dem Schluss, dass die Gesamtenergieaufnahme rund 20 % über der gemessenen liegt. Begründet wird dies mit dem Gewichtsverlust während der Säugeperiode, mit längeren Nachtintervallen und psychischen Belastungen der Welpen. Unter diesen möglichen Faktoren ist nach KIENZLE et al. (1985) die reduzierte Milchaufnahme infolge langer nächtlicher Karenz weitgehend auszuschließen, da es bei größeren Intervallen zu einer kompensatorischen Mehraufnahme kommt. Der Gewichtsverlust während der Säugeperiode setzt sich aus Wasserverdunstung, Nährstoffabbau, Speichelfluss sowie Kot- und Harnabsatz zusammen. Die Verluste durch Kot- und Harnabsatz sind einfach zu eliminieren, indem man vor der Fütterung beides stimuliert. Der Speichelfluss ist vermutlich zu vernachlässigen. Die Höhe der Verluste durch Wasserverdunstung und Nährstoffabbau während des Saugens wurden von KIENZLE et al. (1985) ermittelt und betragen ca. 0,5 g/Säugeperiode und Welpen. Dieser Faktor wurde in den eigenen Untersuchungen jedoch nicht einberechnet, da nur auf ein Gramm und nicht auf ein Zehntel Gramm genau gewogen wurde. Außerdem waren die Säugeperioden bei der Flaschenfütterung deutlich kürzer (10-15 min) als die bei der Mutter angegebenen (30 min). Aus diesen Gründen scheint eine Gewichtsabnahme in oben genannter Größenordnung vernachlässigbar. Die Genauigkeit der beschriebenen Wägung genügt, da die Werte vor allem zum Vergleich untereinander dienen. Außerdem beruht die Milchaufnahmebestimmung bei Säuglingen in der Literatur im Allgemeinen auf der Differenzwägung. Da dies auch für Hundewelpen gilt (KIENZLE et al., 1985; MUNDT et al., 1981), eignen sich die eigenen Werte auch zum Vergleich mit den Werten aus der Literatur.

5.1.2.6. Beifütterung

Der Beginn des Beifütterns und das Einstellen der Milchersatzfütterung wurde der üblichen Praxis bei der normalen Aufzucht angepasst. Nach diesem etablierten Schema kam es erwartungsgemäß zu keinen Problemen bei der Futterumstellung. Ob Trockenfutter oder Feuchtfutter verwendet wird, bleibt dem eigenen Ermessen überlassen.

5.1.3. Arbeitsaufwand

Grundsätzlich müssen mindestens zwei Personen für die Durchführung der mutterlosen Aufzucht verfügbar sein, da in den ersten Wochen tags und nachts gefüttert werden muss. Bei gut saugenden Welpen dauert eine Fütterung in der ersten Woche im Durchschnitt 15 min, in der zweiten Woche 10 min. Hinzu kommt das Wiegen, Milchaustauscher mixen, Kot sammeln und wiegen, Welpen und Kisten säubern, Decken waschen und später Ausmisten und Futter wiegen. Eine Geduldsprobe ist das Sammeln des Kotes von Einzeltieren für die mikrobiologische Untersuchung, da der Kot dem einzelnen Welpen zugeordnet werden können muss. Es war nicht zweckmäßig, die Welpen bis zum Kotabsatz einzeln zu setzen, da sie das Alleinsein nicht gewohnt waren und vor Aufregung keinen Kot absetzten. Für das Blutnehmen und Pipettieren war je nach Welpenzahl ca. ein halber Tag einzuplanen.

5.1.4. Zuchtmanagement

Um die mutterlose Aufzucht nach vorgeschlagenem Versuchsplan möglichst effizient durchzuführen, ist ein funktionierendes Zuchtmanagement notwendig. Durch eine bessere Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Hündinnen müssen weniger Muttertiere gehalten, bzw. weniger Welpen zugekauft werden. Beides stellt einen nicht unerheblichen ökonomischen Faktor dar. Auch ist es sinnvoll, genügend Welpen zur Verfügung zu haben, um die Kapazität der Arbeitskräfte während der ersten Lebenswochen der Welpen voll ausschöpfen zu können. Es empfiehlt sich, die Wurftermine durch Läufigkeitsinduktion so zu synchronisieren, dass mindestens zwei Würfe gleichzeitig aufgezogen werden können. Weitere Wurftermine sollten dann aber aus arbeitstechnischen Gründen erst nach weiteren zwei Wochen geplant sein. Die Erfahrung am Institut für Tierernährung zeigte, dass - mit etwas Übung - ca. 12 Welpen gleichzeitig aufgezogen werden können, wenn die Welpen gesund, vital und saugfreudig sind. Dadurch kann die Zeit, in der tags und nachts gefüttert werden muss, so kurz wie möglich gehalten werden. Neben der Arbeitserleichterung hat dies auch den grossen Vorteil, jederzeit Ammen zur Verfügung zu haben. Bei einem derartig grossen Zuchtvorhaben ist mit der einen oder anderen Schwierigkeit

seitens der Muttertiere oder der Welpen zu rechnen. So hat in den eigenen Untersuchungen eine Mutterhündin den einzigen bei ihr verbleibenden Welpen derart wundgeleckt, dass eine Trennung unvermeidbar war. Der Welpen wurde zu einer anderen Mutterhündin gesetzt und von dieser problemlos akzeptiert. Aus experimenteller Sicht hat die parallele Aufzucht eines möglichst grossen Teiles der Versuchstiere den Vorteil, die Standardisierbarkeit zu optimieren.

Die Manipulation des Zyklusgeschehens ist bei der Spezies Hund von besonderer Bedeutung. So treten bei Hündinnen spontane Ovulationen nur ein- oder zweimal pro Jahr auf, denn der ovarielle Zyklus des Hundes ist unter den Haustieren insofern einzigartig, dass ein obligater Anöstrus auf die Beendigung der Lutealphase folgt.

Die Dauer des caninen Anöstrus liegt zwischen 3 und 10 Monaten (im Durchschnitt 7 Monate) und kann bei derselben Hündin vom einen zum nächsten Zyklus mehr oder weniger variieren. Die Länge des Zyklus hängt jedoch nicht davon ab, ob die Hündin trächtig ist oder nicht. Von einer Läufigkeit zur nächsten liegen sowohl bei Trächtigkeit als auch bei Nichtbelegung zwischen 5 und 12 Monate. Die Lutelphase dauert in beiden Fällen ungefähr 2 Monate. Die Physiologie des caninen Zyklus macht eine Belegung also nur zu ein bis zwei Zeitpunkten im Jahr möglich. Durch die Beeinflussung des Zyklusgeschehens kann eine Belegung und somit auch der Wurftermin dem eigenen Bedarf angepasst werden. Die in den eigenen Untersuchungen angewandte Läufigkeitsinduktion mit dem Prolaktinhemmer Cabergolin ist die schonendste und erfolgversprechendste Methode (VERSTEGEN et al., 1999). Alle behandelten Hündinnen waren läufig und trächtig geworden und hatten gesunde Würfe bekommen.

Es ist von vornherein ein grosszügiges Züchten zu planen, da mit Ausfällen gerechnet werden muss. Dies bezieht sich sowohl auf die Läufigkeit, als auch auf die fertile Belegung und die Gesunderhaltung der Welpen. Kranke Welpen können die Versuchsdaten verfälschen und sind aus dem Versuch herauszunehmen. Um die Überlebenschancen zu erhöhen werden sie am besten zur Mutter zurückgesetzt. Dabei ist es von Vorteil, wenn ein bis zwei Welpen bei der Mutterhündin belassen worden sind und der Milchfluss sich noch nicht eingestellt hat.

5.1.5. Allgemeinuntersuchung

Die untersuchten klinischen Parameter wie Futteraufnahme, Körpergewicht, Blutbild, Kotkonsistenz und Menge des Kotabsatzes wurden einerseits in den Leitlinien vorgeschlagen, andererseits aus tierärztlicher Indikation zur Überwachung der Versuchstiere durchgeführt. Eine ausführliche Allgemeinuntersuchung konnte aus Zeitgründen im Lactoferrinversuch nicht regelmäßig durchgeführt werden. Es waren aber auch keine Veränderungen der Allgemeinparameter durch die Probiotika erwartet worden. Die Allgemeinuntersuchungen im *Ec.faecium*-Versuch bestätigten dies. Atmungs- und Herzfrequenz sowie die Größe der Lymphknoten sind in den ersten Wochen unter Praxisbedingungen nur schlecht bestimmbar. Für die Bestimmung der kapillaren Füllungszeit wurde bei den kleinen Welpen Druck auf die Ballen statt auf das Zahnfleisch angewendet. Die in den Leitlinien vorgeschlagene Bestimmung der Wasseraufnahme war technisch nicht möglich und wäre auch nur von geringer Aussagekraft für den Versuch. Die Untersuchung von chemischen Blutparametern wäre für den Versuch durchaus interessant gewesen, hätte aber den Rahmen dieses Versuches gesprengt. Die Häufigkeit des Kotabsatzes konnte aufgrund der Haltung in Gruppen nicht bestimmt werden. Die Kotkonsistenz wurde anhand einer Skalierung von 1-5 bestimmt, wie es in den Leitlinien zur Objektivierung gefordert wird.

5.1.6. Untersuchungen im Blut

Die Blutentnahme an Tag 3 fand statt, um einen 0-Wert zu bekommen. Die Entnahmen bis Woche vier waren besonders zahlreich, um die Beeinflussung des Immunsystems, das sich in den ersten Wochen noch besonders stark ändert, beobachten zu können. In Woche 4 und Woche 8 wurden aufgrund der Futterumstellung alle Parameter bestimmt. Die Blutentnahme in Woche 8 diente insbesondere als 0-Wert für die immunologische Untersuchung, die Entnahme an Woche 10 für die immunologische Untersuchung, die in Woche 12 wurde sowohl zur Vergleich mit der aus Woche 10, als auch als Entnahme vor der Wiederholungsimpfung genommen. Die Entnahme in Woche 14 entspricht der in

Woche 10. Die Zeitpunkte boten sich aufgrund ihrer Regelmäßigkeit auch zur Bestimmung eines Blutbildes an.

5.1.6.1. Blutentnahmetechnik

Schon ab Tag 3 musste Blut für die immunologische Untersuchung und die Bestimmung des antioxidativen Status gewonnen werden. Da aus dem Blut Plasma gewonnen wurde, war mindestens doppelt so viel Blut wie Plasma nötig. Für jede Untersuchung wurden zwei Proben eingefroren, für die je 10 µl Blut benötigt wurden. Um diese 40 µl Plasma zu gewinnen, musste also eine Methode gefunden werden, bei der schon bei 3 Tage alten Welpen ca. 100 µl Blut gewonnen werden konnte. Vor Versuchsbeginn waren mehrere Blutentnahmetechniken bei Welpen ausprobiert worden, um die optimale Technik herauszufinden.

KIENZLE et al. (1985) erwähnten zwei Blutentnahmemethoden beim Welpen, die von uns jedoch nicht mit Erfolg durchgeführt werden konnten. Beim Anritzen der Ballen (oder Punktion der Fussballen) mit einem Skalpell trat viel zu wenig Blut aus, um mit einer Kapillare aufgesaugt werden zu können. Das vorherige Anwärmen der Ballen durch Massieren oder warmes Wasser verbesserte den Blutaustritt nicht.

Auch war die Entnahme mit Kanüle wie beim älteren Hund aufgrund der geringen Größe der Vene cephalica antebrachii unmöglich.

Dagegen war das Anritzen der Vena cephalica antebrachii möglich und es konnte auch genügend Blut gewonnen werden, jedoch ist diese Methode traumatischer als die von uns gewählte und wurde deshalb nicht angewandt.

EARL et al. (1973) beschrieben die Entnahme von 5 ml Blut von Beaglewelpen ab Tag 1 aus dem Herzen der Neugeborenen oder aus der Vena jugularis bei älteren Welpen, brachten die Welpen jedoch anschließend um, da das Knochenmark auch untersucht wurde.

NOLD et al. (1987) konnten durch Punktion der vena jugularis ab Tag 0 genügend Blut für ein Blutbild entnehmen, jedoch waren die Entnahmehäufigkeit deutlich geringer als in den vorliegenden Untersuchungen.

5.1.6.2. Immunologische Untersuchungen

Die immunologische Untersuchung mittels ELISA wurde nach einer Methode von ERHARD et al. (1995) durchgeführt. Die spezifische Immunantwort konnte mittels Impfung von humanem Serumalbumin eindeutig bestimmt werden. Durch den Einsatz dieses absolut fremden Antigens, mit dem die Hunde noch nie in Kontakt gekommen waren, kann die Immunantwort eindeutiger bestimmt werden und es ist nicht mit einer Interferenz von mütterlichen Antikörpern zu rechnen. Mit dieser hätte man bei der Bestimmung der Reaktion auf die Parvo-, Hepatitis-contagiosa-canis- oder Staupeimpfung rechnen müssen, auch wenn der Gehalt mütterlicher Antikörper im Blut in den 8 Wochen nach der Kolostrumaufnahme deutlich sinkt. Zur Untermauerung der Ergebnisse hinsichtlich der Immunmodifikation wäre die Bestimmung des Anstiegs der Antikörper gegen die anderen Impfantigene aber sicherlich sinnvoll und mit dem passenden Antigen auch durchaus möglich.

Durch die Verabreichung von probiotischen Substanzen werden die Lymphozytenaktivierung und die Antikörperproduktion stimuliert (DE SIMONE et al., 1993). Um dies zu überprüfen, dienen in diesem Modell die Bestimmungen des Gesamtimmunglobulin-A- bzw. -IgG-Gehaltes sowie des Anti-HSA-Titers. Außerdem wirken Probiotika als Adjuvans, das heißt, bei gleichzeitiger Verabreichung der Probiotika mit dem Antigen stimulieren die Probiotika die spezifische Immunantwort gegen dieses Antigen. Dieser Effekt wurde mehrfach bei verschiedenen Tierarten und dem Menschen bei Applikation verschiedener Probiotika beobachtet (ISOLAURI et al., 1993, MALIN et al., 1996, LINK-AMSTER et al., 1994). In diesem Modell dient die Impfung mit humanem Serumalbumin und die Messungen des Antikörpertiters in Serumproben zur Überprüfung des Adjuvanseffektes.

5.1.6.3. Bestimmung des Antioxidativen Status

Über eine mögliche Beeinflussung des antioxidativen Status durch die Verabreichung von Probiotika ist noch nichts bekannt. Dies soll in der Dissertation von Julia Schwarzer (München, 2003) erstmals untersucht werden. Untersuchungen von STOHRER et al. (2002) zeigten, dass auch bei Fohlen und Kälbern der antioxidative Status zum Zeitpunkt der Geburt verschlechtert ist. Bei Säuglingen ist dies schon länger bekannt. Die Ursachen dafür sind allerdings noch nicht vollständig geklärt. Bei der Untersuchung und Beurteilung des antioxidativen Status wird davon ausgegangen, dass auch neugeborene Hunde einen verschlechterten antioxidativen Status haben. Es wird vermutet, dass die Freisetzung von Eisen im Blut während des Abbaus des fetalen Hämoglobins sowie die Ischämie- und Reperfusionprozesse während des Geburtsvorganges die Verschlechterung des antioxidativen Status verursachen (STOHRER et al., 2002). Kommt es durch die Verschlechterung zu einem unausgewogenen Verhältnis von reaktiven Sauerstoffspezies und Antioxidantien im Plasma, entsteht „oxidativer Stress“, bei dem eine verschlechterte immunologische Antwort vermutet wird (MILLER et al., 1993). STOHRER et al. (2002) vermuten, dass sich die Folgen des oxidativen Stresses während der Geburt in der Gesundheit des Neugeborenen widerspiegeln. Ob Probiotika sich positiv auf den antioxidativen Status auswirken und diese Untersuchung in diesem Modell angebracht ist, werden die Ergebnisse von Julia Schwarzer (München, 2003) zeigen.

5.1.6.4. Blutbild

Das rote Blutbild sollte von den Probiotika nicht beeinflusst werden, es dient lediglich zur Gesundheitskontrolle der Welpen und als Bestätigung, dass die Versuchsbedingungen sich nicht negativ auf sie auswirken. Das weiße Blutbild dient neben dem Elisa zur Evaluierung der Einflüsse der Probiotika auf das Immunsystem. Die Werte der Thrombozyten mussten in beiden Versuchen mit betrachtet werden, da die geringe Blutmenge in relativ grossen EDTA-Röhrchen aufgefangen wurde, das EDTA also überproportional vorhanden war und dadurch die Lebensdauer der Thrombozyten bekanntlich eingeschränkt wird.

5.1.7. Untersuchungen im Kot

5.1.7.1. Probengewinnung

Die Kotproben für die Mikrobiologie konnten bei den 1-2 wöchigen Welpen problemlos durch Stimulation gewonnen werden, die älteren Welpen wurden nach der Fütterung bis zum nächsten Kotabsatz beobachtet. Der Kot war somit frisch und den Welpen eindeutig zuzuordnen. Die eigentliche Probe wurde aus der Mitte des Kots entnommen, um Kontaminationen so weit wie möglich zu vermeiden.

Die Kotgewinnung für die Bestimmung der Trockensubstanz war mit größeren Schwierigkeiten verbunden, weil Kot viel häufiger und in größeren Mengen benötigt wurde. Es wurde nur frischer Kot gesammelt. Älterer Kot eignete sich nicht, weil die Feuchtigkeit nicht mehr dem Originalzustand entsprach. In den ersten Wochen konnte nur sehr wenig frischer Kot gesammelt werden, wodurch die Genauigkeit bei der Bestimmung der Trockensubstanz eingeschränkt wurde. Sobald sich der reflektorische Kotabsatz einstellte, konnte nur noch Gruppenkot zur TS-Bestimmung verwendet werden, da die Zuordnung des Kotes zu den Einzeltieren nicht mehr möglich war. Die Welpen des Lactoferrinversuchs waren in mit Heu eingestreuten Boxen untergebracht, was neben vielen Vorteilen den Nachteil hatte, dass die älteren Welpen auch Heu aufnahmen, das nicht vollständig aus dem Kot entfernt werden konnte. Sehr feuchter Kot konnte nur schlecht von der Heueinstreu bzw. vom Boden gesammelt werden. Dieses Problem trat aber nur selten auf.

5.1.7.2. Bestimmung der Kotmenge

In beiden Versuchen war es mit zunehmendem Alter und zunehmender Gruppengröße schwieriger, den abgesetzten Kot komplett zu wiegen, da er durch die Aktivität der Welpen oft schon nach kurzer Zeit grossflächig verteilt worden war. Bei den kleinen Welpen stellte das kein Problem dar, hier konnte der Kot durch Stimulation gewonnen und auf ein Zehntel Gramm genau gewogen werden.

5.1.7.3. Untersuchung der Trockensubstanz

Die Bestimmung der Trockensubstanz (TS) einmal pro Woche wurde als ausreichend erachtet, um den Verlauf innerhalb einer Gruppe beobachten zu können und Vergleiche zwischen den Gruppen zu ziehen. In den ersten Wochen hätte die Kotmenge für häufigere Bestimmungen nicht ausgereicht. Durch die Erhöhung der Menge des gesammelten Kotes kann die Genauigkeit der TS – Bestimmung erhöht werden.

Die Bestimmung der TS ist sinnvoll, um festzustellen, in welchem Maß Osmose verursachende Substanzen im Dickdarm wirksam sind. So haben MEYER et al. (1984) Futter mit hohem Milchzuckeranteil an Hunde verfüttert und dabei flüssige Kotkonsistenz, Abfall der Trockensubstanz und des pH-Wertes, aber einen gestiegenen Milchsäuregehalt im Kot beobachtet. Dagegen blieb der Kot beim Einsatz hydrolysiertes Magermilch stets geformt, der Kottrockensubstanzgehalt und der pH-Wert stiegen an, während die Milchsäurekonzentration nur ein Zehntel dessen betrug, was bei Verfütterung nicht aufgeschlossener Milch erreicht wurde. Der Grund liegt in der hohen Verdaulichkeit der aufgeschlossenen Milch. Unbehandelte Magermilch enthält reichlich osmotisch wirksame Lactose, die zur Erhöhung des Wassergehaltes im Kot und über bakteriellen Abbau zur Senkung des pH-Wertes sowie zum Anstieg des Lactatgehalts im Kot führt.

5.1.7.4. pH-Wert

Der pH-Wert gehört zu den Faktoren, die unter „colonisation resistance“ zusammengefasst werden. Hierdurch wird es anderen, pathogenen Organismen erschwert, sich im Darm anzusiedeln (ROLFE, 1996). Die Bestimmung von pH-Wert und kurzkettigen Fettsäuren ist also nützlich für die Beurteilung der Wirksamkeit des Pro- bzw. Präbiotikums. Präbiotika senken den pH-Wert, indem sie die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren fördern. Liegt der pH-Wert unter 6,5, wird die Umwandlung von primären zu sekundären Gallensäuren gehemmt. Diese spielen eine Rolle in der Ätiologie von Colonkarzinomen (CRITTENDEN, 1999).

5.1.7.5. Ammoniak

Die Zeitpunkte für die Bestimmung der Kotparameter pH, Ammoniak und Lactat wurden an die Enden der Fütterungsperioden mit Muttermilch (Leerwert), Milchaustauscher, MAT-Beifutter und Beifutter gelegt, um die Effekte möglichst ausgeprägt und unbeeinflusst von der Futterumstellung zu bekommen.

In den „Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd“ werden als spezifische Parameter Kotparameter zum Proteinabbau erwähnt, unter die Ammoniak fällt. Der Ammoniakgehalt wurde nach der zu den verwendeten Geräten (Ammoniumelektrode, Messgerät etc., siehe „Material und Methoden“) gehörigen Anleitung bestimmt. Methode und Ergebnisse erwiesen sich als unproblematisch.

5.1.7.6. Bestimmung des L-Lactatgehaltes im Kot

Zur Auswertung des L-Lactatgehaltes im Kot war zuerst eine Untersuchungsmethode verwendet worden, nach deren Prinzip auch MOLITOR (1996) den Lactatgehalt in Hundekot bestimmt hatte. Die Probenvorbereitung entsprach der jetzigen Methode. Nach dem Auftauen wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit Glycin-Hydrazin-Puffer versetzt, zentrifugiert und der Überstand nochmals abpipettiert. Ein Leerwert wurde zur Einstellung des Photometers bestimmt, ein Probenleerwert zur Subtraktion von den Probenwerten. Die Proben wurden doppelt angesetzt und ausgewertet, als Ergebnis diente der Mittelwert. Hierzu wurden jeweils 100 µl Probe, 100 µl NAD, 10 µl L-Lactatdehydrogenase und 1 ml Glycin-Hydrazin-Puffer in die Cuvetten pipettiert und 1 Stunde lang bei 25°C inkubiert. Die Messung erfolgte bei 340 nm. Die Extinktion ΔE wurde durch Subtraktion des Probenleerwertes vom Wert der Probe errechnet. Daraus ergab sich nach Multiplikation mit dem Faktor 17,3 der L-Lactatgehalt in mg/dl.

Diese Methode berücksichtigt jedoch nicht, dass das L-Lactat durch NAD^+ in Gegenwart von L-LDH nur unvollständig zu Pyruvat oxidiert wird, da das

Gleichgewicht stark auf der Seite des Lactats liegt. Ohne die Weiterreaktion des Pyruvats zu L-Alanin kann das Lactat nicht vollständig umgesetzt werden. Da die photometrische Messung NADH misst, das nur die Mengen des zu Pyruvat umgesetzten Lactats widerspiegelt, sind die Werte um den nicht-umgesetzten Lactatanteil zu niedrig. Fraglich ist allerdings, wie MOLITOR (1996) mit seiner Methode bei einer Probe mit bekannter Lactatkonzentration zu einer Wiederfindungsrate von 105 % kommt.

In den eigenen Untersuchungen wurde bei der Messung einer Lösung mit bekannter Konzentration mit der jetzigen Methode bei jedem Neuansatz derselbe Wert ermittelt. Dies ist durch eine Endreaktion auch leicht zu erreichen. Bei der zuerst versuchsweise angewandten Methode schwankten die Werte erheblich mehr, was bei einer Gleichgewichtsreaktion auch eher zu erwarten ist. Auch die Doppelansätze der Proben schwankten bei der ersten Methode deutlich mehr.

5.1.7.7. Mikrobiologische Untersuchung

Die mikrobiologischen Untersuchungen erfolgten nach routinemäßig durchgeführten Verfahren des Instituts für Tierhygiene, München. Die nach obiger Methode gewonnenen Proben für die mikrobiologische Untersuchung wurden spätestens nach 60 Minuten verarbeitet. Dieser Zeitraum wurde vor allem aufgrund der limitierten Überlebenszeit von Clostridien in aerobem Milieu gewählt, da diese Keime obligate Anaerobier sind. Allerdings können innerhalb dieser 60 Minuten schon grosse Verschiebungen in Bezug auf Keimqualität und Keimquantität stattfinden, so dass die Proben nicht mehr sehr repräsentativ für den ursprüngliche Keimgehalt des Welpenkotes waren. Aus technischen Gründen war es leider nicht möglich die Proben schneller zu verarbeiten, da die Untersuchungsstelle für die Mikrobiologie und der Standort der Welpen des *Ec.faecium*-Versuchs nicht am selben Ort lagen. Auch beim Lactoferrinversuch kam es gelegentlich zu Verzögerungen. So sind bei der angewandten Methode weniger die absoluten Keimzahlen als vielmehr der Vergleich der Keimzahlen zwischen den Gruppen interessant. Da für die Auswertung der mikrobiologischen Proben gleiche Voraussetzungen herrschten, ist eine vergleichende Auswertung der Keimzahlen durchaus zu rechtfertigen.

Unter optimalen Bedingungen ist dennoch eine schnellstmögliche Verarbeitung der Proben anzustreben. So sammelten SIMPSON et al. (2002) für ihre Untersuchungen über die Fäkalflora des Hundes die Kotproben innerhalb einiger Minuten nach Kotabsatz auf und lagerten sie sofort unter anaeroben Bedingungen in einem anaeroben Beutel (AnaeroGen® von Oxoid Inc., Ontario, Kanada). Danach wurden die Proben auf Eis gelegt und innerhalb von 6 Stunden untersucht. SWANSON et al. (2002) sammelten die Proben innerhalb von 15 Minuten nach Defäkation, die Proben wurden sofort in einen Carey-Blair Container (Meridian Diagnostic, Cincinnati, OH) mit Transportmedium verbracht und anschließend analysiert. BALISH et al. (1977) schlagen die Entnahme von Kot aus dem Rektum der Hunde mit einem sterilen Spatel unter leichter Anästhesie vor.

5.1.8. Untersuchungen der Darmwand

In den eigenen Untersuchungen wurde eine bei Hunden bereits etablierte Methode zur histologischen und histochemischen Untersuchung von Darmwandproben angewandt (ZENTEK et al., 2002). Zur Objektivierung der Methode war dem Untersucher nicht bekannt, von welchen Welpen die Proben stammten. Ebenfalls zur Objektivierung wurde die histologische Bewertung anhand einer Skala klassifiziert. Die verwendete Skala war allerdings zur Klassifizierung histologischer Befunde von an Nahrungsmittelallergie erkrankten Hunden entwickelt worden. Es sind also bei der Kontroll- als auch bei den Probiotikumsgruppen keine Veränderungen der nach Tab. 19 mit 1-3 benannten Schweregrade, sondern ein mit 0 klassifizierter Befund zu erwarten. Bisher ist über den Einfluss von Probiotika auf die Darmwandstrukturen noch nicht viel bekannt. In den Studien von NOUSIAINEN (1991) und RAKOWSKA et al. (1993) bei Schwein und Broiler hatten die verabreichten Probiotika keinen signifikanten Einfluss auf die Darmwandstrukturen. Lediglich die Villillänge im Jejunum der Schweine zeigte eine tendenzielle Verlängerung. Bei der Fütterung einer Roggendiät an die Broiler konnte kein Einfluss der Probiotika auf die Zerstörung bzw. den Erhalt der Darmvilli festgestellt werden.

Die Untersuchungen der Darmwandstruktur der Welpen, deren Ergebnisse im Rahmen einer weiteren Dissertation veröffentlicht werden, werden mehr Aufschluss über die Beeinflussung der Darmwandstruktur durch Probiotika geben können.

5.1.9. Vorschläge für weitere Untersuchungen

5.1.9.1. Gehalt freier, kurzkettiger Fettsäuren im Kot

Präbiotika haben nicht nur eine Wirkung auf die Größe der Bakterienpopulation, sondern beeinflussen den Wirtsorganismus auch über Veränderungen der metabolischen Aktivität der Bakterien. So ist die Fermentierung von Präbiotika zu kurzkettigen Fettsäuren ein zentraler Punkt für verschiedene für den Wirt nützliche Vorgänge (CRITTENDEN, 1999). In Untersuchungen, die die Produktion von freien Fettsäuren bei Verabreichung unterschiedlicher Präbiotika verglichen, wurden verschiedene Fettsäuremuster festgestellt. Die verschiedenen Endprodukte haben unterschiedliche Wirkungen auf den Gesundheitsstatus (CAMPBELL et al., 1997).

Die schon häufig beobachtete Erhöhung der Lactat- und Acetatkonzentrationen durch Präbiotika weisen auf eine Fermentation durch Lactobacillen und Bifidobakterien hin (CRITTENDEN, 1999). Jedoch werden auch Propionat und Butyrat gebildet, was darauf hindeutet, dass auch andere Bakterien diese Substrate verwenden (CAMPBELL et al., 1997). Butyrat fördert die Apoptose und ernährt die gesunde Darmschleimhaut. Die Akkumulation von kanzerogenen Stoffen wie Diacylglycerolen, Fecapentaenen und Nitrosaminen, die von bestimmten Dickdarmbakterien produziert werden, kann durch eine erhöhte Butyratkonzentration vermindert werden. Eine Förderung der butyratproduzierenden Bakterien lässt sich durch eine ausgewogene Steigerung der Kohlenhydratzufuhr erzielen (GIBSON und COLLINS, 1999).

Die genannten Aspekte verdeutlichen, warum die Bestimmung des Gehaltes an freien Fettsäuren zur Wirksamkeit von probiotischen Substanzen sinnvoll wäre. Allerdings ist die Messung der Konzentration im Kot ein schlechter Maßstab für den Effekt, den Präbiotika auf die Aktivität der Mikroflora im proximalen Colon haben, da die im proximalen Colon produzierten kurzkettigen Fettsäuren schnell vom

Colonepithel absorbiert werden. Besser eignen sich zur Untersuchung der kurzkettigen Fettsäuren Tiere, von denen Proben des Darminhalts direkt gewonnen werden können oder Modelle, in denen Präbiotika zu Kotproben hinzugefügt werden (CRITTENDEN, 1999).

Eine Methode (Gaschromatographie) zur Bestimmung von freien Fettsäuren ist bei MOLITOR (1996) beschrieben.

5.1.9.2. Mineralabsorption

In einigen Studien an Tieren wurde der Nachweis erbracht, dass Präbiotika die Absorption von verschiedenen Mineralstoffen wie Calcium, Magnesium, Eisen und Zink fördern (DELZENNE et al., 1995; MIZOTA, 1996). Der Mechanismus ist zwar noch unbekannt, aber es wird vermutet, dass sich die Mineralstoffe durch den herabgesetzten pH-Wert besser lösen.

5.1.9.3. Molekularbiologische Untersuchungen der Darmflora

Die bisherigen Erkenntnisse über die Mikroflora des Menschen beruhen nahezu ausschließlich auf Untersuchungen von Kot oder Chymus über Anzucht und Analyse. Jedoch weist diese Methode hinsichtlich des Verstehens eines komplexen natürlichen Ökosystems einige Mängel auf, denn durch die üblichen Anzuchtverfahren können viele Mikroorganismen nicht kultiviert werden (WARD et al., 1990). Aber auch von der kultivierbaren intestinalen Mikroflora wurde bisher nur ein Bruchteil in den Studien über Präbiotika untersucht. Deshalb müssen Untersuchungen über Präbiotika in Zukunft zusätzlich zu den traditionellen Untersuchungsmethoden auch mit qualitativen und quantitativen molekularen Untersuchungsmethoden erforscht werden, um ein breiteres Spektrum der Darmflora erfassen zu können. So können Bifidobakterien phänotypisch nicht nach Stämmen unterschieden werden, es könnte aber sein, dass Präbiotika nicht nur Veränderungen auf der Ebene der Arten, sondern auch der Stämme hervorrufen können. Dies könnte von Bedeutung sein, da verschiedene Stämme auch in Bezug

auf ihre gesundheitsfördernde Wirkung unterschiedlich sein können (CRITTENDEN, 1999). Trotz der begrenzten Möglichkeiten sind die Anzuchtverfahren sehr aussagekräftig und notwendig, um ein Gesamtbild des intestinalen mikrobiellen Ökosystems zu erhalten und seine Bedeutung zu verstehen.

Weitere Kriterien zur Überprüfung der Wirksamkeit von Probiotika sind in den Leitlinien genannt (s. Einleitung). Dem Untersucher sind hier keine Grenzen gesetzt.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Futterverwertung

Die Futterverwertung (Tab. 20) wurde durch beide Probiotika nicht merklich beeinflusst. Mit steigender Dosierung konnte weder eine Tendenz zur Zunahme noch zur Abnahme der Futterverwertung festgestellt werden. Die einzelnen Gruppen blieben über die verschiedenen Fütterungsperioden hinsichtlich der Futterverwertung in keiner konstanten Reihenfolge. Im Lactoferrinversuch verbesserte sich die Futterverwertung mit Beginn der Beifütterung, im *Ec.faecium*-Versuch verschlechterte sie sich. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Lactoferrinversuch Trockenfutter, in *Ec.faecium*-Versuch Feuchtfutter gefüttert wurde. Die Futterverwertung des Milchaustauschers war in beiden Versuchen mit der Futterverwertung von Hundemilch (MUNDT et al., 1981) vergleichbar.

5.2.2. Gewichtszunahmen

Die täglichen relativen Zunahmen (Tab. 23) schwankten stark, nahmen aber mit dem Alter eindeutig ab. Es kann keine Tendenz einer verringerten oder gesteigerten Gewichtszunahme zwischen den Probiotikums- und Kontrollgruppen entdeckt werden. Ebenso wenig unterscheiden sich die Zunahmen der OWF- und GSF-Welpen. Dies ist ein erwünschtes Ergebnis, da beim Haustier Hund im Gegensatz zu landwirtschaftlichen Nutztieren durch die Verabreichung von Probiotika kein verstärktes Wachstum erreicht werden soll. Im Gegenteil muss bei Hunden darauf

geachtet werden, ein zu schnelles Wachstum zu vermeiden, um gesundheitlichen Schäden vorzubeugen. Beim Vergleich der relativen Zunahmen der eigenen Untersuchungen mit Literaturwerten bei 51 natürlich aufgezogenen Welpen (MEIXNER, 1968) fällt auf, dass auch diese stark schwankten. Die Zunahme an Tag 4 liegt mit 10,3 % zwar über dem Wert der eigenen Untersuchungen, mit 6,1 und 4,3 % an den Tagen 5 und 6 jedoch deutlich unter den eigenen Werten. An Tag 7 und 8 liegen die Werte im Gegensatz zu den eigenen zwar wieder im zweistelligen Bereich, sind bis Tag 20 jedoch ebenso grossen Schwankungen unterworfen wie die Werte der eigenen Untersuchungen. Der Vergleich zeigt, dass der unregelmäßige Verlauf der Gewichtsentwicklung nicht durch die mutterlose Aufzucht bedingt war.

Die durchschnittlichen Gewichtszunahmen der einzelnen Würfe des Lactoferrinversuchs weisen auf eine Abhängigkeit der Zunahmen von der Wurfgröße hin. Mit Ausnahme von Wurf 2 nahmen die Welpen grosser Würfe prozentual schneller zu als Welpen kleinerer Würfe. Bei der Aufzucht von Wurf 2 war die geringe Fresslust der Welpen in der ersten Zeit aufgefallen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass von Welpen größerer Würfe nicht nur eine gleich gute, sondern sogar eine bessere relative Zunahme erreicht werden kann als von Welpen kleinerer Würfe. Begründet werden kann dies damit, dass bei der mutterlosen Aufzucht das durch die grosse Wurfzahl bedingte limitierte Milchangebot als einschränkender Faktor wegfällt.

Auch der von der Wurfgröße unabhängige Vergleich der Zunahmen von Welpen mit hohem bzw. niedrigem Geburtsgewicht zeigte, dass Welpen mit niedrigem Geburtsgewicht (s. Tab. 24 und 25) nicht nur ebenso grosse (KIENZLE et al., 1985), sondern sogar größere relative Zunahmen aufweisen können als Welpen mit höheren Geburtsgewichten.

Die Tag-3-Gewichte der Gruppen 1 und 5 liegen sehr nahe beieinander (Tab. 21), weil sie aus Teilen derselben drei Würfe bestanden und die Aufteilung also optimal erfolgen konnte. Das Geburtsgewicht war bei Gruppe 3 besonders niedrig. In sie waren vier Welpen eines einzigen Wurfs eingegangen. Dieser Wurf bestand aus 8 Welpen, was das relativ niedrige Geburtsgewicht erklärt. An Tag 3 wiesen die Welpen allerdings nach sehr guter Zunahme bei der Mutter ein dem

Gesamtdurchschnitt von 405,2 g sehr nahekommenes Durchschnittsgewicht von 407,0 g auf. Das Lactoferrin im Milchaustauscher und Beifutter war in Gruppe 3 aus technischen Gründen unterschiedlich dosiert worden, was die Weiterführung dieser Versuchsgruppe unzweckmäßig erscheinen ließ. Aus demselben Grund wurde Gruppe 4 erst zu nach Abschluss der Gruppe 3 etabliert, was wiederum zu eingeschränkten Möglichkeiten in der Aufteilung führte, da die restlichen Welpen in sie eingehen mussten. Bei den Gruppen 1 und 5 lagen die durchschnittlichen Geburtsgewichte und Streuungen sehr nahe beieinander (Tab. 21), was daran lag, dass sie aus Teilen derselben drei Würfe bestanden und die Aufteilung deshalb optimal erfolgen konnte.

Die deutlich länger dauernde Gewichtsverdopplung von Gruppe 1 und 5 hatte unter anderem die Ursache, dass alle vier Welpen aus Wurf 2, von denen je 2 in die beiden Gruppen gehörten, schlecht frassen. Wird Wurf 2 ausgeklammert, kommt man zur Gewichtsverdopplung nach 8 Tagen bzw. zur Verdreifachung nach 14 und 15 Tagen, was immer noch langsamer ist als Gruppe 2, 3 und 4. Der subjektive Eindruck der betreuenden Personen war jedoch, dass vor allem die Würfe 3 und 5 eine sehr gute Futteraufnahme zeigten, Wurf 4 und 1 gut und Wurf 2 eher schlecht frass. Dies betraf jeweils so gut wie den ganzen Wurf, es entstand nicht der Eindruck, dass die Bereitschaft zur Futteraufnahme gruppenabhängig, also vom Milchaustauscher und der Lactoferrindosierung abhängig war. Da die Gruppen 2 und 3 ausschließlich aus Welpen der Würfe 3 und 5 bestanden, ist die schnelle Gewichtsvermehrung nicht verwunderlich.

Daraus lässt sich ableiten, dass für eine optimale Randomisierung neben dem Anfangsgewicht vor allem auch die möglichst gleichmäßige Verteilung der Welpen eines Wurfs auf alle Gruppen von Bedeutung ist. Dies ist nicht möglich, wenn ein Wurf nur aus wenigen Welpen besteht. Da aus Tierschutzgründen immer mindestens zwei Welpen gemeinsam aufgezogen werden müssen, empfiehlt es sich, möglichst viele Welpen gleichzeitig aufzuziehen. Die gemeinsame Haltung von Welpen von deutlich unterschiedlichem Alter wurde aus Gründen der Beeinflussung des Immunsystems und der Mikrobiologie in den eigenen Untersuchungen nicht durchgeführt. Außerdem ist die Zuordnung des Kotes für die Bestimmung der TS so nicht durchführbar.

Bei der Randomisierung ist es wichtiger, die Welpen nach Geschlecht als nach Gewicht in die Gruppen aufzuteilen, da Rüden schneller wachsen und ein höheres Endgewicht erreichen als Hündinnen. Wird die Priorität bei der Aufteilung auf das Gewicht gesetzt, können die Ergebnisse durch ungleiche Geschlechterverteilung verfälscht werden. In den eigenen Untersuchungen waren die Hündinnen zu Versuchsbeginn im Schnitt über 100 g (126%) schwerer als die Rüden, am Ende des Versuches wogen sie aber über 750 g weniger (89%, Tab. 22). Rüden wachsen offensichtlich schneller und erreichen ein höheres Endgewicht. Um zu vermeiden, dass die Ergebnisse durch ungleiche Geschlechterverteilung verfälscht werden, sollte bei der Randomisierung die Priorität auf die Geschlechterverteilung gesetzt werden.

5.2.3. Blut

Die Erythrozytenzahlen der Welpen des Lactoferrinversuchs decken sich mit den von HOSGOOD und HOSKINS (1995) angegebenen Werten für Beaglewelpen (Tab. 7) und liegen ab Woche 10 im Referenzbereich adulter Hunde, der von KRAFT (1999) mit $5,5-8,5 \times 10^9/\text{ml}$ angegeben wird. Die Werte des Ec.faecium-Versuchs liegen schon ab Woche 8 im Referenzbereich adulter Hunde und damit über dem für Welpen angegebenen Wert.

„Normale“ Erwachsenen- Erythrozyten – und Hämoglobinwerte wären nach KRAFT (1999) in den ersten Wochen als erhebliche Hämokonzentration zu bewerten, was hier aber nicht zutrifft, da die Welpen schon 8 Wochen alt waren und eine altersabhängige Zunahme der Erythrozytenzahl normal ist. Dass die Werte des Ec.faecium-Versuchs über den üblichen Werten liegen, kann mit der schnelleren Entwicklung dieser Welpen erklärt werden. Im Vergleich zu den Welpen des Lactoferrinversuchs wiesen die Welpen des Ec.faecium-Versuchs in Woche 4 ein deutlich höheres Gewicht auf, zu diesem Zeitpunkt war der Unterschied in der Erythrozytenzahl sogar hochsignifikant. Auch die Gewichtszunahme war anfangs bei den Welpen des Ec.faecium-Versuchs höher und die Öffnung der Augen fand mit 11,2 Tagen 1,4 Tage früher statt als bei den Welpen des Lactoferrinversuchs (12,6 Tage). Die Vermutung liegt nahe, dass eine schnellere Gewichtsentwicklung auch mit

einer rascheren Entwicklung des Blutbildes einhergeht. In Woche 8 war der Unterschied nur noch signifikant, in Woche 10 erreichte der Unterschied nicht das Signifikanzniveau, was auf einen Ausgleich der Entwicklungsgeschwindigkeit hindeutet.

Die Hämatokritwerte beider Kontrollgruppen liegen während der gesamten Versuchsdauer deutlich unter dem von KRAFT (1999) angegebenen Referenzbereich für adulte Hunde von 44-52 %, die Werte der 4. und 8. Woche decken sich jedoch mit den Werten, die LUND et al. (2000) bei vierwöchigen ($26,8 \pm 3,2$ %) bzw. achtwöchigen (24,8 bis 40,8 %) Welpen gemessen haben. Auch der Hämatokrit der Woche 12 weicht nicht sehr vom Durchschnittswert ab, der von EARL et al. (1973) mit 40,9 % für 12-wöchige Welpen angegeben wird.

Im Vergleich der beiden Gruppen untereinander fällt auf, dass sich der Hämatokrit prozentual weniger unterscheidet als die Erythrozytenzahl. Die Ursache könnte darin liegen, dass die Welpen des *Ec.faecium*-Versuchs zwar mehr Erythrozyten haben, jene aber einen kleineren Durchmesser aufweisen. Dies könnte wiederum für eine fortgeschrittenere Entwicklung der Welpen des *Ec.faecium*-Versuchs sprechen, da die grossen Erythrozyten neugeborener Welpen langsam abgebaut werden und reifere, kleinere Erythrozyten gebildet werden. Allerdings liegt der Wendepunkt dieses Geschehens schon in der dritten Lebenswoche. Deshalb ist auch eine mikrozytäre, hypochrome Anämie aufgrund Eisen- oder Kupfermangel als Ursache für das Vorkommen kleinerer Erythrozyten bei den Tieren des *Ec.faecium*-Versuchs nicht unwahrscheinlich.

Der Hämoglobingehalt beider Gruppen im Alter von 4 Wochen entspricht den Werten von LUND et al. (2000), die zu dem Zeitpunkt einen Tiefpunkt von $5,2 \pm 0,6$ mmol/l gemessen hatten. Eine Normalisierung der Werte ist nach KIENZLE et al. (1985) im Zeitraum von 4 Wochen nach Beifütterungsbeginn zu erwarten, was in den eigenen Untersuchungen in etwa bestätigt werden konnte. Die Ursache liegt darin, dass fleischreiches Beifutter mehr Eisen enthält als Hundemilch oder Milchaustauscher. Die Hb-Werte des *Ec.faecium*-Versuchs liegen im Gegensatz zur Erythrozytenzahl und, außer Woche 8, auch zum Hämatokrit nach Beginn der Beifütterung unter denen des Lactoferrinversuchs. Dies könnte daran liegen, dass im *Ec.faecium*-

Versuch ein nicht speziell für Welpen deklariertes Feuchtfutter verwendet worden war, das möglicherweise nicht genügend Eisen oder Kupfer enthält.

Nach KRAFT (1999) liegt der Referenzbereich des MCV für Hunde zwischen 60 und 77 fl. Demnach liegen zwar alle Werte des Lactoferrinversuchs im Referenzbereich adulter Hunde, die des *Ec.faecium*-Versuchs aber erst ab Woche 14. Nach LUND et al. (2000) liegt der Wert bei neugeborenen Hunden in den ersten Tagen mit $89,8 \pm 6,7$ fl deutlich über dem adulter Hunde, sinkt mit zunehmendem Alter ab und ist ab der 8. Woche mit dem adulter Hunde vergleichbar. Ein geringeres Erythrozytenvolumen tritt bei Eisen- oder Kupfermangel auf. Der Milchaustauscher (Tab. 19b) enthält zwar mehr Eisen und Kupfer als Hundemilch (Tab. 2), jedoch kann dadurch ein Mangel nicht ausgeschlossen werden. Auffallend ist jedoch, dass auch in der Beifütterungsperiode der MCV im *Ec.faecium*-Versuch erst mit 14 Wochen über 60 fl steigt. Wiederum wäre ein nicht genügend Eisen und Kupfer enthaltendes Futter des *Ec.faecium*-Versuchs eine mögliche Erklärung.

Nach KRAFT (1999) liegt der Referenzbereich des MCH für Hunde zwischen 1,0 und 1,4 fmol. Demnach liegen alle gemessenen Werte im Referenzbereich adulter Hunde. Dies ist auch zu erwarten, denn der relativ hohe MCH fetaler Erythrozyten nimmt von einem Zeitpunkt lange vor der Geburt bis zum Ende des Säuglingsalters ab (WALSER, 1990). Dasselbe gilt auch für den MCHC, für den KRAFT (1999) einen Referenzbereich zwischen 19 und 21 mmol/l angibt. LUND et al. (2000) konnten in ihren Untersuchungen über Blutreferenzwerte bei Beaglewelpen keine nennenswerte Altersabhängigkeit feststellen. In den eigenen Untersuchungen ist jedoch eine geringe Zunahme über den Beobachtungszeitraum festzustellen. Da sich der MCHC aus $Hb/Hkt \times 100$ berechnet und der Hämatokrit in der Zeit nicht abgenommen hat, liegt der Anstieg des MCHC am Anstieg des Hämoglobingehaltes, der abhängig vom Eisengehalt des Milchaustauschers und des Beifutters ist.

Im weißen Blut sind erhebliche Schwankungen erkennbar, für die mehrere Erklärungen in Frage kommen. Grundsätzlich liegt die Leukozytenzahl bei Hunden unter sechs Monaten im Allgemeinen an der oberen Grenze der durchschnittlichen Werte adulter Hunde (JAIN, 1986), die KRAFT (1999) mit 6.000-12.000/ μ l in Ruhe,

bzw. bis 15.000/ μ l bei Aufregung angibt. Bei einem Welpen werden 7000 Leukozyten/ μ l schon als leichte Leukopenie angesehen (BULGIN et al., 1970). Alle Werte des *Ec.faecium*-Versuchs liegen also durchaus im Normbereich, wohingegen die Leukozytenzahlen der 10., 12. und 14. Woche im Lactoferrinversuch mit 14,77-15,90 x 10⁹ /L deutlich über dem Referenzbereich liegen. Am höchsten jedoch ist die Leukozytenzahl aus dem Lactoferrinversuch in Woche 8 mit 19,20 x 10⁹ /L.

Bei der Interpretation von Blutbildern des Hundes muss berücksichtigt werden, dass dieses außerordentlich empfindlich auf innere und äußere Einflüsse reagiert. So kann zum Beispiel durch die Blutentnahme bedingter Stress schnell zu einer erheblichen Leukozytose mit Neutrophilie führen, die sich aber ebenso rasch wieder zurückbilden kann. Dies wird auf eine starke Variabilität des marginalen Leukozytenpools zurückgeführt. Aber auch Infektionskrankheiten ziehen sehr rasch eine erhebliche Leukozytose nach sich. Dadurch wird sowohl die Erstellung eines verlässlichen Referenzbereichs als auch die Interpretation des Blutbildes erschwert (KRAFT, 1999).

Die oben erwähnte hohe Leukozytenzahl wäre beim Vergleich mit den von KRAFT angegebenen Referenzbereichen schon zu hoch für eine physiologische Leukozytose, mit der das Niveau der Leukozytenzahlen in den Wochen 8, 10 und 12 noch erklärbar gewesen wäre. Da sich KRAFTs Werte jedoch auf erwachsene Hunde beziehen, müssen für Welpen mit physiologischer Leukozytose höhere Werte angesetzt werden. JAIN (1986) gibt als typische Werte für eine physiologische Leukozytose bei jungen Hunden über 20.000 Leukozyten/ μ l, 15.000-20.000 Neutrophile/ μ l und über 6.000 Lymphozyten/ μ l an. Für die Beurteilung nach JAINs Zahlen müssen die Einzelwerte betrachtet werden. Dabei fällt auf, dass einzelne hohe Leukozytenzahlen meist durch eine erhöhte Lymphozytenzahl und nicht durch vermehrt vorkommende neutrophile Granulozyten entstanden sind. Dies lässt sich auch am Durchschnittswert der neutrophilen Granulozyten erkennen, der unter dem von HOSGOOD und HOSKINS (1995) angegebenen Durchschnittswert (Tab. 7) liegt. Diese Verhältnisse sprechen eher gegen eine physiologische Leukozytose. Dagegen sprechen weiter die relative Konstanz der Leukozytenzahlen des *Ec.faecium*-Versuchs, bei dem die gleiche Blutentnahmetechnik angewandt wurde und die sich

über vier Blutentnahmen erstreckende Erhöhung der Leukozytenzahl im Lactoferrinversuch.

Ursache für die hohe Lymphozytenzahl und die grosse Streuung in Woche 8 war ein Welpen aus Wurf 2 mit $21,8 \times 10^9$ Lymphozyten/L. Dies erklärt auch die Werte der Leukozyten aus dem Lactoferrinversuch in Woche 8. Die hohe Neutrophilenzahl kommt hier durch die drei Welpen aus Wurf 1, die zwischen 12,6 und 15,1 liegen, zustande. Gesundheitliche Probleme der Welpen waren in diesem Zeitraum jedoch nicht aufgefallen.

Die Ursache für die hohen Leukozyten liegt am wahrscheinlichsten in den Haltungsbedingungen. Differentialdiagnosen (KRAFT, 1999) wie endogene oder exogene Intoxikationen, ZNS-Erkrankungen, endokrine Krankheiten oder Allergien sind vor allem in Anbetracht der Einzelwerte, die je nach Haltungsbedingung Ähnlichkeiten aufweisen, unwahrscheinlich. Möglich wäre noch ein Anstieg der Leukozyten aufgrund von Resorption körpereigenen Proteins aus Hämatomen, die bei der Blutentnahme schon einige Male auftraten. Auch körperfremdes Protein wurde nach den Impfungen in Woche 8 und Woche 12 resorbiert. Damit lassen sich aber nur geringe Differenzen, wie sie im *Ec.faecium*-Versuch zwischen Woche 8 und 10 sowie 12 und 14 zu sehen sind, erklären. Auf keinen Fall kann die Impfung eine Ursache für die hohe Leukozytenzahl in Woche 8 sein, da die Blutentnahme am selben Tag vor der Impfung stattfand, um die Welpen nach der Injektion von humanem Serumalbumin nicht mehr manipulieren zu müssen.

Nach KRAFT (1999) spielt die Haltung eine grosse Rolle. So weisen im Freien gehaltene Hunde eine höhere Leukozytenzahl auf als Hunde, die in Gebäuden gehalten werden. Zwar wurden in den eigenen Untersuchungen beide Gruppen in Gebäuden gehalten, jedoch unter sehr unterschiedlichen Bedingungen. Der Lactoferrinversuch wurde in einem Schweinestall durchgeführt, in dem auch immer einige Schweine gehalten wurden. Die Boxen waren mit Heu eingestreut und eine Vielzahl an Personen hatte Zugang zu dem Stall. Die Hunde des *Ec.faecium*-Versuchs dagegen waren in Boxen in einem abgeschotteten Hundestall untergebracht, zu dem außer den betreuenden Doktoranden niemand Zutritt hatte. Vor dem Betreten der Stallungen wurden die Schuhe gewechselt und Schutzkleidung angezogen. Der Boden wurde täglich mehrmals ausgespritzt. Andere Tiere konnten

nicht in den Hundestall gelangen. Aus diesen Unterschieden in den Haltungsbedingungen lässt sich ableiten, dass sich die Welpen des Lactoferrinversuchs intensiver mit den Antigenen der Umgebung auseinandersetzen mussten. Diese Immunstimulation schlägt sich im weißen Blutbild nieder. In Woche 4 ähnelten sich die weißen Blutbilder noch, was daran liegen könnte, dass die Welpen des Lactoferrinversuchs in diesem Zeitraum noch in einem kleinen, gut abgetrennten Bereich der Abferkelboxen gehalten wurden, der relativ weit entfernt von den Schweinen war. Dies war später aus Platzgründen nicht mehr möglich und die Welpen bekamen die gesamten Abferkelboxen zur Verfügung gestellt. Es kann nicht grundsätzlich dazu geraten werden, Welpen so abgeschottet wie möglich aufzuziehen, schon alleine um Sozialisierungsprobleme zu vermeiden. Dennoch ist die Auswertung der Immunologie in einem Probiotikumsversuch erheblich einfacher und eindeutiger, wenn die Kontrolltiere einheitliche Werte aufweisen und nicht Schwankungen wie im Lactoferrinversuch zeigen, die zum Teil größer sind als die Veränderungen, die durch das Probiotikum, Impfungen und dergleichen erwartet werden konnten. Diese zusätzlichen Einflüsse sollten insbesondere dann vermieden werden, wenn die Haltungsbedingungen sowieso dadurch schon nicht optimal standardisierbar sind, dass die Welpen durch die notwendigerweise auseinanderliegenden Wurftermine nicht zu allen Zeitpunkten in denselben Umgebungsbedingungen aufgezogen werden konnten. Durch bestmögliche Aufteilung der Welpen eines Wurfs in die verschiedenen Gruppen wurde versucht, diesen zuletzt genannten Nachteil möglichst gering zu halten.

Die Monozytenzahlen der Welpen des Lactoferrinversuchs liegen im Gegensatz zu denen des *Ec.faecium*-Versuchs über den von HOSGOOD und HOSKINS (1995) genannten Durchschnitt. Nach JAIN (1986) geht eine Monozytose oft mit einer neutrophilen Leukozytose bei eitrigen Entzündungen, granulomatösen Erkrankungen oder dem Austritt von Blut in Gewebe oder Körperhöhlen einher. Außerdem kann eine Monozytose bei Stress und als Antwort auf exogene Kortikoidzufuhr auftreten. Beim Vergleich der Monozyten mit den Neutrophilen und Leukozyten stimmt zwar überein, dass diese auch im Lactoferrinversuch höher sind als im *Ec.faecium*-Versuch, ein paralleler Verlauf ist jedoch nicht erkennbar. Ins Gewebe ausgetretenes Blut ist als Ursache der erhöhten Monozytenzahlen denkbar. Die Menge an ausgetretenem Blut war zwar gering, aber es war auch nur ein erhöhte

Monozytenzahl und keine manifeste Monozytose zu verzeichnen. Stress als Ursache ist zwar denkbar, es sprechen aber dieselben Kriterien dagegen wie gegen die physiologische Leukozytose.

Nach JAIN (1986) tritt eine Eosinophilie (über 1300/ μ l) bei Hunden unter sechs Monaten nur selten bei Parasitenbefall von Haut, Lunge und Magen-Darmtrakt auf, wenn ein dauerhafter, intensiver Kontakt zwischen Parasiten und Körpergeweben vorliegt. Bei Welpen kommt vor allem ein Spulwurmbefall mit *Toxocara canis*, aber auch *Toxascaris leonina* vor. Flöhe konnten in den eigenen Untersuchungen weitgehend ausgeschlossen werden. Die Welpen beider Versuche waren mehr oder weniger stark mit Würmern befallen, alle Einzelwerte passten jedoch in den von HOSGOOD und HOSKINS (1995) angegebenen Referenzbereich aus Tab. 7. Im *Ec.faecium*-Versuch fiel vor allem ein Welpen auf, der in Woche 8, 10 und 12 Eosinophilenzahlen von 0,153, 0,446 und 0,320 $\times 10^9$ /L aufwies, während die anderen in der Zeit 0,022 $\times 10^9$ /L als Höchstwert aufwiesen. Im Lactoferrinversuch lagen die Werte noch niedriger.

Der Wurmbefall bei Welpen lässt sich kaum vermeiden. Da die Wurmlarven im Gesäuge der Mutter sitzen und über das Kolostrum in den Darm der Welpen gelangen, ist immer davon auszugehen, dass Welpen mit Würmern befallen sind. Deshalb wurden die Welpen regelmäßig entwurmt. Die Tatsache, dass die Welpen nur 3 Tage lang Kolostrum erhielten, hätte bei regelmäßiger Entwurmung einen rasch nachlassenden Wurmbefall vermuten lassen können. Dies war jedoch nicht der Fall, weil die Welpen nur eine eingeschränkte Fläche zum Kotabsatz zur Verfügung hatten, und die zeitweise sogar häufig im Kot sichtbaren Larven immer wieder von den Welpen aufgenommen werden. Trotzdem nimmt der Wurmbefall aufgrund der mit dem Alter zunehmenden Immunität ab, so dass in Woche 12 und 14 alle Welpen niedrige Eosinophilenzahlen hatten. Der stärkere Befall der Welpen des *Ec.faecium* - Versuchs könnte am unterschiedlichen Entwurmungsmanagement liegen, das bei den verschiedenen Mutterhündinnen angewandt worden war. Bei den betroffenen Welpen wurden auch häufiger Würmer im Kot gefunden, was auf einen sehr starken Befall hindeutet.

Die Basophilen sind bei jungen Hunden noch seltener erhöht als die Eosinophilen, weil eine Basophilie fast immer nur gleichzeitig mit einer Eosinophilie auftritt (JAIN, 1986). Die Basophilen der Welpen zeigten keine bemerkenswerten Auffälligkeiten.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Wirksamkeitsprüfung von probiotischen Substanzen an Hundewelpen zu etablieren, die mit den Vorgaben der „Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze, Pferd“ der Europäischen Kommission vom Oktober 2000 in Einklang steht. Als Untersuchungsmethode wurde die mutterlose Aufzucht neonataler Hundewelpen gewählt. Nur dieses Modell gewährleistet, dass interindividuelle Unterschiede wie Qualität und Quantität von Muttermilch ausgeschlossen werden können. Ebenfalls kann das Modell durch genaue Vorgaben (Zeitpunkt des Absetzens, Art und Frequenz der Fütterung, Haltungsbedingungen, Zeitpunkte der Probengewinnung, Wahl der Parameter, Analysemethoden) exakt standardisiert werden.

In zwei 14-wöchigen Fütterungsversuchen an Beagle-Welpen wurde die Wirkung der präbiotischen Substanz Lactoferrin (n=23) sowie des probiotischen Bakteriums *Enterococcus faecium* (n=12) auf den neonatalen Organismus untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass der Gesundheitszustand der Welpen in ausreichendem Maß anhand von allgemeinen klinischen Parametern (Allgemeinuntersuchung, Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung, Kotmenge- und Konsistenz, Blutbild etc.) zu beurteilen war. Sofern diese Parameter anhand einer Skalierung objektiv bestimmbar waren, konnten sie als sogenannte „unterstützende Daten“ in die Beurteilung der Substanzen mit einfließen.

Als spezifische Parameter, die direkte Wirkungsbeziehungen zu den zu untersuchenden Substanzen aufweisen, konnten in diesem Modell unter anderem pH-Wert-Messungen, Ammoniak- und Lactatbestimmungen sowie mikrobiologische Analysen des Kotes etabliert werden. Desweiteren konnten Darmwandproben aus Duodenum und Colon zu histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen gewonnen werden.

Mit Hilfe der Bestimmung von TEAC (trolox equivalent antioxidative capacity), Vitamin E und C, Harnsäure, Bilirubin, freiem Eisen, Lactat, CK und GOT sowie des

Gesamtgehalts an IgG und IgA und des spezifischen Antikörpergehalts gegen HSA (nach vorhergehender aktiver Immunisierung) im Plasma wurden antioxidative und immunmodulatorische Effekte der Substanzen beurteilt.

Die beiden Fütterungsversuche zeigen auf, nach welchen Grundsätzen es möglich ist, den Effekt von prä- oder probiotisch wirksamen Substanzen bei Kleintieren anhand von wissenschaftlichen Standards zur Versuchsdurchführung, -dokumentation und –auswertung zu prüfen. Damit ist mit diesen Untersuchungen eine Grundlage geschaffen, die dazu dienen kann, dass bei der Prüfung dieser Substanzen Mindeststandards zur Qualitätssicherung, wie sie von der Europäischen Kommission im Oktober 2000 gefordert wurden, eingehalten werden.

7. Summary

Eva Unsöld

Model of orphan rearing of puppies for testing the efficacy of probiotic substances

This study aimed at establishing a method for checking the efficacy of probiotic substances in beagle puppies, in accordance with the requirements of the *Guidelines for the assessment of micro-organisms in the animal categories dogs, cats and horses* of the European Commission of October 2000. The orphan rearing of neonatal puppies was chosen as trial method, the only method to ensure avoidance of interindividual differences such as quality and quantity of mother milk. Another advantage is exact standardisation by exact prerequisites (time of weaning, type and frequency of feeding, keeping facilities, sample collection, choice of parameter, methods of analysis).

In two different feeding trials with beagle puppies (duration 14 weeks) the efficacy of the prebiotic substance Lactoferrin (n=23) and of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* (n=12) on neonatal organisms was analysed.

It has become clear that the general status of the puppies could be sufficiently assessed by general clinical parameters (clinical examination, food intake, weight development, quantity and consistency of faeces, blood parameter). As far as these parameters could be determined based on scoring systems, they contributed to the assessment of the substances as so-called "supporting data".

The specific parameters directly related to the probiotic action that could be established in this model are, among others, pH analysis, ammonia and lactate determination as well as microbiological analyses of faeces. Furthermore gut wall samples of duodenum and colon could be taken for immunohistochemical analysis.

Antioxidative and immunomodulatory effects were assessed by means of determining trolox equivalent antioxidative capacity, vitamins E and C, uric acid, bilirubin, free ferrum, lactate, CK and GOT, the overall content of IgG and IgA, and the specific content of antibodies against humane serumalbumine in plasma.

The two feeding experiments show what principles can be applied for examining the effect of prebiotically or probiotically effective substances in small animals by means of scientific standards for carrying out experiments, documenting and analysing them. Thus these experiments provide a basis for appropriate application of minimum quality standards in examining these substances, according to the requirements of the European Commission in October 2000.

8. Literaturverzeichnis

ALTEKRUSE, S.F., STERN, N.J., FIELDS, P.I., SWERDLOW, D.L. (1999):
Campylobacter jejuni- an emerging foodborne pathogen.
Emerg. Infect. Dis. 5: 28-35.

ANDERSON, A.C. and GEE, W. (1958): Normal blood values in the beagle.
Vet. Med. 53: 135.

BAINES, F.M. (1981): Milk substitutes and the hand rearing of orphan puppies and
kittens.
J. Small Anim. Pract. 22: 555-578.

BALISH, E., CLEVEN, D., BROWN, J., YALE, C.E. (1977): Nose, throat, and fecal
flora of beagle dogs housed in "locked" or "open" environments.
Appl. Environ. Microbiol. 34: 207-221.

BANKS, K.L. (1982): Host defense in the newborn animal.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 181: 1053-1056.

BEAVER, B.V. (1995): Behavior Development and Behavioral Disorders.
In: HOSKINS, J.D. (ed.), Veterinary Pediatrics – Dogs and Cats from Birth to Six
Months. 2nd edition. WB Saunders, Philadelphia, pp. 23-32.

BIOURGE, V., VALLET, C., LEVESQUE, A., SERGHERAERT, R., CHEVALIER, S.,
ROBERTON, J.-L. (1998): The use of probiotics in the diet of dogs.
J. Nutr. 128: 2730S-2732S.

BJÖRCK, G. (1982): Care and feeding of the puppy in the postnatal and weaning
period. In: Nutrition and Behaviour in Dogs and Cats. New York, Pergamon Press,
p.25.

BOUCHARD, G., PLATA-MADRID, H., YOUNGQUIST, R.S., BUENING, G.M., VENKATASESHU, K.G., KRAUSE, G.F., ALLEN, G.K., PAINE, A.L. (1992): Absorption of an alternative source of immunoglobulin in pups. *Am. J. Vet. Res.* 53: 230-233.

BOUNOUS, D.I., BOUDREAUX, M.K., HOSKINS, J.D. (1995): The Hematopoietic and Lymphoid Systems. In: HOSKINS, J.D. (ed.), *Veterinary Pediatrics – Dogs and Cats from Birth to Six Months*. 2nd edition. WB Saunders, Philadelphia, pp. 337-376.

BREAZILE, J.E. (1978): Neurologic and behavioral development in the puppy. *Vet. Clin. North. Am.* 8:31.

BULGIN, M.S., MUNN, S.L., WILLIAM, G. (1970): Hematological changes to four and one-half years of age in clinically normal beagles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 157: 1064.

BUSCHMANN, H. (1990): Infektionsabwehr. In: *Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere*. Hrsg.: Walser/Bostedt, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S. 30-35.

CAMPBELL, J.M., FAHEY, G.C., WOLF, B.W. (1997): Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J.Nutr.* 127: 130-136.

CARR F.J., CHILL, D., MAIDA, N.(2002): The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 281-370.

CHANDLER, M.L. (1992): Pediatric normal blood values. In: Kirk, R.W., Bonagura, J.D. (eds) *Current Veterinary Therapy XI*, vol. 1, pp. 981-984. Philadelphia, WB Saunders.

CHANDLER, M.L., MILLER, E., OLSON, P.N., RALSON, S.L. (1993): Serum chemistry and lipid profiles in neonatal beagle puppies fed homemade milk replacer formulas.

Cornell Vet. 83: 107-116.

CRITTENDEN, R.G. (1999): Prebiotics. In: G.W. Tannock (ed.), Probiotics – A Critical Review, Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K., pp. 141-156.

CUMMINGS, J.H., MACFARLANE, G.T. (1997): Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism.

Clin. Nutr. 16: 3-11.

DELZENNE, N., AERTSENS, J., VERPLAETSE, H., ROCCARO M., ROBERFROID, M. (1995): Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat.

Life Sci. 57: 1579-1587.

DE SIMONE, C., VESELY, R., SALVADORI, B., JIRILLO, E. (1993): The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals.

Int. J. Immunother. 9: 23-28.

EARL, F.L., MELVEGAR, B.A., WILSON, R.L. (1973): The hemogram and bone marrow profile of normal neonatal and weanling beagle dogs.

Lab. Anim. Sci. 23: 690-695.

ERHARD, M.H., LÖSCH, U., STANGASSINGER, M. (1995): Untersuchungen zur intestinalen Absorption von homologen und heterologem Immunglobulin G bei neugeborenen Kälbern.

Z. Ernährungswiss. 34: 160-163.

FERNANDES, C.F., SHAHANI K.M., AMER, M.A. (1987): Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products.

FEMS Microbiol. Rev. 466: 343-56.

FULLER, R. (1989): Probiotics in man and animals.
J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.

FULLER, R. (1991): Probiotics in human medicine.
Gut 32: 439-442.

FULLER, R. (1992): History and development of probiotics. In: FULLER, R. (ed.),
Probiotics: the scientific base, Chapman & Hall, London, pp. 1-7.

GIBSON, G.R., SAAVEDRA, J.M., MACFARLANE, S., MACFARLANE, G.T. (1993):
Probiotics and intestinal infections. In: FULLER, R. (ed.), Probiotics: therapeutic and
other beneficial effects. Chapman and Hall, London, pp. 10-39.

GIBSON, G.R., ROBERFROID, M.B. (1995): Dietary modulation of the human
colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.
J. Nutr. 125: 1401-1412.

GIBSON, G.R., COLLINS, M.D. (1999): Concept of balanced colonic microbiota,
prebiotics, and synbiotics. In: Probiotics, other nutritional factors, and intestinal
microflora. Nestle Nutrition Workshop Series 42: 139-156.

GOLDIN, B.R. (1998): Health benefits of probiotics.
Br. J. Nutr. 80, Suppl. 2: S203-S207.

GRECO, D.S., PARTINGTON, B.P. (1995): The physical examination and diagnostic
imaging techniques. In: HOSKINS, J.D. (ed.), Veterinary Pediatrics – Dogs and Cats
from Birth to Six Months. 2nd edition. WB Saunders, Philadelphia, pp. 1-21.

GUARNER, F., SCHAAFSSMA, G.J. (1998): Probiotics.
Int. J. Food Microbiol. 39: 237-238.

HAMILTON-MILLER, J.M.T. (1999): Nutrition discussion forum- Efficacy studies of
probiotics: a call for guidelines.
Br. J. Nutr. 82: 73-75.

- HAVENAAR, R., HUIS IN'T VELD, J.H.J. (1992): Probiotics: a general view.
In: WOOD, B. (ed.), The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Elsevier Applied Science, London, pp. 209-224
- HEDHAMMAR, A., WU, F., KROOK, L. (1974): Overnutrition and skeletal disease.
Cornell Vet. 64 (Suppl. 5): 1-160.
- HEIRD, W.C., SCHWARZ, S.M., HANSEN, I.H. (1984): Colostrum-induced enteric mucosal growth in beagle puppies.
Ped. Res. 18: 512-515.
- HOSGOOD, G., HOSKINS, J.D. (1995): Physical examination and related diagnostic procedures. In: Small animal pediatric medicine and surgery. Butterworth/Heinemann-Verlag, Oxford.
- HOSKINS, J.D. (1995): Nutrition and nutritional disorders. In: HOSKINS, J.D. (ed.), Veterinary Pediatrics - Dogs and Cats from Birth to Six Months. 2nd edition. WB Saunders, Philadelphia, pp. 511-524.
- HOSKINS, J.D. (1999): Pediatric Health Care and Management.
Vet. Clin. North. Am. 29: 837-852.
- ISOLAURI, E., MAJAMAA, H., ARVOLA, T., RANTALA, I., VIRTANEN, E., ARVILOMMI, H. (1993): Lactobacilli casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats.
Gastroenterol. 105:1643-1650.
- ISOLAURI E., JOENSUU, J., SOUMALAINEN, H., LUOMALA, M., VESIKARI, T. (1995): Improved immunogenicity of oral Dx RRV reassortant rotavirus vaccine by Lactobacillus casei GG.
Vaccine 13: 310-312.

JAIN, N.C. (1986): Schalm's Veterinary Hematology, 4. Aufl., Lea & Febiger, Philadelphia.

JOHNSON, C.A., CRACE, J.A. (1987): Care of newborn puppies and kittens. Kal. Kann. Forum 6:9.

KIENZLE, E., MEYER, H., DAMMERS, C., LOHRIE, H. (1985): Milchaufnahme, Gewichtsentwicklung, Milchverdaulichkeit sowie Energie- und Nährstoffretention bei Saugwelpen.

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

KIENZLE, E., LANDES, E. (1995): Aufzucht verwaister Jungtiere. Teil I: Indikationsstellung und Zusammensetzung der Muttermilch. Teil II: Herstellung von Milchaustauschern und praktische Durchführung der mutterlosen Aufzucht. Kleintierpraxis 40: 681-700.

KIENZLE, E. (1999): Aufzucht von Jungtieren ohne Muttermilch. Handlexikon der tierärztlichen Praxis 205: 56-56i.

KRAFT, W. (1999): Hämatologie. In: Kraft/Dürr (Hrsg.), Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 5. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart, S. 43-77.

LAHRSEN, M., ZENTEK, J. (2002): Wirksamkeit von probiotischen Mikroorganismen als Futterzusatzstoff: Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierkategorien Hund, Katze und Pferd. Dtsch. tierärztl. Wschr. 109: 22-25

LATIMER, K.S., MEYER, D.J. (1989): Leukocytes in health and disease. In: Ettinger S.J. (ed.), Textbook of Veterinary Internal Medicine: Disease of the dog and cat. WB Saunders, Philadelphia, p. 2239.

LEE, W.J., FARMER, J.L., HILTY, M., KIM, Y.B. (1998): The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets. Infect. Immun. 66: 1421-1426.

- LEE, Y.K., SALMINEN, S. (1995): The coming of age of probiotics.
Trend. Food Sci. Technol. 6: 241-245.
- LEIBETSEDER, J. (1989): Ernährung der Zuchthündin und der Junghunde.
Prakt. Tierarzt 7: 12-20.
- LEWIS, L.D., MORRIS, M.L., jr, HAND, M.S. (1987): Small Animal Clinical Nutrition
III. Topeka, Kann, Mark morris Associates.
- LINK-AMSTER, H., ROCHAT, F., SAUDAN, K.Y., MIGNOT, O., AESCHLIMANN,
J.M. (1994): Modulation of a specific humoral immune response and changes in
intestinal flora mediated through fermented milk intake.
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 10: 55-64.
- LUND, C., KUHL, S., MISCHKE, R., GÜNZEL-APEL, A.R. (2000): Reference values
of the red blood profile in beagle, German shepherd and golden retriever puppies.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 113: 447-453.
- MALIN, M., SUOMALAINEN, H., SAXELIN, M., ISOLAURIE, E. (1996): Promotion of
IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with
Lactobacillus GG.
Ann. Nutr. Met. 40: 137-145.
- MAPLETOFT, R.J., SCHUTTE, A.P., COUBROUGH, R.I., KUHNE, R.J. (1974): The
perinatal period of dogs: nutrition and management in the hand rearing of puppies.
J. S. Afr. Vet. Med. Ass. 45: 183.
- MARTEAU, P., POCHART, P., BOUHNİK, Y., RAMBAUD, J.C. (1993): Fate and
effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract.
World Rev. Nutr. Diet 74:1-21.
- MEIXNER, G. (1968): Untersuchungen zur mutterlosen Welpenaufzucht mit
verschiedenen Trockenmilchpräparaten.
Vet. Med. Diss. München.

- METCHNIKOFF, E. (1908): The Prolongation of Life. Putmans Sons, New York.
- MEURMAN, J.H., ANITLA, H., KORHONEN, A., SALMINEN, S. (1995): Effect of Lactobacillus rhamnosus strain GG (ATCC 53103) on the growth of Streptococcus sobrinus in vitro.
Eur. J. Oral Sci. 103: 253-258.
- MEYER, H., MUNDT, H.C., THOMÉE, A., RAUCHFUSS, R. (1981): Zum Mineralstoffwechsel von Saugwelpen sowie graviden und laktierenden Hündinnen.
Kleintierpraxis 26 : 115-120.
- MEYER, H., KIENZLE, E., HANNES, M., MUNDT, H.C. (1984) : Aufgeschlossene Milch als Hundenahrung.
Kleintierpraxis 29 : 281-340.
- MEYER, H., DAMMERS, C., KIENZLE, E. (1985): Körperzusammensetzung neugeborener Welpen und Nährstoffbedarf tragender Hündinnen.
Adv. An. Phys. Nutr. 16: 7-25.
- MEYER, H., HECKÖTTER, E. (1986): Futterwerttabellen für Hunde und Katzen.
Schlütersche Verlaganstalt und Druckerei, Hannover.
- MEYER, H., ZENTEK, J. (1998): Ernährung des Hundes. Grundlagen, Fütterung, Diätetik.
3. Auflage, Parey Verlag.
- MILLER, J.K., BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E., MADSEN, F.C. (1993): Oxidative Stress, Antioxidants and Animal Function.
J. Dairy Sci. 76: 2812-2823.
- MIRMIRAN, M. (1986): The importance of fetal/neonatal REM sleep.
Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 21: 283-291.

MIZOTA, T. (1996): Lactulose as a growth promoting factor for Bifidobacterium and its physiological aspects.

Bull. Int. Dairy Fed. 313: 43-48.

MOLITOR, D. (1996): In-vitro- und in-vivo-Effekte eines Probiotikums (Enterococcus faecium) als Futterzusatz bei Hunden. Vet. Med. Diss. Hannover.

MONSON, W.J. (1987): Orphan rearing of puppies and kittens.

Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 17: 567-576.

MOSIER, J.E. (1978): The puppy from birth to six weeks.

Vet. Clin. North. Am. 8: 79-100.

MUEGLER, P.A., PETERSON, J.S., KOLER, R.D. (1979): Post-natal regulation of oxygen delivery: Hematologic parameters of postnatal dogs.

Am. J. Physiol. 237: H71-H75.

MUNDT, H.-C., THOMÉE, A., MEYER, H. (1981): Zur Energie- und Eiweißversorgung von Saugwelpen über die Muttermilch.

Kleintierpraxis 26:353-360.

MUNDT, H.-C. (1989): Die mutterlose Aufzucht von Hundewelpen.

Prakt. Tierarzt 7: 21-25.

MURALIDHARA, K.S, SHEGGEY, G.G., ELLIKER, P.R., ENGLAND, D.C., SANDINE E. (1977): Effect of feeding lactobacilli on the coliform and Lactobacillus flora of the intestinal tissue and feces from pigs.

J. Food Prot. 40: 288-295.

NOLD, J.B., MILLER, G.K., BENJAMIN, S.A. (1987): Prenatal and Neonatal Irradiation in Dogs: Hematologic and Hematopoietic Responses.

Radiat. Res. 112: 490-499.

NOUSIAINEN, J. (1991): Comparative observations on selected probiotics and olaquinox used as feed additives for piglets around weaning. 2. Effect on villus length and crypt depth in the jejunum, ileum, caecum and colon.

Fortsch. Tierphysiol. Tierernähr. 66: 224-230.

OFTEDAL, O.T. (1984): Lactation in the dog: milk composition and intake by puppies.

J. Nutr. 114: 803-12.

PARASHAR, U.D., BRESEE, J.S., GENTSCH, J.R., GLASS, R.I. (1998): Rotavirus.

Emerg. Infect. Dis. 4: 561-570.

PASUPATHY, K., SAHOO, A., PATHAK, N.N. (2001): Effect of lactobacillus supplementation on growth and nutrient utilization in mongrel pups.

Arch. Tierernähr. 55: 243-53.

POFFENBARGER, E.M., OLSON, P.N., CHANDLER, M.L., SEIM, H.B., VARMAN, M. (1991): Use of adult dog serum as a substitute for colostrum in the neonatal dog.

Am. J. Vet. Res. 52: 1221-1224.

RAKOWSKA, M., REK-CIEPLY, A., SOT., A., LIPINSKA, E., KUBINSKI, T., BARCZ, I, AFANASJEW, B. (1993): The effect of ruy, probiotics and nisine on faecal flora and histology of the small intestine of chicks.

J. Anim. Feed Sci 2: 73-81.

ROBERFROID, M.B. (1998): Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties.

Br. J. Nutr. 80 (Suppl. 2): S197-S202.

ROBERFROID, M.B., VAN LOO, J.A.E., GIBSON, G.R. (1998): The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products.

J. Nutr. 128: 11-19.

ROBERFROID, M. (2002): Functional food concept and its application to prebiotics.

Dig. Liver Dis. 34 Suppl.2: S105-110.

ROBINSON, I.M., WHIPP, S.C., BUCKLIN, J.A., ALLISON, M.J. (1984): Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs.

Appl. Environ. Microbiol. 41: 950-955.

ROWLAND, I. (1995): Modification of gut flora metabolism by probiotics and oligosaccharides.

Old Herborn Univ. Semin. Monogr. 8: 35-46.

ROLFE, R.D. (1996): Colonization resistance. In Mackie, White, Isaacson (ed.): Gastrointestinal microbiology Vol.2, Chapman and Hall, New York, pp. 501-536

ROLFE, R.D. (2000): The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health.

J. Nutr. 130: 396S-402S.

RÜSSE, M., SCHWAB, A. (1990): Erkrankungen bei Hunde- und Katzenwelpen. In: Walser/Bostedt (Hrsg.), Neugeborenen- und Säuglingskrankheiten der Tiere, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 463-507.

SALMINEN, S, LAINE, M., von WRIGHT, A., VUOPIO-VARKILA, J., KORHONEN T., MATTILA-SANDHOLM, T. (1996): Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach.

Biosci. Microflora 15: 61-67.

SANDERS, M.E. (2000): Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health.

J. Nutr. 130: 384S-390S.

SCHWARZER, J. (2003): Einfluß probiotischer Substanzen auf den antioxidativen Status neugeborener Hundewelpen. Vet. Med. Diss., München.

SHEFFY, B.E. (1978): Nutrition and Nutritional Disorders.

Vet. Clin. North. Am. 8:7-29.

SILVA, M., JACOBUS, N.V., DENEKE, C., GORBACH, S.L. (1987): Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain.

Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1231-1233.

SIMPSON, J.M., MARTINEAU, B., JONES W.E., BALLAM, J.M., MACKIE, R.I. (2002): Characterization of fecal bacterial populations in canines: effect of age, breed and dietary fiber.

Microb. Ecol. 44: 186-197.

STOHRER, M., LUTZ, S., STANGASSINGER, M. (2002): Antioxidant status of animals is weakened after birth.

Proc. Soc. Nutr. Physiol. 11: 35.

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.

J. Nutr. 132: 3721-3731.

TEMMERMAN, R., POT, B., HUYS, G., SWINGS, J. (2002): Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products.

Int. J. Food Microbiol. 81:1-10.

TERAGUCHI, S., SHIN, C., OGATA, T., KINGAKU, M., KAINO, A., MIYAUCHI, H., FUKUWATARI, Y., SHIMAMURA, S. (1995): Orally administered bovine lactoferrin inhibits bacterial translocation in mice fed bovine milk.

Appl. Environ. Microbiol. 61: 4131-4134.

TIZARD, I.R. (2000): Immunity in the Fetus and Newborn.

In: Veterinary Immunology – An Introduction. Sixth Edition, WB Saunders Company, pp. 210-221.

THOMÉE, A. (1978): Zusammensetzung, Verdaulich- und Verträglichkeit von Hundemilch und Mischfutter bei Welpen unter besonderer Berücksichtigung der Fettkomponente.

Vet. Med. Diss. Hannover.

VELDMAN, A. (1992). Probiotics. Tijdschr Diergeneeskd 117: 345-248.

VERSTEGEN, J.P., ONCLIN, K., SILVA, L.D.M., CONCANNON, P.W. (1999): Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergolin in dogs.

Theriogenology 51: 597-611.

WALSER, K. (1990): Anatomische und physiologische Grundlagen des Neugeborenen – Blut. In: Walser/Bostedt (Hrsg.), Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S. 1-35.

WARD, D.M., WELLER, R., BATESON, M.M. (1990): 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community.

Nature 345: 63-65.

WEESE, J.S., ANDERSON, M.E.C. (2002): Preliminary evaluation of Lactobacillus rhamnosus strain GG, a potential probiotic in dogs.

Can. Vet. J. 43: 771-774.

ZENTEK, J., MEYER, H., DÄMMRICH, K. (1995): Über den Einfluss einer unterschiedlichen Energieversorgung wachsender Doggen auf Körpermasse und Skelettentwicklung. 3. Mitteilung: Klinisches Bild und chemische Skelettuntersuchungen.

J. Vet. Med. A 42: 69-80.

ZENTEK, J. (1999): Skeletterkrankungen bei Junghunden: ernährungsbedingte Pathogenese.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 106: 53-84.

ZENTEK, J., HALL, E.J., GERMAN, A., HAVERSON, K., BAILEY, M., ROLFE, V., BUTTERWICK, R., DAY, M.J. (2002): Morphology and Immunopathology of the Small and Large Intestine in Dogs with Nonspecific Dietary Sensitivity. J.Nutr.132:1652S-1654S.