

Aus dem Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Einsatz von mittelkettigen  
Fettsäuren und kurzkettigen organischen Säuren in der Fütterung von  
Absetzferkeln**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Fabienne Ferrara  
Tierärztin aus Lörrach

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3567

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wilfried Meyer  
Dritter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Jörg Aschenbach

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

piglets, medium chain fatty acids, short chain fatty acids, feed additives, diet, pH, buffering capacity, antimicrobial properties, morphology, small intestine, local immunity

Tag der Promotion: 13.06.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*  
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-189-5

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

*Meinen Eltern*

*-Das einzige Wichtige im Leben sind die Spuren der Liebe, die wir  
hinterlassen, wenn wir gehen-*

*Albert Schweizer*



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literatur .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Durchführung und Bedeutung des konventionellen Absetzens für die Tiergesundheit .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Einfluss des Absetzens auf die Morphologie und Physiologie des Dünndarms.....</b>	<b>3</b>
2.2.1 Histologischer Aufbau der Darmwand.....	3
2.2.2 Entwicklung und Veränderungen der Dünndarmmorphologie und -physiologie während Säugezeit und Absetzphase .....	4
<b>2.3 Einfluss des Absetzen auf die Funktionalität des lokalen Immunsystems im Dünndarm .....</b>	<b>6</b>
2.3.1 Aufbau und Struktur des darmassoziierten lokalen Immunsystems beim Schwein..	6
2.3.2 Entwicklung des lokalen Immunsystems im Dünndarm über die Säugezeit und Absetzphase.....	9
2.3.3 Bedeutung des lokalen darmassoziierten Immunsystems für die morphologischen Veränderungen im Dünndarm der Ferkel während der Absetzphase .....	10
<b>2.4 Entwicklung der Mikrobiota über die Säuge- und Absetzphase bei Ferkeln.....</b>	<b>11</b>
2.4.1 Entwicklung der Mikrobiota im GI-Trakt in der Säuge- und Absetzzeit.....	11
2.4.2 Einfluss der Mikrobiota auf die Entwicklung der Darmmorphologie und der darmassoziierten Immunität im Dünndarm.....	12
<b>2.5 <i>Escherichia coli</i> assoziierte gastrointestinale Erkrankungen beim Absetzferkel... </b>	<b>12</b>
<b>2.6 Kurzkettige organische Säuren in der Fütterung von Absetzferkeln .....</b>	<b>15</b>
2.6.1 Einteilung, Vorkommen, chemische und physikalische Eigenschaften.....	15
2.6.2 Verdauung, Absorption und Intermediärstoffwechsel .....	16
2.6.3 Einsatz von KOS in der Fütterung von Absetzferkeln.....	17
<b>2.7 Mittelkettige Fettsäuren in der Fütterung von Absetzferkeln .....</b>	<b>20</b>
2.7.1 Chemische Struktur und natürliches Vorkommen .....	20
2.7.2 Chemische und physikalische Eigenschaften.....	20
2.7.3 Verdauung, Absorption und Metabolisierung.....	21
2.7.4 Einstufung der Toxizität von MKFS.....	22
2.7.5 MKFS als Energiequelle und Auswirkung auf die biologische Leistung von Absetzferkeln .....	23
2.7.6 Einfluss von MKFS auf die Morphologie und das lokale darmassoziierte Immunsystem im Dünndarm .....	23
2.7.7 Einfluss von MKFS auf die gastrointestinale Mikrobiota bei Absetzferkeln .....	24
<b>2.8 Fragestellung und Versuchsziel .....</b>	<b>26</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Versuchstiere .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Haltung.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 Versuchsfutter und Fütterung .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Versuchsdurchführung.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5 Sektionsgang und Probengewinnung .....</b>	<b>30</b>
<b>3.6 Futtermitteluntersuchungen .....</b>	<b>32</b>
3.6.1 Rohnährstoffe (Weender Analyse).....	32
3.6.2 Mineralstoffe und Spurenelemente .....	33
3.6.3 Säurebindungskapazität.....	33
3.6.4 Quantifizierung der Futterzusatzstoffe.....	34
<b>3.7 Erhebung zootechnischer Parameter .....</b>	<b>38</b>

<b>3.8 Verdauungsphysiologische Parameter .....</b>	<b>38</b>
3.8.1 pH-Wert der Digesta .....	38
3.8.2 Trockensubstanz der Digesta .....	38
3.8.3 Praecaecale und Gesamtverdaulichkeit der Nährstoffe.....	39
<b>3.9 Bestimmung der mittelkettigen Fettsäuren in der Digesta.....</b>	<b>40</b>
<b>3.10 Mikrobiologische Parameter .....</b>	<b>40</b>
3.10.1 Quantifizierung der Laktobazillen und Enterobakterien mittels qPCR .....	40
3.10.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis von <i>E. coli</i> -Pathogenitätsfaktoren .....	43
3.10.3 Bakterielle Metaboliten .....	46
<b>3.11 Histologische Aufarbeitung der Darmwandproben.....</b>	<b>49</b>
<b>3.12 Färbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Eosin .....</b>	<b>50</b>
<b>3.13 Immunhistochemischer Nachweis jejunaler CD3<sup>+</sup>-IEL .....</b>	<b>51</b>
3.13.1 Puffer und Lösungen für histologische- und immunhistochemische Arbeiten.....	54
<b>3.14 Dokumentation und Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Analysen .....</b>	<b>55</b>
<b>3.15 Nachweis IEL mittels Durchflusszytometrie .....</b>	<b>57</b>
<b>3.16 Statistische Auswertungen.....</b>	<b>61</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Versuchsdiäten .....</b>	<b>62</b>
<b>4.2 Gesundheitsbeurteilung .....</b>	<b>64</b>
<b>4.3 Zootecnische Parameter .....</b>	<b>64</b>
4.3.1 Futteraufnahme und Futteraufwand .....	64
4.3.2 Lebendmasse und Lebendmassezunahme .....	64
<b>4.4 Verdauungsphysiologische Parameter .....</b>	<b>68</b>
4.4.1 pH-Wert der Digesta .....	68
4.4.2 Trockensubstanzgehalt der Digesta.....	68
4.4.3 Scheinbare praecaecale und Gesamtverdaulichkeiten von Trockensubstanz, Rohprotein und Rohfett.....	68
<b>4.5 Bestimmung der mittelkettigen Fettsäuren in der Digesta.....</b>	<b>69</b>
<b>4.6 Mikrobiologische Parameter .....</b>	<b>74</b>
4.6.1 Quantifizierung der Laktobazillen und Enterobakterien mittels qPCR .....	74
4.6.2 Qualitativer Nachweis von <i>E.coli</i> -Pathogenitätsfaktoren mittels MPCR .....	74
4.6.3 Quantitativer Nachweis von <i>E.coli</i> -Pathogenitätsfaktoren mittels qPCR.....	75
4.6.4 Bakterielle Metaboliten .....	78
<b>4.7 Messung von Darmzottenlänge und Kryptentiefe im mittleren Jejunum .....</b>	<b>83</b>
<b>4.8 Quantifizierung CD3<sup>+</sup>-IEL im mittleren Jejunum mittels Immunhistochemie .....</b>	<b>83</b>
<b>4.9 Quantifizierung IEL im mittleren Jejunum mittels Durchflusszytometrie.....</b>	<b>85</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>88</b>
<b>5.1 Hintergrund der Arbeit und Versuchsziele .....</b>	<b>88</b>
<b>5.2 Bewertung des Studiendesigns und der Versuchsdurchführung.....</b>	<b>88</b>
5.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	88
5.2.2 Fütterungsgruppen und Studiendesign .....	88
5.2.3 Versuchsdurchführung .....	89
<b>5.3 Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>89</b>
5.3.1 Einflüsse von MKFS und KOS auf verdauungsphysiologische Parameter.....	89
5.3.2 Einflüsse von MKFS und KOS auf die gastrointestinale Mikrobiota unter besonderer Berücksichtigung der pH-Wert Absenkung im vorderen GI-Trakt.....	92
5.3.3 Einflüsse von MKFS und KOS auf das lokale darmassoziierte Immunsystem im Dünndarm.....	96
<b>5.4 Schlussfolgerung.....</b>	<b>98</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>

<b>7. Summary .....</b>	<b>101</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>125</b>
<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>131</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>134</b>

**Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:** Darstellung der im Dünndarm des Schweines nachgewiesenen Zelloberflächenmoleküle auf IEL ..... 8

**Tabelle 2:** Zusammenstellung der chemischen und physikalischen Eigenschaften von KOS, die in der Fütterung von Schweinen verwendet werden ..... 16

**Tabelle 3:** Prozentualer Anteil der undissoziiert Form ausgewählter Carbonsäuren in Abhängigkeit vom pH-Wert (Schelhorn, 1951)..... 16

**Tabelle 4:** Chemische Eigenschaften von Capron-, Capryl-, Caprin- und Laurinsäure (Beckett und Moffat, 1969; Hsiao und Siebert, 1999) ..... 21

**Tabelle 5:** Übersicht über die verschiedenen Versuchsgruppen und Diäten ..... 28

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Grundfuttermischung und Futterzusatzstoffe aller Ferkel nach Angaben des Herstellers (*Vitamex, Belgien*) ..... 29

**Tabelle 7:** Für die Futteruntersuchungen eingesetzte Geräte und Chemikalien..... 34

**Tabelle 8:** Für die Laktatbestimmung genutzte Geräte und Chemikalien..... 36

**Tabelle 9:** Für die Gaschromatographie genutzten Geräte und Chemikalien ..... 37

**Tabelle 10:** Für die Messung des pH-Werts, der Trockensubstanz, der praecaecalen und Gesamtverdaulichkeit genutzte Geräte und Chemikalien ..... 40

**Tabelle 11:** Für die qPCR genutzte Primer ..... 41

**Tabelle 12:** Reaktionsbedingungen und PCR-Parameter ..... 42

**Tabelle 13:** Für die DNA-Aufbereitung und für die Durchführung der qPCR verwendeten Geräte und Chemikalien..... 42

**Tabelle 14:** PCR-Programm für die *E. coli*-MPCR („touchdown PCR”)..... 44

**Tabelle 15:** Für die MPCR genutzten Geräte und Chemikalien..... 44

**Tabelle 16:** Für die MPCR verwendeten Primerpaare zum Nachweis von *E. coli* Pathogenitätsfaktoren (Bosworth and Casey, 1997) ..... 45

**Tabelle 17:** Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von Ammonium ..... 48

**Tabelle 18:** Für den immunhistochemischen Nachweis CD3<sup>+</sup>-IEL verwendete Primärantikörper..... 51

**Tabelle 19:** Für die histologische und immunhistochemische Aufarbeitung genutzten Geräte und Chemikalien ..... 55

**Tabelle 20:** Für die Phänotypisierung IEL verwendeten Primärantikörper..... 57

**Tabelle 21:** Für die Phänotypisierung IEL verwendeten Sekundärantikörper ..... 58

**Tabelle 22:** Für die durchflusszytometrischen Analysen benötigten Geräte und Materialien 60

**Tabelle 23:** Rohnährstoff-, Mineralstoff- und Spurenelementgehalte sowie Säurebindungskapazität der eingesetzten Mischfuttermittel (Mittelwert<sup>1</sup>)..... 63

**Tabelle 24:** Analysierte Konzentrationen der zugesetzten Futterzusatzstoffe in den Versuchsdiäten (Mittelwert<sup>1</sup>) ..... 63

**Tabelle 25:** Mittlere tägliche Futtermittelaufnahme (kg) der vier Versuchsgruppen am Ende der einzelnen Fütterungswochen und über die gesamte Versuchszeit (Mittelwert und Standardabweichung) ..... 66

**Tabelle 26:** Futtermittelaufwand der vier Versuchsgruppen am Ende der einzelnen Fütterungswochen und über den Gesamtversuchszeitraum (Mittelwert und Standardabweichung) ..... 66

**Tabelle 27:** Mittlere Lebendmasse (kg) der vier Versuchsgruppen am Tag der Einstallung und am Ende der einzelnen Fütterungswochen (Mittelwert und Standardabweichung)..... 67

**Tabelle 28:** Mittlere tägliche Lebendmassezunahme (kg) der vier Versuchsgruppen am Ende der einzelnen Fütterungswochen und über die gesamte Versuchszeit (Mittelwert und Standardabweichung) ..... 67

**Tabelle 29:** Mittlere pH-Werte der Digesta der untersuchten Lokalisationen des GI-Trakts der Versuchsferkel der vier Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung) ..... 70

<b>Tabelle 30:</b> Trockensubstanz (% der uS) aus der Digesta der untersuchten Lokalisationen des GI-Trakts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung) .....	71
<b>Tabelle 31:</b> Scheinbare praecaecale und Gesamtverdaulichkeit der Trockensubstanz, des Rohproteins und des Rohfetts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (% der Aufnahme) (Mittelwert und Standardabweichung).....	72
<b>Tabelle 32:</b> Konzentration der Capryl- und Caprinsäure (g/kg uS) der Digesta des vorderen GI-Trakts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Median (Minimum-Maximum) .....	73
<b>Tabelle 33:</b> Mittlere Zellzahl [ $\log_{10}$ Zellen/g Digesta (uS)] von Laktobazillen und Enterobakterien der untersuchten Lokalisationen im GI-Trakt der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung).....	76
<b>Tabelle 34:</b> Mittlere Zellzahlen [ $\log_{10}$ Zellzahl/g Digesta (uS)]pathogener <i>Escherichia coli</i> im Kolon der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung) .....	77
<b>Tabelle 35:</b> Gesamtkonzentration der kurzkettigen Fettsäuren (mmol/kg (uS)) in der Digesta der untersuchten Lokalisationen des GI-Trakts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung) .....	79
<b>Tabelle 36:</b> Prozentualer Anteil der einzelnen kurzkettigen Fettsäuren in Bezug auf die Gesamtmenge in der Digesta (uS) der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Median (Minimum-Maximum)).....	80
<b>Tabelle 37:</b> D- und L-Laktat Konzentrationen (mmol/kg uS) der Digesta der untersuchten Lokalisationen des GI-Trakts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Median (Minimum-Maximum)) .....	81
<b>Tabelle 38:</b> Konzentration des Ammoniums (mmol/kg (uS)) der Digesta der untersuchten Lokalisationen des GI-Trakts (Mittelwert und Standardabweichung).....	82
<b>Tabelle 39:</b> Anzahl CD3 <sup>+</sup> -IEL pro 100 Enterozyten im mittleren Jejunum der Ferkel der drei Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung).....	85
<b>Tabelle 40:</b> Anteile der IEL im mittleren Jejunum der Ferkel der drei Versuchsgruppen. Angaben in % der detektierten Lymphozyten im Epithel (Mittelwert und Standardabweichung) .....	86
<b>Tabelle 41:</b> Anteile der IEL im mittleren Jejunum der Ferkel der drei Versuchsgruppen pro 100 Enterozyten (Mittelwert und Standardabweichung) .....	87
<b>Tabelle 42:</b> Einteilung der im Epithel vorkommenden IEL-Population anhand der in dieser Arbeit nachgewiesenen CD-Moleküle und Kalkulation pro 100 Enterozyten (absolute Werte) am Beispiel der Kontrollgruppe .....	87
<b>Tabelle 43:</b> Bewertungsschema des Gesundheitszustands aller Versuchstiere (Buchheit 2009).....	125
<b>Tabelle 44:</b> Auswertung des Gesundheitszustandes der Ferkel der verschiedenen Fütterungsgruppen für jede Versuchswoche anhand des festgelegten Bonitierungsschlüssels (Mittelwert und Standardabweichung).....	126
<b>Tabelle 45:</b> Für die qPCR verwendeten Referenzstämme zur Bestimmung der Laktobazillen.....	128
<b>Tabelle 46:</b> Für die qPCR verwendeten Referenzstämme zur Bestimmung der Enterobakterien .....	129

**Abbildungsverzeichnis**

**Abbildung 1:** Entnahmestellen der Gewebe- und Digestaproben..... 31

**Abbildung 2:** Darstellung der Dünndarmschleimhaut und schematische Markierung der Bestimmung von Zottenlänge und Kryptentiefe am mittleren Jejunum eines 53 Tage alten Ferkels (LM, HE, 4 x ) ..... 56

**Abbildung 3:** Agarosegel zur Darstellung vorkommender *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren im Kolon der Versuchsferkel mittels MPCR..... 75

**Abbildung 4:** Darstellung der gemessenen Villuslänge und Kryptentiefe an den Gewebeschnitten des mittleren Jejunums ..... 83

**Abbildung 5:** Beispiel für immunhistochemisch (braun) gefärbte CD3<sup>+</sup>-IEL im mittleren Jejunum (Kontrolltier)..... 84

**Abbildung 6:** Isotypenkontrolle des Primärantikörpers PPT3 im mittleren Jejunum (Kontrolltier) ..... 85

**Abkürzungsverzeichnis**

x g	Erdbeschleunigung	LM	Lichtmikroskop
®	eingetragenes Warenzeichen	mEq	Milliequivalente
Abb.	Abbildung	mgr.	mittelgradig
BGU	engl. Beta (β-) Gluconase Unit	MHC	Major Histocompatibility Complex
BHT	Butylhydroxytoluol	MHK	Minimale Hemmkonzentration
bp	Basenpaare	MKFS	mittelkettige Fettsäuren
DA	Dalton (atomare Masseneinheit)	MK-TG	mittelkettige Triglyzeride
DNA	engl. Deoxyribonucleic Acid	MPCR	Multiplex PCR
DTT	Dithiothreitol	p.a.	lat. pro analysi
EC	engl. Enzyme Classification	PBS	engl. phosphate buffered saline
EDTA	engl. Ethylenediaminetetraacetic Acid	PCR	Polymerasekettenreaktion
et al.	et alii (und andere)	PE	Polyethylen
FBG	Fungal Beta Gluconase unit	pH	negativer dekadischer Logarithmus des Zahlenwerts der H <sup>+</sup> -Aktivität
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	pKs	negativer dekadischer Logarithmus des Zahlenwerts der Säurekonstanten (Ks)
FXU	engl. Farvet Xylanase Unit	p.n.	Lat. post natal
FYT	engl. Feed Phytase Activity	qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
GC	Gaschromatographie	rDNA	ribosomale DNA
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt	RNase	Ribonuklease
ggr.	geringgradig	rDNA	ribosomale DNA
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution	SCFA	engl. Short Chain Fatty Acids
HE	Hämatoxylin-Eosin	Syn.	Synonym
hgr.	hochgradig	ssp.	Subspezies
HRP	engl. Horseradish Peroxidase	Tab.	Tabelle
IHC	Immunhistochemie	TcR	engl. T cell receptor
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten	TS	Trockensubstanz
Ig	Immunglobulin	U.S.	engl. United States
IL	Interleukin	uS	ursprüngliche Substanz
KbE	Koloniebildende Einheit	VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
KM	Körpermasse		
KOS	Kurzkettige organische Säuren	w	Gewichtseinheit
LKFS	Langkettige Fettsäuren		
LK-TG	Langkettige Triglyzeride		
LPS	Lipopolysaccharide		



## 1. Einleitung

Die Zeit nach dem Absetzen stellt für Ferkel eine kritische Phase dar. Durch Umweltveränderungen, Transport, sozialen Stress durch Trennung von der Mutter sowie Rangordnungskämpfe sind die Tiere in dieser Zeit zahlreichen Belastungsfaktoren ausgesetzt. Die meist abrupte Umstellung des Nahrungsangebots von Sauenmilch auf ein Ferkelaufzuchtfutter wirkt zudem belastend auf den Organismus der Ferkel. Die Änderung der Nahrungskomposition nimmt entscheidenden Einfluss auf die Futteraufnahme der Ferkel und Energiedichte in der Ration. Weiterhin werden das Ausmaß der mit dem Absetzen einhergehenden Veränderungen der Darmmorphologie bzw. -physiologie ebenso wie ablaufende immunologische Reaktionen im Darm und die Zusammensetzung der Mikrobiota beeinflusst. Sie gilt insofern als wichtiger Schlüsselfaktor für die Entstehung und Manifestierung gastrointestinaler Erkrankungen in Verbindung mit geringen Zuwachsraten nach dem Absetzen (Le Dividich und Sève, 2000; Lallès et al., 2004, 2007; Zabielski et al., 2008). Dieses Problem wurde in der Vergangenheit in gewissem Umfang durch den Einsatz von Futterzusatzstoffen mit antibiotischer Wirkung maskiert. Durch die EU-Verordnung (EG) 1831/2003 besteht seit Anfang 2006 ein Einsatzverbot für antibiotische Leistungsförderer. Damit ergibt sich die Notwendigkeit Alternativen zu entwickeln, um die tiergesundheitliche und ökonomische Situation in der Ferkelproduktion zu verbessern.

Mittelkettige Fettsäuren sind in der Ernährung als energieliefernde Substrate, aber auch aufgrund ihrer möglichen Wirkungen auf die intestinale Mikrobiota sowie auf die Darmmorphologie und auf das darmassoziierte Immunsystem von besonderer Bedeutung (Dierick et al., 2002 a, b, 2003). Dieses macht sie für den Einsatz in der Ernährung von Jungtieren interessant, wie zur Prophylaxe von Durchfallerkrankungen bei Absetzferkeln. *In vitro*-Untersuchungen zeigten eine negative Korrelation zwischen steigenden pH-Werten und der antibakteriellen Wirkung der mittelkettigen Fettsäuren in Abhängigkeit des Dissoziationsgrades (Hsiao und Siebert, 1999; Sun et al., 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollte einerseits überprüft werden, ob eine kombinierte Fütterung der mittelkettigen Fettsäuren Capryl- und Caprinsäure mit kurzkettigen organischen Säuren (Fumar- und Milchsäure) an Absetzferkel über eine pH-Wert-Absenkung im vorderen Verdauungstrakt eine antibakterielle Wirkung mittelkettiger Fettsäuren ermöglicht werden kann. Andererseits sollte durch die Erhebung der Länge der Dünndarmzotten und Kryptentiefe bzw. durch die Quantifizierung intraepithelialer Lymphozyten Effekte von mittelkettigen Fettsäuren und organischen Säuren auf die Dünndarmschleimhaut und auf das lokale darmassoziierte Immunsystem detektiert werden. Interaktionen mit verdauungsphysiologischen Vorgängen wurden außerdem berücksichtigt.

## 2. Literatur

### **2.1 Durchführung und Bedeutung des konventionellen Absetzens für die Tiergesundheit**

Die gewünschte Maximierung der Sauenproduktivität pro Jahr bedingt eine zunehmende Intensivierung der Ferkelerzeugung und fördert das frühe Absetzen der Ferkel. Nach der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung [vom 22. August 2006, Abschnitt 4, §22(1)] dürfen Saugferkel zwar erst im Alter von über vier Wochen abgesetzt werden, es ist jedoch möglich die Tiere früher abzusetzen, sofern es zum Schutze des Muttertieres oder des Saugferkels vor Schmerzen, Leiden oder Schäden geschieht [vom 22. August 2006, Abschnitt 4, §22(1)<sup>1</sup>] bzw. auch unter Einhaltung bestimmter Vorschriften, wie die getrennte Haltung von Sauen und das unverzügliche Verbringen der Ferkel in gereinigte und desinfizierte Ställe, können die Ferkel bereits im Alter von über drei Wochen abgesetzt werden [vom 22. August 2006, Abschnitt 4, §22(1)<sup>2</sup>]. Das üblicherweise praktizierte konventionelle Absetzen erfolgt i.d.R. früh und zu einem festgelegten Zeitpunkt. Dies steht im Widerspruch zu dem natürlichen Absetzen bei Wildschweinen über einen definierten Zeitraum von vier bis acht Wochen. Idealerweise ermöglicht dies eine graduelle Umstellung der Nahrungsaufnahme auf ein strukturiertes Futter und bietet die notwendige Zeit für die schrittweise Reifung eines funktionsfähigen Verdauungssystems (Brooks und Tsourgiannis, 2003; Miller und Slade, 2003; Zabielski et al., 2008). Im Gegensatz dazu bedeutet das konventionelle Absetzen meist einen plötzlichen Futterwechsel sowie das Fehlen einer Adaptionszeit für die Ferkel, um sich an die neue Art der Futterraufnahme bzw. für den Verdauungstrakt, um sich auf die neue Struktur des Futters und dessen Inhaltstoffe anzupassen (Brooks und Tsourgiannis, 2003; Miller und Slade, 2003; Zabielski et al., 2008). Als Folge dessen wird zu Beginn der Absetzphase häufig eine reduzierte Futterraufnahme beobachtet. Zwar nehmen 50 % der Tiere ihre erste Mahlzeit innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Absetzen zu sich, jedoch verweigern bis zu 10 % der Ferkel jegliche Futterraufnahme (Bruininx et al., 2001). Es kann bis zu zwei Wochen dauern, das dadurch entstandene Energiedefizit wieder auszugleichen (Le Dividich und Sève, 2000). Der Verlust der Muttermilch selbst bedeutet ein zusätzliches Energiedefizit, da Sauenmilch, verglichen mit einem gewöhnlichen Ferkelaufzuchtfutter, eine höhere Energiedichte, basierend auf hohen Mengen an Fett und leicht verdaulicher Laktose, besitzt (Le Dividich und Sève, 2000; Williams, 2003; Zabielski et al., 2008). Der Entzug der Milch bedeutet für die Ferkel gleichermaßen den Verlust der enthaltenden Wachstumsfaktoren und Immunglobulinen (Pluske et al., 1997; King et al., 2003). Fehlende Zuwachsraten und gastrointestinale Erkrankungen werden in diesem Zusammenhang häufig nach dem Absetzen beobachtet, wobei letztere in vielen Betrieben ein gravierendes Bestandsproblem darstellen und nahezu 10 % der gesamten Ferkelverluste verursachen können (Le Dividich und Sève, 2000; Zabielski et al., 2008). Die durch das konventionelle Absetzen resultierende Problematik für die Tiergesundheit kann als Ausdruck eines multifaktoriellen Geschehens angesehen werden und steht in engem Kontext mit einem nicht ausgereiften Verdauungsapparat bzw. lokalen Immunsystems und einer instabilen intestinalen Mikrobiota zum Zeitpunkt des Absetzens (Cera et al., 1988; Nabuurs, 1995; Pluske et al., 1997; Zabielski et al., 2008).

## **2.2 Einfluss des Absetzens auf die Morphologie und Physiologie des Dünndarms**

### **2.2.1 Histologischer Aufbau der Darmwand**

Allgemeiner Aufbau (nach Liebich 2009; modifiziert nach Meyer, 2011):

**Tunica mucosa** (echte Drüsenschleimhaut, Abb. 2)

→ Lamina epithelialis mucosae (Epithel der Schleimhaut)

→ Lamina propria mucosae (Eigenblatt der Schleimhaut)

→ Lamina muscularis mucosae (Muskelblatt der Schleimhaut)

**Lamina (Tela) submucosa** (Unterschleimhautgewebe)

**Tunica muscularis** (Muskelschicht)

→ Lamina (Stratum) circularis (zirkuläre Schicht)

→ Lamina (Stratum) longitudinalis (Längsschicht)

**Lamina (Tela) subserosa** (Untergewebe der Serosaschicht)

**Tunica serosa** (Serosaschicht)

→ Lamina propria serosae (Eigenblatt der Serosa)

→ Lamina epithelialis serosae (Epithel der Serosa)

Die Schleimhaut des Dünndarms bildet die innerste Schicht und übernimmt vielfältige Aufgaben. So dient das Epithel einerseits als Schutzbarriere, erfüllt aber auch über die Synthese von Verdauungsenzymen und Transportproteinen elementare Funktionen (Kelly und Coutts, 2000; Zabielski et al., 2008).

#### **Besonderheiten der Dünndarmschleimhaut**

Die Schleimhaut des Dünndarms besteht aus einem einschichtigen hochprismatischen Epithel, das zudem strukturell und funktionell unterschiedliche Zellen aufweist. Die Enterozyten sind stets hochprismatisch und tragen oberflächlich einen Mikrovillibesatz (Bürstensaum). Tight junctions (lat. Zonula occludens) ermöglichen einen festen Zellverband und regulieren die epitheliale Permeabilität (parazellulärer Transport). Durch den Einschluss wichtiger Verdauungsenzyme (Hydrolasen) in das Plasmalemm der Mikrovilli entsteht eine wichtige Voraussetzung für die Bildung einer resorptionsaktiven Oberfläche. Der zytoprotektive Schleim (Mucus) wird von den Becherzellen sezerniert, ist glykoprotein- sowie glykolipidreich und wird von den Zellen merokrin auf die Oberfläche der Darmschleimhaut abgegeben. Endokrine Zellen synthetisieren u.a. Peptidhormone (Somatostatin, Gastrin, vasoaktive intestinale Peptide (VIP), Cholezystokinin-Pankreozym (CCK) und Serotonin. Durch die Bildung endokriner Wirkstoffe beeinflussen sie über Stimulation oder Hemmung die ablaufenden Verdauungsvorgänge (Liebich, 2009). Paneth-Zellen befinden sich am Grund der Dünndarmdrüsen und üben über die Bildung von antibakteriell wirksamen Peptiden, wie  $\alpha$ -Defensin, einen antibakteriellen Effekt aus (Murphy et al., 2009). Diese Zellen sind lediglich beim Pferd und Menschen sicher nachgewiesen (Selsted und Oulette, 2005; Liebich, 2009).  $\beta$ -Defensin, ein weiteres antibakteriell wirksames Peptid, welches in den Epithelzellen des Dün- und Dickdarms gebildet wird, konnte auch bei Schweinen detektiert werden (O'Neil et al., 1999; Linde et al., 2008). Sonderbildungen der Tela submucosa führen zur Vergrößerung der inneren Oberfläche und optimieren die Resorption der Nahrungsbestandteile. Makroskopisch sichtbare Falten (Plicae circulares) treten quer zur Längsachse in Erscheinung, ihre Höhe nimmt von kranial nach kaudal hin ab. Die

bindegewebige Grundlage dieser Querfalten bildet die Tela submucosa. Ausstülpungen der Lamina propria mucosae, die Dünndarmzotten (Villi intestinales), werden von einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel (Lamina epithelialis mucosae) überzogen. Die längsten Zotten befinden sich im Jejunum, kürzere wiederum im Duodenum und Ileum. Die Lamina propria bildet neben Ausstülpungen auch Einstülpungen aus. Bei diesen handelt es sich um schlauchförmige, gerade und unverzweigte Krypten („Lieberkühsche Drüsen“). Die Epithelzellen am Grund der Darmkrypten sind undifferenziert und sorgen durch ständige mitotische Teilungen für den notwendigen Ersatz der abgeschilferten Epithelzellen der Zottenwand, wobei sie die kontinuierliche Regeneration des Epithels ermöglichen. Die Krypten unterliegen einer postnatalen Entwicklung, so dauert die Erneuerung der Deckepithelschicht bei Neonaten 10- 14 Tage, bei adulten Tieren lediglich zwei bis fünf Tage (Liebich, 2009)

### **2.2.2 Entwicklung und Veränderungen der Dünndarmmorphologie und -physiologie während Säugezeit und Absetzphase**

Bereits in den frühen Trächtigkeitsstadien erfolgt eine erkennbare Gliederung des Verdauungstrakts in verschiedene Organanteile, so dass erforderliche Dünndarmstrukturen und physiologische Vorgänge bereits bei der Geburt auf extrauterine Bedingungen ausgelegt sind. Bis zur Ausbildung eines ausgereiften Verdauungsapparates, welcher dem eines adulten Tieres gleicht, benötigt es folglich nur eine über die Säuge- und Absetzphase sukzessive Verfeinerung der Strukturen sowie der Verdauungs- und Absorptionskapazitäten (Kelly und Coutts, 2000; Miller und Slade, 2003). Hierbei ist die postnatale Phase durch die Aufnahme der Sauenmilch gekennzeichnet bzw. die Absetzphase durch die Adaptation des Verdauungssystems an feste Nahrung (Kelly und Coutts, 2000; Zabielski et al., 2008). Durch die Aufnahme der Kolostralmilch wird das Wachstum von Magen, Pankreas und Dünndarm der neonatalen Ferkel intensiv stimuliert, was offenbar maßgeblich durch intrinsische Wachstumsfaktoren und Hormone im Kolostrum gesteuert wird (Pacha, 2000; Zabielski et al., 2008). In der ersten markanten Entwicklungsphase erfolgen eine schnelle Zunahme der Dünndarmzottenhöhe und Expansion des Bürstensaums; dies bedingt eine deutliche Zunahme der Resorptionsfläche (Xu et al., 1992; Zabielski et al., 2008). Begründen lässt sich dieses Phänomen u.a. durch die in den ersten zwei bis vier Lebenstagen beobachtete Erhöhung der Mitoserate der Epithelzellen in den Krypten, bei gleichzeitiger Inhibierung der Apoptoserate (Zabielski et al., 2008). Das veränderte Verhältnis zwischen Mitose und Apoptose wird im Dünndarm durch die Differenzierung der Enterozyten, Becherzellen und Immunzellen begleitet (Zhang et al., 1997). Der Vorgang findet wahrscheinlich verstärkt im proximalen Dünndarm statt, da bei keimfreien neugeborenen Ferkeln die Zottenlänge und Kryptentiefe im Duodenum, verglichen mit den Abschnitten Jejunum und Ileum, signifikant kleiner bzw. deutlich tiefer waren (Shirkey et al., 2006). Fetal angelegte Enterozyten sind in der Lage, kolostrale Makromoleküle (Immunglobuline, Hormone, Wachstumsfaktoren u.a.) über Vesikel zu transportieren. Diese Art von vakuolisierten Enterozyten sind noch bis zu zwei Wochen nach der Geburt und verstärkt im Duodenum nachzuweisen (Shirkey et al., 2006). Bereits zu Beginn der zweiten Lebenswoche werden die fetalen Enterozyten durch ausgereifte Enterozyten ersetzt. Begleitet wird dieser Maturationsprozess durch eine Steigerung der Apoptoserate bei gleichzeitiger Minimierung der Mitoserate, so dass sich das Verhältnis von Apoptose zu Mitose wieder auf das gleiche Niveau, wie vor der ersten Kolostrumaufnahme, einstellt (Godlewski et al., 2005; Zabielski et al., 2008). Dieser Vorgang verläuft parallel zu der fortschreitenden Erhöhung der Aktivitäten der im Bürstensaum lokalisierten Enzyme Laktase, Saccharase, Maltase und Aminooligopeptidase (Zhang et al., 1997). Gleichmaßen erhöht sich die Transportkapazität für Fruktose vergleichbar mit der von Glukose. Dies lässt

die Vermutung zu, dass Ferkel bereits kurz nach der Geburt in der Lage sind auch milchfremde Nahrungsbestandteile zu verdauen (Puchal und Buddington, 1992). Die fingerförmigen Zotten verkürzen und verbreitern sich allmählich im Verlauf der Säugezeit (Cera et al., 1988).

Die Reifung des Gastrointestinaltrakts schreitet auch unter natürlichen Bedingungen, aber nur graduell, voran (Hampson, 1986). Die im Zuge des Absetzens auftretenden strukturellen und funktionellen Wandlungen sind besonders bei früh abgesetzten Ferkeln ausgeprägt (Tang et al., 1999). Es können generell zwei Phasen unterschieden werden: Die akute Phase ist gekennzeichnet durch spezifische Veränderungen wie Reduktion der Villushöhe und die damit verbundene Aktivitätsabnahme der im Bürstensaum lokalisierten Enzyme Laktase, N-Amino- und Dipeptidylpeptidase und Alkalische Phosphatase sowie einer geringeren Glukoseresorption und einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität. Sie wird ab dem 5. Tag nach dem Absetzen durch eine anschließende Adaptations- und Reifungsphase abgelöst. In dieser Zeit erfolgt die progressive Wiederherstellung normaler Strukturen sowie funktionstüchtiger Verdauungskapazitäten. Der Vorgang ist nicht vor dem 15. Tag nach dem Absetzen abgeschlossen (Hampson, 1986; Cera et al. 1988; Tang et al., 1999; Spreeuwenberger et al., 2001; Marion et al., 2002; Hedemann et al., 2003; Boudry et al., 2004; Montagne et al. 2007). Innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Absetzen ist bereits ein deutlicher Rückgang der Dünndarmzottenhöhe zu beobachten. Diese sogenannte Villusatrophie erreicht drei bis fünf Tage nach dem Absetzen ihren Höhepunkt und wird ab dem dritten bis sechsten Tag von einer Vertiefung der Krypten, der sogenannten Elongation, begleitet (Hampson, 1986; Cera et al., 1988, Tang et al., 1999; Spreeuwenberg et al., 2001; Hedemann et al., 2003; Boudry et al., 2004; Montagne et al., 2007). Die Kryptenzellproliferation führt zur Vertiefung der Krypten. Sie soll der verstärkten Nachbildung von Enterozyten dienen und die regenerative Zunahme der Villushöhe ermöglichen (van Dijk et al., 2001; Hedemann et al., 2003; Miller und Slade, 2003; Zabielski et al., 2008). Die Abnahme der Zottenlänge ist deutlich ausgeprägter im proximalen Dünndarm (Hampson, 1986; Spreeuwenberg et al., 2001; Marion et al., 2002; Hedemann et al., 2003; Miller und Slade, 2003, Boudry et al., 2004; Shirkey et al., 2006; Montagne et al., 2007), während die Elongation der Krypten verstärkt in den distalen Bereichen stattfindet (Hampson, 1986; Boudry et al., 2004; Montagne et al., 2007).

Die genaue Ätiologie der transienten Villusatrophie und die damit verbundene Vertiefung der Krypten sowie der herabgesetzten Enzymaktivität wird in der Literatur kontrovers diskutiert und sollte eher als Reaktion auf das komplexe Zusammenspiel verschiedener Systeme und nicht als Antwort auf nur einen einwirkenden Faktor bewertet werden (Pluske et al., 1997).

Die Verringerung des Verhältnisses von Zottenlänge und Kryptentiefe in der akuten Phase nach dem Absetzen gilt primär als Ausdruck hoher Zellverluste im Epithel der Zotten und einer nicht ausreichenden Zellerneuerung in den Krypten, maßgeblich gesteuert durch eine gesteigerte Apoptoserate bei gleichzeitiger Minimierung der Mitoserate (Hampson, 1986; Pluske et al., 1997; van Dijk et al., 2001; Hedemann et al., 2003; Zabielski et al., 2008). Die zu geringe Futteraufnahme und das daraus resultierende Energiedefizit (Spreeuwenberg et al., 2001; Marion et al., 2002; Hedemann et al., 2003; Boudry et al., 2004; Montagne et al., 2007) bzw. die für den Darm der Ferkel neuartige Zusammensetzung des Futters sollen dabei eine tragende Rolle spielen (Cera et al., 1988; Zabielski et al., 2008). Die Umstellung von Sauenmilch auf festes Futter führt zudem zum Verlust wichtiger Faktoren mit verschiedenen Schlüsselfunktionen für das physiologische Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und Zellfunktion. So könnte der durch den Milchentzug entstehende Mangel an EGF (Epidermal growth factor), IGF (Insulin-like growth factor), Insulin und Cholecystokinin zu einer Verschlechterung des Zellstoffwechsels führen und eine verminderte Überlebenszeit der Enterozyten bedingen (Pluske et al., 1997; Montagne et al., 2007). Die Konfektionierung des Futters moduliert vermutlich ebenfalls die Höhe der Dünndarmzotten, da die Zotten nach

Breifütterung, verglichen mit der Länge nach Vorlage von pelletiertem Futter, deutlich höher waren (Deprez et al., 1987). Die abrasive Wirkung des pelletierten Futters (Deprez et al., 1987) bzw. das höhere Aufnahmevermögen von Breifutter und die damit gesteigerte Energiezufuhr (Partridge et al., 1992) könnten diese Unterschiede begründen. Der mögliche Einfluss des lokalen Immunsystems auf die beschriebenen transienten Veränderungen innerhalb der Darmstruktur und Darmphysiologie wird unter Punkt 2.3.3 erläutert.

Beschriebene funktionsrelevante strukturelle Veränderungen konnten in abgeschwächter Ausprägung auch bei nicht abgesetzten Ferkeln verzeichnet werden. Verglichen mit gleichaltrigen abgesetzten Ferkeln wurde allerdings lediglich ein gradueller Anstieg der Kryptentiefe und eine geringere Minderung der Zottenhöhe beobachtet (Hampson, 1986). Dies unterstreicht die Annahme einer temporären Überbelastung des Verdauungssystems abgesetzter Ferkel. Für die Tiergesundheit kann die Abnahme der protektiven Schleimhautintegrität als möglicher Wegbereiter für die Manifestierung schwerwiegender Durchfallerkrankungen in Verbindung mit fehlenden Zuwachsraten nach dem Absetzen angesehen werden (Cera et al., 1988; Nabuurs et al., 1995; Pluske et al., 1997; Zabielski et al., 2008).

## **2.3 Einfluss des Absetzens auf die Funktionalität des lokalen Immunsystems im**

### **Dünndarm**

Über den Darm erfolgt die Aufnahme nutritiver und mikrobieller Antigene, erstere sind lebensnotwendig, letztere für den Organismus gefährlich. Die Schleimhautoberfläche ist besonders anfällig für Infektionen; um ihre physiologischen Aufgaben zu erfüllen, besteht eine gewisse Durchlässigkeit, die als potenzielle Eintrittspforte für pathogene Keime in den Körper bewertet werden kann (Kelly und Coutts, 2000; Bailey et al., 2005; Liebich, 2009; Murphy et al., 2009). Die Besonderheit der Darmschleimhaut besteht in der Aufrechterhaltung einer ständigen Balance zwischen einer mukosalen Toleranz gegenüber den über die Nahrung oral zugeführten Fremdanitigenen bzw. der kommensalen Darmbakterien und einer lokalen Bekämpfung pathogener Erreger. Die notwendige Immunantwort im Darm wird maßgeblich durch ein komplexes Interagieren zwischen angeborenen und erworbenen Mechanismen des lokalen Immunsystems kontrolliert (Pabst und Rothkötter, 1999; Kelly und Coutts, 2000; Vega-Lopez et al., 2001; Stokes et al., 2004; Bailey et al., 2005; Murphy et al., 2009).

### **2.3.1 Aufbau und Struktur des darmassoziierten lokalen Immunsystems beim Schwein**

Der erste Antigenkontakt erfolgt über die **Schleimschicht (Mucus)**, diese liegt schützend über dem Epithel. Eine intakte Mukusschicht besitzt verschiedene antimikrobielle Eigenschaften, um oral aufgenommene pathogene Erreger effektiv zu bekämpfen. Zum einen wirkt der Schleim selbst bakteriozid, da er u. a. reich an Lysozym ist, zum anderen können pathogene Mikroorganismen nicht nur durch Fixierung und Umhüllung abtransportiert und ausgeschieden werden, sondern auch durch die im Mucus gebundenen IgA-Antikörper neutralisiert werden (Pabst, 1987; Kelly und Coutts, 2000; Montagne et al., 2004; Murphy et al., 2009). Indirekt verhindert eine intakte Schleimhaut durch die Adhäsion kommensaler Bakterien, eine Kolonisation und Vermehrung pathogener Erreger (Montagne et al., 2004; Murphy et al., 2009). Die im Epithelverband gebildeten engen Zellverbindungen, sogenannte **tight junctions** (lat. Zonula occludens), gewährleisten einerseits eine selektive Permeabilität (Pabst, 1987; Kelly und Coutts, 2000; Murphy et al., 2009), andererseits befinden sich mehr als 50 % aller T-Zellen im Dünndarm intraepithelial (Vega-Lopez et al., 2001), so dass das Epithel selbst eine weitere Instanz darstellt, um potenzielle Infektionen frühzeitig kontrollieren zu können (Pabst, 1987; Kelly und Coutts, 2000; Vega-Lopez et al., 2001;

Murphy et al., 2009). **Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)** liegen zwischen den Enterozyten und verteilen sich bei adulten Schweinen relativ gleichmäßig auf das Epithel im Bereich der Zottenspitze, Zottenmitte und der Zottenbasis (Vega-Lopez et al., 2001). Sie sind auf der einen Seite durch tight junctions vom Darmlumen und auf der anderen Seite durch die Basalmembran von der Lamina propria abgetrennt (Pabst, 1987; Vega-Lopez et al., 2001; Murphy et al., 2009). Der Nachweis verschiedener IEL Populationen gelingt anhand verschiedener Zelloberflächenmoleküle (CD-Moleküle). In Tabelle 1 wurden die beim Schwein nachgewiesenen CD-Moleküle auf IEL des Dünndarms zusammengefasst. Beim adulten Schwein befindet sich der Hauptteil der IEL angrenzend an die Basalmembran und ca. 53 % dieser Lymphozyten exprimieren die Oberflächenmoleküle  $CD2^+CD4^+CD8^+$  (Bianchi et al., 1992; Vega-Lopez et al., 1995; Rothkötter et al., 1999; Vega-Lopez et al., 2001). Ein geringerer Teil befindet sich auf Höhe des Enterozyten-Zellkerns sowie in apikal gelegenen Bereichen, dabei soll es sich zu ca. 43 % um doppelt negative  $CD2^+CD4^-CD8^-$ -Zellen (Rothkötter et al., 1994; Vega-Lopez et al., 1993; 2001) handeln.  $CD4^-$ ,  $CD16^+$ - sowie  $TcR1^+$  ( $\gamma\delta$ )-Zellen konnten nur in geringer Anzahl (ca. 5 %) im Epithel des Schweins nachgewiesen werden (Vega-Lopez et al., 1993; Solano-Aguilar et al., 2001; Scharek et al., 2007). Aufgrund der Nähe zum Darmlumen und der damit verbundenen fast barrierefreie Zugriff der IEL auf oral aufgenommene Fremdantigene lässt vermuten, dass IEL eine wichtige Funktion innerhalb der lokalen Immunantwort übernehmen (Pabst, 1987). In der **Lamina propria** befinden sich weitere Immunzellen, wie Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten. Lymphozyten befinden sich überwiegend im Bereich der Dünndarmzotten, während Makrophagen und Granulozyten verstärkt im Bereich der Krypten zu finden sind (Vega-Lopez et al., 1993). Bei den spezifischen Immunzellen stellen  $CD4^+$ -Zellen die vorherrschende Population dar (Rothkötter et al., 1991; Vega-Lopez et al., 1993; Solano-Aguilar, 2001). Verglichen zum Epithel sind  $TcR1^+$  ( $\gamma\delta$ )-Zellen in der Lamina propria in höheren Anteilen vertreten (Rothkötter et al., 1999; Scharek et al., 2007). IgA produzierende Plasmazellen lagern sich überwiegend im Kryptenbereich an, wobei sich B-Zellen nur vereinzelt in der Lamina propria finden (Rothkötter et al., 1991).

Das **GALT** (gut associated lymphoid tissue) stellt ein strukturiertes Kompartiment des schleimhautassoziierten lymphatischen Gewebes (mucosa associated lymphoid tissue; MALT) dar und besteht aus den in der Lamina (Tela) submucosa in charakteristischer Weise angeordneten, aggregierten Lymphfollikeln (Noduli lymphatici aggregati) in Form der jejunalen und ilealen Peyerschen Platten (PP) und aus den mesenterialen Lymphknoten (Solano-Aguilar, 2001; Bailey et al., 2005; Liebich, 2009; Murphy et al., 2009). Diese organisierten lymphatischen Gewebe sind Bereiche, in denen T- und B-Zellen mithilfe antigenpräsentierender Zellen (dendritische Zellen und Makrophagen) in Kontakt treten (Murphy et al., 2009).

**Tabelle 1:** Darstellung der im Dünndarm des Schweines nachgewiesenen Zelloberflächenmoleküle auf IEL

CD-Antigen	Lymphozyten, die das Antigen exprimieren	Literatur
CD2	T-Zellen, NK-Zellen	Pescovitz et al., 1998; Denyer et al., 2006
CD3	T-Zellen	Pescovitz et al., 1998
CD8 <sub>α</sub>	Zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen	Pescovitz et al., 1998; Denyer et al., 2006
CD8 <sub>β</sub>	Zytotoxische T-Zellen	Pescovitz et al., 1998
CD4	T-Helferzellen	Saalmüller et al., 1987
CD16	NK-Zellen	Denyer et al., 2006

CD = cluster of differentiation: Zusammenfassung monoklonaler Antikörper, die dasselbe Zelloberflächenmolekül erkennen; NK = natürliche Killerzellen

Beim Schwein können T-Lymphozyten generell anhand ihres T-Zellrezeptors in  $\alpha\beta$ -T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen untergliedert werden. Die Gruppe der  $\alpha\beta$ -T-Zellen umfasst indes vier weitere Subtypen (Saalmüller et al., 1987; Yang und Parkhouse, 1996): Naive T-Helferzellen ( $CD4^+CD8^-$ -Zellen); T-Helfer-Gedächtniszellen ( $CD4^+CD8^+_{\alpha\alpha low}$ ) und zytotoxische T-Zellen ( $CD4^-CD8^+_{\alpha\beta low}$ - und  $CD4^-CD8^+_{\alpha\beta high}$ -Zellen).  $CD4^+CD8^-$ -Zellen stellen insgesamt rd. 3-14 % aller im peripheren Blut vorkommenden Lymphozyten (PBL) bzw. rd. 9-30 % der Lymphozyten im peripheren lymphatischen Gewebe dar, wobei das zahlenmäßige Auftreten mit zunehmendem Alter ansteigt. Die Anzahl an  $CD4^+CD8^+_{\alpha\alpha low}$ -Zellen steigt altersabhängig an, wobei sie rd. 2-55 % aller PBL und 3-13 % im lymphatischen Gewebe repräsentieren. Zytotoxische T-Zellen ( $CD4^-CD8^+_{\alpha\beta low}$ - und  $CD4^-CD8^+_{\alpha\beta high}$ -Zellen) repräsentieren rd. 7-28 % der PBL und 5-32 % der Lymphozyten im lymphatischen Gewebe (Yang und Parkhouse, 1996; Zuckermann und Husmann, 1996). Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen den Hauptteil aller PBL bei jungen Schweinen, ihre Anzahl sinkt mit zunehmendem Alter. Beim Schwein lässt sich diese T-Zelllinie ferner in drei Subtypen untergliedern (Saalmüller et al., 1987; Yang und Parkhouse, 1996, 2000):  $CD2^+CD4^-CD8^-$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen (klassische  $\gamma\delta$ -T-Zellen);  $CD2^+CD4^-CD8^+_{\alpha\alpha low}$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen (klassische  $\gamma\delta$ -T-Zellen) und  $CD2^-CD4^-CD8^-$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen (nicht klassische  $\gamma\delta$ -T-Zellen). Der nicht klassische  $\gamma\delta$ -T-Subtyp stellt den Hauptteil der T-Zellen im Blut junger Schweine dar (15-25 %), die Funktion dieser Zellen ist jedoch ungeklärt (Chareerntantanakul und Roth, 2007). Die klassischen  $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen rd. 1 % der PBL und 0,2-13 % der Lymphozyten der lymphatischen Gewebe ( $CD2^+CD4^-CD8^-$   $\gamma\delta$ -T-Zellen) bzw. 2 % der PBL und 1-9 % der Lymphozyten der lymphatischen Gewebe ( $CD2^+CD4^-CD8^+_{\alpha\alpha low}$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen) (Yang und Parkhouse, 1996). Im Gegensatz zu  $\alpha\beta$ -T-Zellen erkennen die klassischen Subtypen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen Antigene zwar nicht über die Bindung an MHC-Moleküle, doch reagieren sie wie  $\alpha\beta$ -T-Zellen nach Antigenkontakt durch Proliferation sowie Zytokinproduktion und im Falle der  $CD2^+CD4^-CD8_{\alpha\alpha}$   $\gamma\delta$ -T-Zellen zytotoxisch (Saalmüller et al., 1994). Die Art und Weise der Antigenerkennung von porzinen  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist unklar, jedoch könnten sie Fremdartigene direkt über ihren  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor erkennen bzw. sie gleichen den unspezifischen Immunzellen, indem sie Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) über Toll-Like-Rezeptoren (TLR) oder via Scavenger-Rezeptoren wahrnehmen (Chareerntantanakul und Roth, 2007).

Das CD3-Oberflächenmolekül, ein Proteinkomplex aus Transmembranproteinen, wird auf der Oberfläche von zytotoxischen- und T-Helferzellen exprimiert (Pescovitz et al., 1998; Murphy et al., 2009). Die Proteinketten CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  und CD3 $\epsilon$  bilden zusammen mit den Ketten des T-Zellrezeptors einen stabilen T-Zellrezeptorkomplex (Murphy et al., 2009). Eine eindeutige Abgrenzung zwischen CD8 positiven  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) kann lediglich durch die Oberflächenmarker CD3 und CD5 erfolgen. NK-Zellen exprimieren im Gegensatz zu CD2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> $\alpha\alpha$   $\gamma\delta$ -T-Zellen weder CD3 noch CD5 (Saalmüller et al., 1994).

### **2.3.2 Entwicklung des lokalen Immunsystems im Dünndarm über die Säugezeit und**

#### **Absetzphase**

Die strukturelle Gliederung des lokalen Immunsystems ist bereits zur Geburt vorhanden, durchläuft aber eine postnatale Reifung. Diese wird maßgeblich durch die Auseinandersetzung der Ferkel mit einer Vielzahl „neuer Antigene“ in der Säuge- und Absetzzeit initiiert (Vega-Lopez et al., 1995; Pabst und Rothkötter, 1999; Stokes et al., 2004; Bailey et al., 2005; Kelly und Coutts et al., 2000). In beiden Lebensphasen erfolgt eine intensive Auseinandersetzung mit Nahrungsfaktoren und Umweltkeimen (Pabst und Rothkötter, 1999; Stokes et al., 2004; Bailey et al., 2005).

Innerhalb der ersten Lebenswoche steigt die Anzahl der antigenpräsentierenden Zellen in der Lamina propria mucosae im Bereich der Dünndarmzotten und -krypten drastisch an und erreicht ihr Maximum in der fünften Lebenswoche, wobei die Bereiche der Krypten stärker besiedelt sind (Vega-Lopez et al., 1995). Die Peyerschen Platten (PP) sind bereits pränatal nachweisbar (Pabst und Rothkötter 1999). Sie zeigen schon wenige Tage nach der Geburt eine histologische Gliederung, die vergleichbar ist mit derjenigen bei adulten Schweinen und erfahren p.n. ein kontinuierliches Größenwachstum (Pabst et al., 1988; Stokes et al., 2004). Lymphozyten werden in dieser Phase nur in geringer Anzahl in der Nähe der PP detektiert (Stokes et al., 2004). B-Zellen und IgA-produzierende Plasmazellen können erst ab dem 12. Lebenstag in der Lamina propria mucosae des Dünndarms nachgewiesen werden und bis zum 40. Lebenstag erfolgt primär nahe der Krypten ein starker Anstieg dieser Zellen (Rothkötter et al., 1991; Bianchi et al., 1992; Stokes et al., 2004). In den ersten Lebenstagen findet sich in der Lamina propria der Dünndarmzotten nur eine geringe Anzahl an doppelt negativen CD2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (Vega-Lopez et al., 1995; Stokes et al., 2004) und CD8<sup>+</sup>-Immunzellen (Bianchi et al., 1992). Innerhalb der zweiten und vierten Lebenswoche prädominieren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Lamina propria (Bianchi et al., 1992). Gleich der Lamina propria finden sich kurz nach der Geburt auch im Epithel des Dünndarms überwiegend doppelt negative Zellen, wobei im Gegensatz zur Lamina propria ab der zweiten Lebenswoche ein deutlicher Anstieg CD8<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden kann. CD8<sup>+</sup>-Zellen entwickeln sich über das Absetzen hinaus als stärkste IEL-Fraktion (Bianchi et al., 1992; Vega-Lopez et al., 1995; Solano-Aguilar et al., 2001; Vega-Lopez et al., 2001; Stokes et al., 2004). Die Anzahl CD4 und CD16 positiver Zellen im Epithel verhält sich dagegen rückläufig (Solano-Aguilar et al., 2001). Die Gesamtanzahl IEL steigt kontinuierlich ab dem 14. Lebenstag und entspricht mit rd. 30 % in etwa der bei 4,5-jährigen Schweinen ermittelten Anzahl (Rothkötter et al., 1999). Bei keimfrei aufgezogenen Versuchsferkeln konnte dieser Anstieg nicht beobachtet werden, so erscheint die Anzahl IEL maßgeblich durch eine mikrobielle Interaktion beeinflusst zu werden (Rothkötter et al., 1999). Bei adulten Schweinen sollen rd. 50 % aller Lymphozyten im Dünndarm intraepithelial lokalisiert sein (Vega-Lopez et al., 2001). Die Herkunft IEL gilt als noch nicht eindeutig geklärt. An humanem Darmgewebe konnte mittels Transmissionselektronenmikroskopie eine Migration von Lymphozyten aus der Lamina propria in das Epithel beobachtet werden (Lundquist et al., 1995). Aufgrund der

Hauptlokalisierung IEL im Bereich der Basalmembran wird Gleiches auch beim Schwein angenommen (Barmann et al., 1994; Vega-Lopez et al., 2001).

### **2.3.3 Bedeutung des lokalen darmassoziierten Immunsystems für die morphologischen Veränderungen im Dünndarm der Ferkel während der Absetzphase**

Ein ausgereiftes und stabiles lokales Immunsystem, mit der Fähigkeit eine ausreichende Abwehr gegenüber pathogenen Erregern zu gewährleisten und gleichzeitig eine Immuntoleranz gegenüber Futterantigenen zu besitzen, wird zunehmend als Voraussetzung für ein optimales Wachstum und eine entsprechende biologische Leistung der Absetzferkel angesehen (Stokes et al., 2004). Die in diesem Zusammenhang auftretenden transienten Veränderungen innerhalb der Darmstruktur und Darmphysiologie wurden bereits beschrieben (Punkt 2.2.2). Hinsichtlich der Einwirkung des lokalen Immunsystems bei der Entstehung morphologischer und funktionaler Veränderungen werden in der Literatur zwei mögliche Ursachen diskutiert. Die massive Zufuhr von neuen Nahrungsantigenen könnte zum einen zu einer überschießenden Immunreaktion im Darm führen. Zum anderen könnte ein noch nicht ausgereiftes lokales Immunsystem, insbesondere bei früh abgesetzten Ferkeln, die Kolonisation von pathogenen Erregern nicht verhindern und die Entstehung von gastrointestinalen Erkrankungen begünstigen. Die zuletzt genannte These kann durch folgende Untersuchungen unterstützt werden:

Die Studie von Vega-Lopez et al. (1995) an drei Wochen alten abgesetzten Ferkeln belegte zwar eine mögliche unspezifische Immunantwort auf unbekannte Antigene, durch den in der Lamina propria insbesondere im Bereich der Zotten und Krypten des proximalen Dünndarm nachgewiesenen Anstieg von doppelt negativen CD2<sup>+</sup> - bzw. antigenpräsentierenden Zellen. Die Anzahl CD4 und CD8 exprimierender Immunzellen und somit die Gegenwart spezifischer Effektorzellen blieb jedoch unverändert gering. Gu et al. (2002) konnte außerdem zeigen, dass die Anzahl der IEL bei 21 Tage alten, abgesetzten Ferkeln deutlich geringer war als bei 28 Tage alten Tieren, die Zottenhöhe und Kryptentiefe der verschiedenen Altersgruppen unterschied sich jedoch nicht. Des Weiteren ergab die Quantifizierung der IEL im Dünndarm von 17 Tage alten Ferkeln einen Wert von unter 15 % und könnte die Hypothese eines nicht adaptierten Immunsystems, insbesondere bei früh abgesetzten Ferkeln, zusätzlich bekräftigen (Rothkötter et al., 1999).

Andererseits bedingt die mit dem Absetzen einhergehende abrupte Futterumstellung eine für das lokale Immunsystem ungenügende Anpassungszeit, um eine Immuntoleranz gegenüber neuen Futtermittelallergenen zu entwickeln. Eine dadurch induzierte überschießende lokale Immunreaktion im Sinne einer allergischen Reaktion könnte indes den vorübergehenden Verlust der Darmmorphologie verursachen (Li et al., 1990, 1991 a, b; Spreuwenberger et al., 2001; Stokes et al., 2004; Bailey et al., 2005). Die Untersuchungen von Li et al. (1990, 1991 a, b) konnten außerdem einen Zusammenhang zwischen der Abnahme der Villushöhe, Zunahme der Kryptentiefe und einem Anstieg spezifischer IgG-Antikörpern gegenüber Sojaprotein im Plasma bei abgesetzten Ferkeln nachweisen. Die Ergebnisse der Arbeiten von Solano-Aguilar et al. (2001) und Spreuwenberg et al. (2001) stützen zudem die Annahme einer durch das Absetzen induzierten überschießenden Reaktion des lokalen Immunsystems. So konnte bei 17 Tage alten abgesetzten Ferkeln ein massiver Anstieg der CD8<sup>+</sup>-Zellen in isolierten peripheren mononukleären Zellen sowie im Epithel des Ileums und gleichzeitig ein Anstieg der IL-2-Expression nachgewiesen werden bzw. bei 25 Tage alten Ferkeln konnte ab dem vierten Tag nach dem Absetzen eine markante Zunahme der CD8<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden.

## **2.4 Entwicklung der Mikrobiota über die Säuge- und Absetzphase bei Ferkeln**

Adulte Schweine besitzen im Magen und Ileum, verglichen mit anderen Säugerarten, eine beträchtliche Anzahl an Bakterien (Jensen, 1998; Hopwood und Hampson, 2003). Im Vergleich zum Dünndarm nehmen die Bakterienanzahl und die Diversität der Zusammensetzung im Dickdarm zu (Jensen, 1998; Leser et al., 2002; Hill et al., 2002; Shirkey et al., 2006). Die Hauptsubstrate der mikrobiellen Fermentation stellen Kohlenhydrate dar. Die Bildung der Stoffwechselendprodukte Milchsäure (Laktat) entsteht durch Milchsäurebakterien (Laktobazillen) insbesondere im Magen und Dünndarm durch den Abbau leicht fermentierbaren Kohlenhydrate (Clemens et al., 1975; Sakata et al., 1999). Kurzkettige flüchtige Fettsäuren (SCFA) entstehen primär im Dickdarm durch die Fermentation unverdaulicher Kohlenhydrate („Nicht-Stärke-Polysaccharide“), dabei entstehen zum größten Teil Essigsäure, Propionsäure sowie Buttersäure (Daniel et al., 1997; James et al., 2003). Neben dem Kohlenhydratabbau, aber auch insbesondere bei geringen Mengen an fermentierbaren Kohlenhydraten, kommt es zur bakteriellen Nutzung von Aminosäuren. Infolgedessen entstehen vermehrt die verzweigten Fettsäuren iso-Buttersäure und iso-Valeriansäure. Ein erhöhter Anteil dieser verzweigten Fettsäuren spricht für eine vermehrte bakterielle Nutzung von Proteinen (Blaut et al., 2007; Lallès et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurde nach Erhöhung der Laktosemenge im Futter bei Absetzferkeln verstärkt n-Buttersäure und eine geringere Menge der verzweigte iso-Buttersäure und iso-Valeriansäure gebildet, wobei durch Zusatz von Inulin, einem Fructo-Oligosaccharid (Fruktan) aus der Gruppe der löslichen sowie leicht fermentierbaren Faserstoffe, der Anteil an gebildeter Propionsäure anstieg bei gleichzeitiger Minderung von iso-Buttersäure und iso-Valeriansäure (Pierce et al., 2006). SCFA, insbesondere Butyrat, werden verstärkt in den Kolonepithelzellen metabolisiert und von diesen als Hauptenergiequelle verwertet. Butyrat besitzt außerdem eine Vielzahl an gesundheitsfördernden Wirkungen auf zellulärer Ebene, so soll es eine Induzierung der Epithelzellendifferenzierung, eine Verminderung der Proliferationsrate, die Verstärkung der Epithelbarriere (tight junctions) und die Suppression der Tumorgenese bewirken (James et al., 2003). Ammoniak entsteht mitunter durch proteolytische Bakterien wie *E. coli* und stellt einerseits ein toxisch wirksames Stoffwechselprodukt dar (Dierick et al., 1986), allerdings soll das aus Ammoniak gebildete Ammonium eine Erhöhung des zellulären Stoffwechsels in Verbindung mit einer gesteigerten DNA-Synthese bewirken (Visek, 1972) und eine entsprechend Differenzierung der Enterozyten stimulieren können (siehe Punkt 2.4.2).

### **2.4.1 Entwicklung der Mikrobiota im GI-Trakt in der Säuge- und Absetzzeit**

Vor Eintritt in den Geburtskanal ist der Verdauungstrakt der Ferkel nahezu keimfrei (Hopwood und Hampson, 2003; Shirkey et al., 2006; Lalles et al., 2007). Direkt nach der Geburt ist die Hauptquelle für oral aufgenommene Keime das Muttertier. Koprophagie und Kontakt mit verschmutzten Körperbereichen, insbesondere Vagina, Perineum, Haut und Gesäuge stellen bevorzugte Aufnahmewege dar (Sinkovics und Juház, 1974; Jensen, 1998; Konstantinov et al., 2006). Im Magen und Dünndarm dominieren während der Säugezeit Laktobazillen und Streptokokken, vermutlich, da beide Gruppen an die Fermentation der Milchhaltsstoffe adaptiert sind (Sinkovics und Juház, 1974; Fuller et al., 1978; Hopwood und Hampson, 2003). *L. fermentum* ist der häufigste Vertreter im Magen der Saugferkel, *L. acidophilus* dagegen bei den Absetzferkeln (Fuller et al., 1978). Die aus der Digesta des Ileums von neugeborenen und abgesetzten Ferkeln nachgewiesenen prädominierenden Gattungen der Laktobazillen sind *L. sobrius* und *L. reuteri* (Konstantinov et al., 2006). Koliforme Keime, *Shigella flexneri* und *L. acidophilus* sind zu geringeren Anteilen im Dünndarm nachweisbar (Konstantinov et al., 2006). In der ersten Woche nach dem Absetzen sinkt der Gehalt an Laktobazillen und Streptokokken im Dünndarm bei gleichzeitigem Anstieg koliformer Keime und der Clostridien (Jensen, 1998; Konstantinov et al., 2006). Die

Mikrobiota des Dickdarms entwickelt sich ebenfalls sehr rasch nach der Geburt (Hopwood und Hampson, 2003). Ihre Komplexität steigt mit zunehmendem Alter an und wird durch verschiedene Faktoren, wie die Zusammenstellung der Futterration oder Umgebungsbedingungen beeinflusst (Hopwood und Hampson, 2003). Eine Woche nach dem Absetzen können hauptsächlich gramnegative Keime aus der Digesta des Dickdarms kultiviert werden (Jensen, 1998). Bei adulten Schweinen stellen grampositive obligate Anaerobier (Streptokokken, Laktobazillen, Eubakterien, Fusobakterien und Peptostreptokokken) den Hauptteil kommensaler Bakterien dar, gramnegative Bakterien (Bakteroides und Prevotella) sind nur in geringen Anteilen im Ileum und im Dickdarm zu isolieren (Leser et al., 2002; Konstantinov et al., 2006).

#### **2.4.2 Einfluss der Mikrobiota auf die Entwicklung der Darmmorphologie und der darmassoziierten Immunität im Dünndarm**

Die Mikrobiota nimmt Einfluss auf die Reifung und Differenzierung des GI-Trakts und des assoziierten Immunsystems (Kelly und Coutts, 2000; Stokes et al., 2004; Shirkey et al., 2006). Die Interaktion wurde von Shirkey et al. (2006) an 13 Tage alten keimfrei geborenen Ferkeln untersucht. In dieser Studie wurde die Kontrollgruppe über die gesamte Versuchszeit keimfrei gehalten, ein Teil der übrigen Tiere wurde entweder mit Schweinekot (konventionelle Ferkel) mit *L. fermentum* bzw. *St. epidermidis* oder mit einem nicht pathogenen *E. coli* -Stamm inokuliert. Die Länge der Dünndarmzotten war bei den konventionell behandelten Tieren, verglichen mit denen der restlichen Gruppen, signifikant geringer, bei gleichzeitigem Vorliegen von tieferen Krypten und höheren Anzahl IEL. Die längsten Zotten konnten bei den keimfreien Ferkeln in Kombination mit einer hohen Zahl vakuolisierter Enterozyten und einer dünnen *L. propria* nachgewiesen werden. Kürzere Zotten in Verbindung mit tieferen Krypten, einer geringeren Anzahl an nicht-vakuolisierten Enterozyten und gesteigerten IL-1 $\beta$ - sowie IL-6-Expression bei *E. coli*-infizierten Tieren sprechen für einen höheren Enterozytenumsatz. Die IEL-Anzahl blieb bei diesen Ferkeln jedoch konstant. Die Länge und das Gewicht des Dünndarms scheinen ebenso mit der bakteriellen Kolonisation zu korrelieren, sie lagen bei den konventionell behandelten Ferkeln über jenen der übrigen Gruppen. Es existieren verschiedene Hypothesen für die Erklärung einer bakteriell induzierten Entwicklung des Dünndarms, wobei genaue Mechanismen unbekannt sind. So könnte eine intestinale inflammatorische Antwort auf bestimmte Bakterienarten über eine verstärkte Zytokinausschüttung (Shirkey et al., 2006) ebenso wie die Bildung bakterieller Metaboliten, z. B. Ammonium und die damit verbundene Erhöhung des zellulären Stoffwechsels mit gesteigerter DNA-Synthese (Visek, 1972), eine entsprechend Differenzierung der Enterozyten stimulieren.

#### **2.5 Escherichia coli assoziierte gastrointestinale Erkrankungen beim Absetzferkel**

Die häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen treten innerhalb der ersten drei Wochen nach dem Absetzen auf und besitzen meist als Faktorenkrankheiten eine komplexe Pathogenese (Bilkei, 1996; Waldmann und Wendt, 2004). Jungtiererkrankungen, die vom Darm, insbesondere vom Dünndarm ihren Ursprung nehmen, führen häufig zu hohen wirtschaftlichen Verlusten (Casey und Bosworth, 2009). Die häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen zur Zeit des Absetzens gleichen sich im klinischen Erscheinungsbild, da sie alle mit Durchfällen und daraus resultierenden Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten einhergehen. Die sekretorische Diarrhöe ist gekennzeichnet durch die vermehrte Sekretion von Wasser (Waldmann und Wendt, 2004). Durch das erhöhte Flüssigkeitsvolumen werden vorhandene Rückresorptionskapazitäten im Dün- und Dickdarm überschritten. Die Ausbildung der sekretorischen Diarrhöe unterliegt nicht selten einer multifaktoriellen Genese

und ist häufig assoziiert mit dem Nachweis pathogener *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme. Die Pathogenität resultiert durch das Vorhandensein bestimmter Pathogenitätsfaktoren syn. Virulenzfaktoren, wie Adhäsinen (Fimbrien u.a.) für die Anheftung an das Darmepithel und thermolabilen bzw. thermostabilen Enterotoxinen (Bilkei, 1996; Waldmann und Wendt, 2004; Nagy und Fekete, 2005; Casey und Bosworth, 2009).

Enteritiden, die primär oder sekundär durch eine Infektion mit pathogenen *E. coli*-Stämmen entstehen, werden in der Literatur zur vereinfachten Darstellung dem Krankheitskomplex der Kolienteritis zugeordnet (Bilkei, 1996; Docic und Bilkei, 2003; Casey und Bosworth, 2009). Dieser Begriff umfasst auch die beim Absetzferkel häufig auftretenden klinischen Bilder einer Kolidiarrhöe und Kolienterotoxämie. Übergänge zwischen den Erkrankungen können auftreten und verursachen etwa die Hälfte aller Todesfälle bei Saug- und Absetzferkeln (Bilkei, 1996; Docic und Bilkei, 2003; Waldmann und Wendt, 2004; Fairbrother et al., 2005; Casey und Bosworth, 2009).

#### Kolidiarrhoe (Syn. PWD = Postweaning Diarrhoea)

Enterotoxische *E. coli*-Stämme (ETEC) gelten als Hauptverursacher der PWD (Bilkei, 1996; Fairbrother et al., 2005; Nagy und Fekete, 2005; Casey und Bosworth, 2009). Häufig nachgewiesene Isolate exprimieren ein oder mehr als fünf verschiedene Adhäsine K88 (F4), K99 (F5), F41, 987P (F6) und F18 (F107/2134P) sowie hitzelabile (LT1 und LT2) und hitzestabile (STa und STb) Enterotoxine (Blanco et al., 1997; Nagy und Fekete 1999; 2005). Das hitzestabile Enterotoxin STa wird zudem in eine humanpathogene (STaH) und schweinepathogene (STaP) Variante unterteilt (Moseley et al., 1983; Nagy und Fekete, 2005). Das Enterotoxin STb gilt als das am häufigsten detektierte Enterotoxin bei an Durchfall erkrankten Saug- und Absetzferkeln (Moon et al., 1986; Blanco et al., 1997), wobei eine Infektion mit STb positiven *E. coli*-Stämmen als generelle Ursache einer neonatalen Diarrhoe umstritten ist (Casey et al., 1998). Beide Enterotoxine verursachen keine Läsionen an der Dünndarmschleimhaut, aber durch Hemmung der Flüssigkeitsrückresorption (STb) bzw. Steigerung der Sekretion (LT) können sie eine lebensgefährliche Dehydrierung hervorrufen (Bilkei, 1996; Waldmann und Wendt; 2004, Fairbrother et al., 2005). Belastende Faktoren zum Absetzzeitpunkt und sekundäre virale Infektionen (Rota- und Coronaviren) scheinen das Krankheitsgeschehen zu begünstigen bzw. zu modulieren (Bilkei, 1996). Ein hoher Proteinanteil kann die Entwicklung ETEC bedingter Darmerkrankungen beeinflussen, da Proteine aufgrund ihres starken Säurebindungsvermögen eine Absenkung des pH-Wertes verhindern und somit eine gesteigerte Proliferation sowie anschließende Kolonisation pathogener *E. coli*-Stämme im Dünndarm erfolgen kann. Des Weiteren können sowohl die Proteinquelle als auch die Darreichungsform die Manifestierung einer Infektion maßgeblich beeinflussen (Hopwood und Hampson, 2003). Enteropathogene *E. coli*-Stämme (EPEC) können bei ungefähr 6 % der PWD Fälle isoliert werden (Fairbrother, 1999). Durch den Besitz des spezifischen Pathogenitätsfaktors Intimin, dem sogenannten „attaching and effacing“ Faktor, führen EPEC Infektionen zu spezifischen histopathologischen AE („attaching and effacing“-) Läsionen der Dünndarmschleimhaut mit Verlust der Mikrovilli. Die daraus resultierende Abnahme der Resorptionsfläche führt zu starken Durchfällen (Zhu et al., 1994). Es ist zudem möglich, dass PWD auslösende ETEC Stämme auch das Shigatoxin (Verotoxin) bilden können und insofern auch potenziell eine Kolienterotoxämie auslösen können (Nagy und Fekete, 1999).

#### Die Kolienterotoxämie (Syn. ED = Edema Disease)

Die häufigsten isolierten pathogenen *E. coli*-Stämme aus an ED erkrankten Tieren bilden das Adhäsion F18 und das Shigatoxin (Stx2e) syn. Verotoxin (Imberechts et al., 1992). Bei der klassischen Verlaufsform treten sichtbare Ödeme an Augenlidern und Nasenrücken in

Kombination mit ZNS- Symptomen auf. Nur ein Teil der Tiere zeigen charakteristische Symptome, einige verenden perakut oder zeigen eine unspezifische Störung des Allgemeinbefindens. Die Toxinwirkung auf die Blutgefäße steht dabei im Vordergrund. Bei der klassischen Verlaufsform treten sichtbare Ödeme an Augenlidern und Nasenrücken in Kombination mit ZNS- Symptomen auf. Durchfälle können begleitend auftreten oder werden einige Tage zuvor beobachtet. Die plötzliche veränderte Futterkomposition zum Zeitpunkt des Absetzens, insbesondere ein geringer Rohfasergehalt bei gleichzeitig hohen Rohproteingehalten, aber auch der Verlust maternaler Antikörper nach dem Absetzen scheinen den Ausbruch einer klinischen Manifestierung zu fördern (Imbrechts et al., 1992; Bilkei, 1996; Waldmann und Wendt, 2004).

## **2.6 Kurzkettige organische Säuren in der Fütterung von Absetzferkeln**

Alle kohlenstoffhaltigen Verbindungen, die Protonen abgeben können, gehören in die Gruppe der organischen Säuren. Dazu zählen Carbonsäuren wie Fettsäuren und Aminosäuren. Carbonsäuren sind organische Verbindungen und tragen eine oder mehrere funktionelle Gruppen. Je nach Anzahl der Carboxylgruppen unterscheidet man Mono-, Di- und Tricarbonsäuren. Monocarbonsäuren, die vier und mehr C-Atome tragen, werden zur Gruppe der Fettsäuren gezählt (Lehninger et al., 1994; Rampf und Sammer, 2004).

**Allgemeiner Grundbau:**                      **R-COOH** funktionelle Gruppe

Der Rest (R) kann eine gesättigte oder ungesättigte Alkyl- oder Arylgruppe einschließen, diese kann zusätzlich noch substituiert sein (Ketosäuren; Aminosäuren).

### **2.6.1 Einteilung, Vorkommen, chemische und physikalische Eigenschaften**

Die in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie verwendeten kurzkettigen organischen Säuren sind häufig natürliche Inhaltsstoffe verschiedener Pflanzen oder Verbindungen, die im Verdauungstrakt sowie im intermediären Stoffwechsel gebildet werden und gelten daher als natürliche Produkte (Schelhorn, 1951; Lueck, 1980). Im Gegensatz zu den freien Säuren sind die Salze der organischen Säuren generell geruchlos, besitzen eine geringe Flüchtigkeit und eine höhere Wasserlöslichkeit. Aufgrund dieser vorteilhaften Eigenschaften bedeutet der Zusatz der Salze, verglichen mit der Zulage der freien Säuren, eine einfachere Handhabung bei der Futtermittelproduktion (Kirchgessner und Roth, 1988; Partanen und Mroz, 1999).

#### Chemische und physikalische Eigenschaften

Monocarbonsäuren sind bis zur Butansäure (C<sub>4</sub>) gut wasserlöslich. Mit zunehmender Kettenlänge gewinnt der lipophile Anteil zunehmend an Bedeutung und die Wasserlöslichkeit nimmt deutlich ab. Durch die Substitution zusätzlicher Carboxyl- oder hydrophiler Gruppen kann die Wasserlöslichkeit verbessert werden. Da Carbonsäuren als Protonendonatoren fungieren, vermögen sie vorliegende pH-Werte zu reduzieren. In welchem Umfang dies gelingt, wird durch die Stärke einer Säure bestimmt. Über den pK<sub>s</sub>-Wert wird die Säurestärke definiert. Je kleiner der pK<sub>s</sub>-Wert, desto stärker die Säure. Entspricht der pH-Wert dem pK<sub>s</sub>-Wert der Säure, liegen zu gleichen Teilen die dissoziierte (ionisiert) und undissoziierte (nicht-ionisierte) Form der Säure vor (Schelhorn, 1951; Fieser und Fieser, 1972; Roth und Kirchgessner, 1989a). Anhand der verschiedenen pK<sub>s</sub>-Werte wird deutlich (Tab. 2), dass alle aufgelisteten kurzkettigen organischen Säuren mittelstarke Säuren sind. Der pK<sub>s</sub>-Wert der Säuren sinkt in folgender Reihenfolge: Propionsäure > Essigsäure > Ameisensäure > Milchsäure > Fumarsäure. Die Salze der organischen Säuren besitzen selbst puffernde Eigenschaften und vermögen aufgrund dessen den pH-Wert nur geringfügig zu senken (Kirchgessner & Roth, 1988; Roth & Kirchgessner, 1989; a, b). Der prozentuale Anteil der undissoziierten Form steigt bei geringeren pH-Werten (Schelhorn, 1951; Fieser und Fieser, 1972; Roth und Kirchgessner, 1989 a). In Tabelle 3 wurde am Beispiel von Ameisen- und Propionsäure die Änderung des undissoziierten Anteils in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt.

**Tabelle 2:** Zusammenstellung der chemischen und physikalischen Eigenschaften von KOS, die in der Fütterung von Schweinen verwendet werden (Fieser und Fieser, 1972; Roth und Kirchgessner 1989a)

Säureart	Molekulargewicht	Schmelzpunkt °C	pKs
Ameisensäure	48,00	8,4	3,75
Essigsäure	60,05	16,6	4,75
Propionsäure	74,08	-22	4,87
Fumarsäure	116,1	287 <sup>1</sup>	3,0 / 4,4
Milchsäure	90,08	18	3,8
Zitronensäure	192,1	153	3,14 / 5,95 / 6,39

pKs= negative dekadische Logarithmus des Zahlenwerts der Säurekonstante; Molekulargewicht = g / mol,  
<sup>1</sup>Fumarsäure besitzt unter Normaldruck keinen Schmelzpunkt, sondern sublimiert ab etwa 287 °C.

**Tabelle 3:** Prozentualer Anteil der undissoziiert Form ausgewählter Carbonsäuren in Abhängigkeit vom pH-Wert (Schelhorn, 1951)

Säure	Undissoziierter Anteil in %					
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Ameisensäure	98,0 %	83,0 %	32,0%	4,5 %	0,47 %	0,048 %
Propionsäure	99,2 %	99,0%	88,0%	42,0%	6,70 %	0,710 %

### 2.6.2 Verdauung, Absorption und Intermediärstoffwechsel

Die in der Futtermittelindustrie eingesetzten kurzkettigen organischen Säuren besitzen überwiegend kurze Kohlenstoffketten und können aufgrund der guten Wasserlöslichkeit schnell über die Darmschleimhaut resorbiert werden (Lueck, 1980). Ameisensäure spielt im Intermediärstoffwechsel bei der Übertragung von Methyl-(C-1-) Gruppen eine herausragende Rolle. Essigsäure ist in Form der aktivierten Essigsäure, Acetyl-CoA, Ausgangsstoff für wichtige Metabolisierungsschritte und dient der Energiegewinnung (Lueck, 1980; Lehninger et al., 1994). Propionsäure wird hauptsächlich zu Kohlenstoffdioxid und Wasser metabolisiert bzw. teilweise in Glukose und Glykogen eingebaut (Bässler, 1959). Kohlenhydrate und Proteine können wie im Kapitel 2.4. beschrieben in die Stoffwechselendprodukte Propionat, Azetat und Butyrat fermentativ abgebaut werden. Azetat dient der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyzeriden in der Leber, im Fettgewebe sowie während der Laktationsphase in der Milchdrüse. Im Pansen der Wiederkäuer gebildetes Propionat wird zur Biosynthese von Laktat genutzt und stellt das wichtigste Ausgangssubstrat für die Glukoneogenese beim Wiederkäuer dar (Kirchgessner et al., 2008). Milchsäure (Laktat) entsteht während der anaeroben Glykolyse aus Pyruvat sowie durch Fermentationsprozesse und wird über die Blutbahn auf die verschiedenen Gewebe verteilt. Laktat kann in der Leber zu Pyruvat oder Glukose metabolisiert werden (Lehninger, 1994; Kirchgessner et al., 2008). Fumarsäure entsteht als Zwischenprodukt im Zitronensäurezyklus aus Succinat und wird weiter zu Malat verstoffwechselt (Lehninger et al., 1994).

### **2.6.3 Einsatz von KOS in der Fütterung von Absetzferkeln**

#### Auswirkung kurzkettiger organischer Säuren auf die Pufferkapazität des Futters und pH-Werte im vorderen Verdauungstrakt von Absetzferkeln

Die Integrität des Magens stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um einen funktionstüchtigen Verdauungsprozess zu gewährleisten (Lallès et al., 2007). Eine ausreichende Salzsäureproduktion bewirkt eine funktionsfähige Motilität, eine schützende Barrierefunktion und initiiert Verdauungsprozesse (Lallès et al., 2007). Die Salzsäureproduktion ist bei Ferkeln bis zur 8. Lebenswoche nicht vollständig ausgebildet (Manners, 1976). In der Saugperiode liegen die postprandialen (ein bis drei Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme) pH-Werte im Magen in einem Bereich von 3,3 bis 3,9. In dieser Phase wird die Milchsäure (über die mikrobielle Fermentation des Milchzuckers) als hauptsächlichster azidierender Faktor angesehen (Schnabel et al. 1982). Beim Absetzferkel steigen die postprandialen pH-Werte auf bis zu 5,0 an und sinken erst innerhalb der 9. Lebenswoche, bedingt durch die zunehmende Salzsäureproduktionskapazität, wieder auf Werte unter 4,3 (Schnabel et al. 1982; Kamphues, 1988; Schnabel et al. 1982; Buchheit, 2009). Die Schwankungen während der Absetzphase können mit dem Futterwechsel und einer höheren Futtermenge pro Mahlzeit in Verbindung gebracht werden (Schnabel et al. 1982; Kirchgessner und Roth, 1988). Ein Mangel an Salzsäure bewirkt eine beschleunigte Magenentleerung, eine verkürzte Darmpassagezeit, beeinträchtigt die Verdauungsvorgänge und wird als wesentliche Ursache für Verdauungsstörungen und die damit verbundene geringere biologische Leistung der Ferkel angesehen (Roth und Kirchgessner, 1989 a, b; Leśniewska et al., 1998; Boudry et al., 2004; Bligney et al., 2005; Lallès et al., 2007). Eine unzureichende Durchsäuerung des Mageninhalts bedingt außerdem eine verminderte hydrolytische Spaltung von Nahrungsproteinen. Eine umfangreiche Proteolyse findet erst bei Magen-pH-Werten unter 4,0 statt, wobei beim Schwein eine maximale Pepsinaktivität in einem Bereich von pH 1,8-2,8 und 3,5-3,8 nachgewiesen werden konnte (Taylor, 1959). Ein zu hoher pH-Wert im Magen gilt außerdem als Risikofaktor im Sinne einer verminderten Barrierefunktion gegen exogene Keime (Smith und Jones, 1963; Sangild et al., 2000). Um die Auswirkungen der bestehenden limitierten Salzsäureproduktion nicht zu verstärken, ist in der Fütterung von Absetzferkeln insbesondere auf eine geringe Pufferkapazität des Futters zu achten. Die Reduzierung der Nahrungskomponenten mit säurepuffernden Eigenschaften, insbesondere des Rohproteins und der Mineralstoffe, stellen wichtige Maßnahmen in der Rationsgestaltung für Absetzferkel dar (Kamphues, 1988; Roth und Kirchgessner, 1989 a, b; Kirchgessner, 2008). Durch die bereits beschriebene Möglichkeit den pH-Wert zu reduzieren, ermöglicht die Zulage von kurzkettigen organischen Säuren in der Ration von Absetzferkeln einerseits die Pufferkapazität des Futters zu mindern und andererseits den pH-Wert im vorderen Verdauungstrakt, insbesondere im Magen, abzusenken (Pollmann et al., 1980; Kirchgessner und Roth, 1988; Roth und Kirchgessner, 1989 a, b; Roth et al., 1993; Radcliff et al., 1998; Canibe et al., 2005; Kirchgessner, 2008). Letzteres kann die durch den Mangel an Salzsäure beeinträchtigten Verdauungsvorgänge teilweise ausgleichen und gleichzeitig die Zusammensetzung der Mikrobiota im vorderen GI-Trakt der Ferkel modulieren. Kurzkettige organische Säuren vermögen insofern die biologische Leistung der Ferkel indirekt zu beeinflussen (Kirchgessner und Roth, 1988; Roth und Kirchgessner, 1989 a, b; Roth et al., 1993; Kirchgessner, 2008). Eine Ansäuerung des Futters durch kurzkettige organische Säuren bewirkt zudem eine Erhöhung der Lagerstabilität und Reduzierung der mikrobiellen Belastung, insbesondere bei Futtermitteln mit einem Feuchtegehalt von über 12,5 % (Geary et al., 1999).

Fumarsäure und Zitronensäure waren in der Vergangenheit die in der Fütterung von Schweinen am häufigsten eingesetzten organischen Säuren, allerdings trat Ameisensäure als

kostengünstigere Alternative immer stärker in den Vordergrund (Kirchgessner und Roth, 1988; Partanen und Mroz, 1999). Die Supplementierung von Milchsäure wird zudem als günstig, unter dem Aspekt der entzogenen Muttermilch, angesehen. Die Milchsäure kann dabei direkt oder gegebenenfalls durch die Gabe von Milchsäurebakterien (Probiotikum) in den Verdauungstrakt gelangen (Pollmann et al., 1980).

#### Einfluss von kurzkettigen organischen Säuren auf die biologische Leistung von Absetzferkeln

Die Wirkung der organischen Säuren wird maßgeblich durch die Art der Säure und durch die gewählte Konzentrationsstufe beeinflusst (Partanen und Mroz, 1999). Bei Absetzferkeln und Mastschweinen konnte für Fumarsäure ein Wirkungsmaximum in Konzentrationen zwischen 1,5 -2 % festgestellt werden, wobei das Konzentrationsoptimum der Zitronensäure mit 4,5 % deutlich höher lag (Kirchgessner und Roth, 1975). Bei Absetzferkeln konnte nach Fütterung beider Säuren eine leistungssteigernde Wirkung durch eine Verbesserung von Lebendmassezunahme, Futteraufnahme und Futteraufwand bestätigt werden (Kirchgessner und Roth, 1975, 1976, 1978 a, b; Giesting und Easter, 1985). Allerdings war teilweise, vermutlich durch die geringe Schmackhaftigkeit der Säuren, auch ein leichter Rückgang der Futteraufnahme zu verzeichnen (Thacker et al., 1980; Edmonds et al., 1985; Falkowski und Aherne, 1984; Giesting und Easter, 1985; Radecki et al., 1988). Die Lebendmassezunahme lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Futteraufnahme nicht ausschließlich über eine verbesserte Schmackhaftigkeit erklären und soll, zumindest nach Fütterung mit Ameisen-, Fumar- sowie Buttersäure, im Zusammenhang mit einer Erhöhung der praecaecalen Verdaulichkeit der Nährstoffe sowie der umsetzbaren Energie stehen (Kirchgessner und Roth, 1978 b, 1980; Blank et al., 1998; Mroz et al., 2000; Franco et al., 2005). Einige Untersuchungen verfehlten den Nachweis verdauungsfördernder Effekte und widersprachen dieser Hypothese (Radecki et al., 1988; Gabert und Sauer, 1995). Die Proteinquelle sowie der Proteingehalt in der Ration sollen außerdem die Eigenschaften der kurzkettigen organischen Säuren hinsichtlich der Nährstoffverdaulichkeit maßgeblich beeinflussen (Kirchgessner und Roth, 1978 b, 1980; Blank et al., 1998; Mroz et al., 2000). So konnte der Zusatz von Fumarsäure und Sojakonzentrat als Hauptproteinquelle, verglichen mit Casein bzw. getrockneter Magermilch als Proteinquelle, höhere tägliche Zunahmen sowie eine Verbesserung der Futtermittelverwertung erzielen (Giesting und Easter, 1991; Giesting et al., 1995). Die Anwendung der Salze der Ameisensäure (Ca- und Na-Formiate) erreichte bei abgesetzten Ferkeln und Mastschweinen erst durch eine geeignete Kombination mit Fumar- oder Ameisensäure eine leistungssteigernde Wirkung (Kirchgessner und Roth, 1987a, b). Die Zugabe der freien Säuren soll dabei eine Potenzierung der Azidität bewirken und somit durch Absenkung des pH-Wertes eine effizientere Proteinverdauung ermöglichen (Kirchgessner und Roth, 1987 a, b). Am Beispiel der Ameisensäure konnte gezeigt werden, dass die Lebendmasse der Tiere Einfluss auf die Wirkung der Säuren haben kann. So erzielte die Zugabe von 1,8 % Ameisensäure zu pelletiertem Grundfutter nur bei Schweinen mit Lebendmassen von 27 bis 99 kg eine signifikante Steigerung der täglichen Zunahme (Siljander-Rasi et al., 1998; Canibe et al., 2005).

#### Antibakterielle Effekte und Beeinflussung der gastrointestinalen Mikrobiota durch den Zusatz von kurzkettigen organischen Säuren

Genauere Mechanismen der antimikrobiellen Wirkung von kurzkettigen organischen Säuren sind noch nicht eindeutig geklärt. Das Säureanion wird als wichtiger antimikrobieller Faktor diskutiert (Roth et al., 1993). In undissoziierter Form sollen die Säuren durch freie Diffusion in das Bakterienzellinnere gelangen und aufgrund der vorherrschenden alkalischen Bedingungen dissoziieren. Durch Absenkung des pH-Wertes im Zellinneren erfahren

wichtige Bakterienenzyme eine irreversible Schädigung, dies kann zur Wachstumshemmung oder zum Absterben der Bakterien führen (Schelhorn, 1951; Hunter und Segel, 1972; Lueck, 1980, van Immerseel et al., 2006).

*In vitro*-Studien konnten durch Bestimmung der Keimzahl und Messung bakterieller Metaboliten für Ameisensäure, Propionsäure, Buttersäure, Milchsäure und Fumarsäure eine pH-abhängige antibakterielle Wirkung bestätigen (Knarreborg et al., 2002; Chaveerach et al., 2002; Boyen et al., 2008). Bei pH 3 und 4 war es möglich, durch Zusatz der Säuren eine signifikante Reduktion koliformer Keime, Laktobazillen und *Campylobacter* ssp. zu erreichen, bei pH 5 und 7 dagegen konnte nur die Anzahl der koliformen Keime gemindert werden (Knarreborg et al., 2002; Chaveerach et al., 2002).

*In vivo* wurde überwiegend eine Kombination aus verschiedenen organischen Säuren dem Futter und Trinkwasser zugesetzt. Der Erfolg bei der Bekämpfung von Infektionen mit pathogenen *E. coli*-Keimen gestaltete sich unterschiedlich. ETEC-bedingte Durchfälle konnten durch den Einsatz unterschiedlicher organischer Säuren (Propionsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Apfelsäure, Zitronensäure, Fumarsäure) erfolgreich kontrolliert werden. Verglichen mit der Kontrollgruppe konnte die Anzahl der Neuerkrankungen in einem Bestand signifikant gesenkt und gleichzeitig eine Milderung des Schweregrads der Erkrankung erreicht werden (Tsilyoyannis et al., 2001). Ameisensäure bewirkte eine signifikante Reduktion der totalen Anaerobieranzahl sowie von Laktobazillen, Enterobakterien und Hefen im Verdauungskanal von Aufzuchtferkeln (Canibe et al., 2005). Die Fütterung von 1,2 % Kaliumdiformat führte zu einer Verminderung koliformer Keime im Duodenum, Jejunum und Ileum von Mastschweinen (Overland et al., 2000). Durch Reduktion koliformer Bakterien, insbesondere im mittleren Dünndarm, führte die kombinierte Zulage von Ameisen- und Milchsäure zu einem günstigen Verhältnis zwischen Laktobazillen und koliformen Bakterien (Franco et al., 2005). Andererseits führte die Futter- oder Wasserazidierung durch eine Mischung aus Fumarsäure, Milchsäure, Propionsäure und Zitronensäure bei abgesetzten Ferkeln zu keiner veränderten Anzahl an *E. coli*-Stämmen im Kot (Walsh et al., 2007; Canibe et al., 2001). Die Zulage von Fumar- oder Zitronensäure hatte außerdem keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl kultivierter Anaerobier, Laktobazillen oder *E. coli*-Stämme aus der Digesta des Magens, Jejunums, Kolons und Zäkums (Risley et al., 1992). Auch die Applikation einer Mischung aus organischen Säuren (Ameisensäure, Propionsäure, Essigsäure, Sorbinsäure) über das Trinkwasser und Futter 14 Tage vor der Schlachtung bewirkte keine signifikante Reduktion Salmonellen-positiver Proben bei den Schlacht tieruntersuchungen. Dies könnte durch eine zu kurze Adaptionszeit oder durch Kreuzkontaminationen während des Transports bzw. innerhalb der verschiedenen Schlachtungsprozesse zu erklären sein (De Busser et al., 2009).

## **2.7 Mittelkettige Fettsäuren in der Fütterung von Absetzferkeln**

### **2.7.1 Chemische Struktur und natürliches Vorkommen**

Zu den aus ernährungsphysiologischer Sicht wichtigen mittelkettigen Fettsäuren zählen gesättigte sowie unverzweigte Monocarbonsäuren. Sie besitzen eine gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen, da sie wie fast alle natürlich vorkommenden Fettsäuren aus C<sub>2</sub>-Einheiten (Acetyl-CoA) aufgebaut werden. Die Kohlenwasserstoffkette besteht aus sechs bis zehn Kohlenstoffatomen (Marten et al., 2006; Ooyama et al., 2007). In diese Gruppe gehören die Capron- (C<sub>6:0</sub>, Hexansäure), Capryl- (C<sub>8:0</sub>, Octansäure) und Caprinsäure (C<sub>10:0</sub>, Decansäure). In der Literatur wird häufig auch Laurinsäure mit 12 Kohlenstoffatomen (Dodecansäure) in die Gruppe der MKFS eingeordnet (Bach und Babayan, 1982; Kabara et al., 1972, Traul et al., 2000; Labarthe et al., 2008). Ungerade mittelkettige Fettsäuren, wie Önanthsäure oder Pelargonsäure, spielen lediglich in der Kosmetikindustrie als Duftstoffe beziehungsweise als ätherische Öle eine Rolle.

Fette (Neutralfette; Triglyzeride) sind aus drei unterschiedlichen Fettsäuren und Glycerin aufgebaut. Die Eigenschaften der Fette werden ganz wesentlich durch ihre Fettsäuren beeinflusst. Natürlicherweise kommen mittelkettige Fettsäuren als Teil von Triglyzeriden (MK-TG) im Milchfett und bei verschiedenen pflanzlichen Fetten wie Kokos- und Palmkernöl sowie im Öl der *Cuphea*-Samen vor (Graham et al., 1981; Dierick et al., 2003; Marten et al., 2006). Kokosnussöl besitzt 3,4-15 % Caprylsäure, 3,2-15 % Caprinsäure und 41-56 % Laurinsäure. Die prozentuale Zusammensetzung der MKFS im Palmkernöl gestaltet sich nahezu gleich, wobei die C:8- und C:10-Gehalte geringfügig niedriger sind (Young, 1983). Die Raffinierung von Kokos- und Palmkernöl beinhaltet kostenintensive Arbeitsschritte (Dierick et al., 2003; Nandi et al., 2005). Das Öl verschiedener *Cuphea*-Arten stellt dagegen eine günstige natürliche MK-TG-Quelle in der Schweinefütterung dar (Dierick et al., 2003). Die Samen der *Cuphea*-Pflanzen besitzen einen extrem hohen Gehalt an MKFS, die Zusammensetzung und das Verhältnis der Säuren variiert stark zwischen den verschiedenen Arten, der Gehalt an Laurinsäure (C:12) prädominiert jedoch innerhalb der *Cuphea* Pflanzen (Graham et al., 1981). Das Öl von *Cuphea lanceolata* und *Cuphea ignea* besitzt über 80 % Caprinsäure und nur einen geringen Anteil an Caprylsäure (Dierick et al., 2003).

Je nach Spezies sind mittelkettige Fettsäuren (MKFS) in unterschiedlichen Konzentrationen im Milchfett vorhanden. Hohe Konzentrationen enthält die Milch von Maus, Ratte, Kaninchen, Ziege, Pferd und Elefant. In Kuh-, Schaf- und der humanen Muttermilch liegen sie nur in geringem Maße vor und sind nahezu nicht nachweisbar in der Milch von Schwein, Kamel und Meerschweinchen (Witter und Rock, 1970; Decuypere und Dierick, 2003). Gründe für die unterschiedlichen Konzentrationen sind bisher noch nicht eindeutig geklärt (Decuypere und Dierick, 2003). In der Milchdrüse von Ratten soll jedoch die hohe Aktivität einer gewebespezifischen Thiosterase (Thiosterase II) dafür verantwortlich sein. Durch einen verstärkten Abbau langkettiger Fettsäuren durch dieses Enzym sollen vermehrt freie MKFS generiert werden (Libertini und Smith, 1978).

### **2.7.2 Chemische und physikalische Eigenschaften**

Mittelkettige Fettsäuren besitzen, verglichen mit langkettigen gesättigten Fettsäuren, einen niedrigeren Schmelzpunkt und liegen bei Raumtemperatur in flüssiger Form vor. Ein geringeres Molekulargewicht, bedingt durch eine geringere Länge der lipophilen Kohlenwasserstoffkette, führt zu einer verbesserten Wasserlöslichkeit. Bei neutralem pH-Wert liegen die MKFS überwiegend dissoziiert (ionisiert) vor (Greenberger und Skillmann, 1969; Bach und Babayan, 1982; Odle, 1997). In Tabelle 4 sind die wichtigsten chemischen Eigenschaften der MKFS zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Chemische Eigenschaften von Capron-, Capryl-, Caprin- und Laurinsäure (Beckett und Moffat, 1969; Hsiao und Siebert, 1999)

<b>Fettsäure</b>	<b>Molekulargewicht (Da)</b>	<b>Schmelzpunkt (°C)</b>	<b>pKs</b>
Capronsäure (C6:0)	116,2	-3,4	4,88
Caprylsäure (C8:0)	144,2	16,7	4,89
Caprinsäure (C10:0)	172,3	31,9	4,89
Laurinsäure (C12:0)	200,3	44,0	5,13

pKs= negativer dekadischer Logarithmus des Zahlenwerts der Säurekonstanten; Molekulargewicht = g / mol

### **2.7.3 Verdauung, Absorption und Metabolisierung**

Aufgrund der unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden sich die mittelkettigen Triglyzeride (MK-TG) von langkettigen Triglyzeriden (LK-TG) hinsichtlich der Verdauung, Absorption und Metabolisierung.

#### Verdauung und Absorption

Die Hydrolyse mittelkettiger Triglyzeride erfolgt, verglichen mit der von langkettigen Fettsäuren, schneller und in größerem Umfang. Durch die Magenmotorik werden Fette emulgiert, dadurch vergrößert sich die angreifbare Oberfläche und präduodenale Lipasen (Zungengrundlipasen und Magenlipasen) können bereits im Magen aktiv werden. Sie spalten MK-TG und LK-TG in Monoglyzeride und spalten bereits im vorderen Verdauungstrakt freie mittelkettige Fettsäuren ab (Greenberger und Skillmann 1969; Odle, 1997). Im Duodenum erfolgt die Freisetzung mittelkettiger Fettsäuren schnell und nahezu vollständig durch die Aktivität der Pankreaslipase (Ramirez et al., 2001). Der Hauptanteil der mittelkettigen Fettsäuren wird in freier Form passiv über die Darmschleimhaut resorbiert, nur ein geringer Anteil gelangt als Monoglyzeride und über das Portalblut (V. portae) zur Leber (Greenberger und Skillman, 1969; Bach und Babayan, 1982; Babayan, 1987; Guillot, 1993; Lehninger et al., 1994; Odle, 1997; Carvajal et al., 2000). Unter Einwirkungen von Gallensalzen bzw. Gallensäuren entstehen unter Einbeziehung der Monoglyzeride Mizellen. Außen besitzen diese kleinen „Tröpfchen“ hydrophile und im Inneren lipophile Eigenschaften und stellen somit ein optimales Transportmedium für die nur wenig wasserlöslichen langkettigen Fettsäuren dar. Durch diese Mizellen erfolgt die Aufnahme langkettiger Fettsäuren über freie Diffusion in die Enterozyten. Im Inneren erfolgt eine Reesterung zu Triglyzeriden. Diese gelangen über wasserlösliche Lipoproteine (Chylomikronen) in die Lymphe und in den Brustlymphgang (Ductus thoracicus) und erreichen auf diesen Weg die Blutbahn. Nur ein geringer Teil der freien mittelkettigen Fettsäuren wird in diese Chylomikronen aufgenommen und im Fettgewebe gespeichert oder im Muskelgewebe zur Energiegewinnung genutzt (Greenberger und Skillman, 1969; Bach und Babayan, 1982; Babayan, 1987; Odle, 1997). Bei dem Vorliegen von Pankreas- und Gallengangserkrankungen werden MK-TG zu einem gewissen Anteil auch intakt durch die Enterozyten aufgenommen, intrazellulär hydrolytisch gespalten und über das Blut weiter transportiert (Playoust und Isselbacher, 1964; Valdivieso et al., 1972). Hinweise einer solchen intrazellulären Hydrolyse ergaben sich auch aus Versuchen an fistulierten Schweinen, wobei sich nach wiederholten Duodenalinfusionen ein biphasischer Konzentrationsverlauf der freien Fettsäuren im Portalblut abzeichnete. Anstiege der Konzentrationen traten bereits 15 Minuten und erneut 75 bis 95 Minuten nach Infusion

auf. Der rasch einsetzende Konzentrationspeak ist wahrscheinlich durch die direkte Resorption freier MKFS zu erklären, während die verzögerte Antwort für intrazelluläre hydrolytische Vorgänge spricht (Guillot et al., 1993, 1994).

### Metabolisierung

Der Hauptteil der resorbierten freien mittelkettigen Fettsäuren wird durch Bindung an Serumalbumin direkt zur Leber transportiert (Bloch, 1974; Bach und Babayan, 1982; Guillot et al., 1993, 1994) und über die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation zur Energiegewinnung genutzt (Wojtczak und Schonfeld, 1993; Turner et al., 2009). In der Leber ist es den MKFS möglich, unabhängig von der Carnitin-Palmitoyl-Transferase, die mitochondriale Membran zu passieren (Sidossis et al., 1996; Rasmussen et al., 2002). Intramitochondrial werden sie durch die mittelkettige-Acyl-CoA-Synthetase aktiviert und in Gegenwart von Carnitin oxidiert (Ikeda et al., 1985; Van Kempen und Odle, 1993; Lehninger et al., 1994). Die intramitochondriale  $\beta$ -Oxidation dient der Energiegewinnung und stellt den Hauptstoffwechselweg der mittelkettigen Fettsäuren dar (Bach und Babayan, 1982; Odle, 1997; Traul et al., 2000). Nur ein geringer Anteil unterliegt einer Elongation zu langkettigen Fettsäuren und dient der Resynthese von Triglyzeriden (Sheig und Klatskin 1968; Carnielli et al., 1994) bzw. wird im Fettgewebe gespeichert (Sarda et al., 1987). Energetische Untersuchungen an neugeborenen Ferkeln zeigten eine deutlich effizientere energetische Ausnutzung von MKFS. Verglichen mit den Werten nach der Fütterung von LK-TG stiegen die Werte für 3-Hydroxybutyrat (BHBA) nach der Gabe von MK-TG deutlich stärker an (Odle et al., 1989). Der Anstieg der BHBA-Konzentrationen ist abhängig von der Kettenlänge. Je länger die Kettenlänge der Fettsäuren, umso geringer waren die gemessenen Werte (Odle et al., 1991 a, b). Ergebnisse von *in vitro*-Untersuchungen an isolierten Hepatozyten unterstützen eine von der Kettenlänge abhängige Metabolisierung, kürzere Fettsäuren wurden, verglichen mit langkettigen Fettsäuren, um 40% schneller zu CO<sub>2</sub> und anderen Abbauprodukten (u.a. Ketonkörper) metabolisiert (Odle et al., 1991 a).

### 2.7.4 Einstufung der Toxizität von MKFS

MK-TG und MKFS werden von der U.S. Food and Drugs Administration mit der Kategorie „GRAS“ (Generally recognized as safe) als sicher für Ernährungszwecke angesehen. Mittels zahlreichen Studien wurde bereits eine mögliche orale, parenterale und dermale Toxizität an verschiedenen Labortieren und am Menschen untersucht. Die Ergebnisse der heterogenen Studien belegten einheitlich eine geringe Toxizität. Es gab bislang keine Hinweise auf ein vorhandenes allergenes Potential, allerdings führte die direkte Applikation höherer Dosen in die Augen und auf die Haut zu einer schwachen Irritation (Traul et al., 2000).

Bei *in vitro*-Versuchen konnte nach Zugabe millimolarer Konzentration von C:6 und C:10 auf Säugerzellkulturen (HeLa-Zellen, humane Fibroblasten und murine Neuroblastomazellen) strukturelle Veränderungen und ein Wachstumsstillstand dieser Zellen beobachtet werden (Sheu et al., 1975). Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen sind zur Charakterisierung möglicher toxischer Effekte bedeutsam, allerdings muss dabei beachtet werden, dass diese Modelle nicht ohne Weiteres auf *in vivo*-Toxizität schließen lassen, da mögliche negative Effekte durch das komplexe Zusammenspiel von physiologischen Faktoren wie Serum-, Chymus- und Muzinqualität neutralisiert werden können (Kanai und Kondo, 1979; Traul et al., 2000).

### **2.7.5 MKFS als Energiequelle und Auswirkung auf die biologische Leistung von Absetzferkeln**

MKFS werden in der Humanmedizin bei Erkrankungen wie Lipidabsorptionsstörungen, Malabsorptionszuständen, Pankreasinsuffizienz, Gallenblasenerkrankungen (Cystitis fibrosis), Gastroenteritiden, Diabetes mellitus sowie als Energiequelle bei der parenteralen Ernährung frühgeborener Säuglinge eingesetzt (Borum, 1992; Heird et al., 1992; Odle, 1997; Traul et al., 2000). MKFS stellen für den Organismus eine schnell verfügbare Energiequelle dar und können daher insbesondere in der Jungtierernährung zur Verbesserung der Energieversorgung eingesetzt werden, da bei jungen Ferkeln, wie bei Säuglingen, eine sehr hohe postnatale Oxidationskapazität für diese Fettsäuren nachgewiesen werden konnte (Van Kempen und Odle, 1993; Odle et al., 1994; Heo et al., 2002). In der Schweinefütterung sind die energieliefernden Eigenschaften der MK-TG ebenfalls von hohem Interesse. Die Supplementierung von 10 % MK-TG in der Ration von Sauen in der späten Gestations- und frühen Laktationsphase führte zwar zu keinen Unterschieden bei den Geburtsgewichten sowie der Anzahl lebender Ferkel pro Sau, aber drei Tage nach der Geburt und über das Absetzen hinaus konnte eine Steigerung der Überlebensrate der Ferkel erzielt werden, insbesondere bei Tieren mit einem Geburtsgewicht von unter 900 g (Azain, 1993). Dieses Phänomen konnte allerdings nicht mit der Aufnahme von Sauenmilch in Zusammenhang gebracht werden, da die gezielte Zufütterung von MKFS keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des Milchfetts hatte (Azain, 1993). Die erhöhten Blutglukosewerte am Tag der Geburt deuteten eher auf einen pränatalen Effekt der MKFS hin, wobei sich die Verbesserung des Energiestatus wahrscheinlich auch positiv auf das Überleben der Ferkel auswirken konnte (Newcomb et al., 1991; Azain, 1993).

Die kombinierte Gabe von MK-TG mit verschiedenen Lipasen führte bei Absetzferkeln zu einer Erhöhung der täglichen Körpermassenzunahme um 10% und zu einer Absenkung des Futteraufwandes um 3% (Dierick et al., 2002 b). Bei der Überprüfung verschiedener Fettquellen (MK-TG, Sojaöl und tierisches Fett) auf die Lebendmassezunahme und Futteraufnahme wurde zusätzlich deutlich, dass die Fütterung von MK-TG innerhalb der ersten 14 Tage nach dem Absetzen die Lebendmasseszunahme steigern und den Futteraufwand verbessern konnte (Dove et al., 1993). Bei der Untersuchung zum Einsatz freier und gecoateter mittelkettiger Fettsäuren in der Fütterung von Absetzferkeln konnte jedoch keine signifikante Beeinflussung der biologischen Leistung festgestellt werden. Tendenziell lag die Futteraufnahme, insbesondere bei der Verwendung der gecoateten Fettsäuren, über der Kontrollgruppe (Buchheit, 2009). Aufgrund des intensiven ziegenartigen Eigengeruchs unveresterter Fettsäuren führt der Einsatz freier mittelkettiger Fettsäuren häufig zu einer verringerten Futteraufnahme (Odle et al., 1991 a, b; Decupere und Dierick, 2003). Der Zusatz von Aromastoffen sowie das Coating konnten eine bessere freiwillige Aufnahme dieser Produkte bewirken (Buchheit, 2009).

### **2.7.6 Einfluss von MKFS auf die Morphologie und das lokale darmassoziierte Immunsystem im Dünndarm**

MKFS können auch direkt von den Enterozyten zur Energiegewinnung genutzt werden und wirken sich insofern indirekt auf die Funktionalität des Darmgewebes bei Absetzferkeln aus (Guillot et al., 1993; Greenberger et al., 1965). Die mit dem Absetzen assoziierten Veränderungen der Morphologie, Physiologie und lokalen Immunität wurde bereits unter Punkt 2.2.2 bzw. Punkt 2.3.2 ausführlich beschrieben. Untersuchung zum Einfluss MKFS auf diese Parameter beim Absetzferkel sind jedoch nur in geringer Zahl vorhanden.

Die Fütterung von MK-TG zeigte bei Ratten eine positive Beeinflussung der Darmmorphologie und -physiologie und zwar durch die Erhöhung der Mukosamasse mit

einem erhöhten Phospholipid/Proteinverhältnis in den jejunalen Mikrovilli, längeren Dünndarmzotten in Verbindung mit einer geringeren Kryptentiefe sowie einer gesteigerten Aktivität membrangebundener Enzyme (Takase und Goda 1990; Galluser et al., 1993). Ähnliches wurde auch beim Einsatz MKFS durch Zusatz von *Cuphea*-Samen (*C. lanceolata* und *C. ignea*) und Lipase in der Schweinefütterung beobachtet. Die Ferkel dieser Fütterungsgruppe wiesen acht Tage nach dem Absetzen eine signifikante Steigerung der Zottenlänge im distalen Bereich des Dünndarms auf, gepaart mit einer geringeren Kryptentiefe entlang des gesamten Dünndarms und einem größeren Verhältnis von Villuslänge/Kryptentiefe in beiden Abschnitten sowie einer signifikant geringeren Anzahl an IEL im proximalen Dünndarm (Dierick et al., 2003). Eine verringerte Anzahl an IEL könnte eine verminderte Apoptoserate widerspiegeln und mit den längeren Zotten sowie der Verringerung der Kryptentiefe in Zusammenhang stehen (Dierick et al., 2003). Zur Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems liegen bisher wenige Ergebnisse vor. MKFS sind generell in der Lage an den auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen exprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR84 zu binden. Diese Bindung führt zur gesteigerten Produktion von IL-12, einem wichtigen Zytokin für die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (Wang et al., 2006). In *in vitro*-Versuche an humanen Kolonzellen (Caco-2-Zelllinie) zeigten eine stimulierende Wirkung auf die Expression von IL-8 durch Caprinsäure (Tanaka et al., 2001), während Caprylsäure und MK-TG *in vitro* eine hemmende Wirkung auf dieses Zytokin ausübte (Hoshimoto et al., 2002). Bei Ratten, die über eine Magensonde MK-TG erhielten, wurde am Dünndarm nach einer Lipopolysaccharid (LPS)-Injektion ein signifikanter Anstieg der Expression von Interleukin IL-6 und eine darauf folgende Immunglobulin (Ig) A-Sekretion festgestellt (Kono et al., 2004). Die IgA-Sekretion und die Modulation der Zytokinausschüttung nach LPS-Injektion könnte eine positive Wirkung auf die Darmgesundheit anzeigen, da IgA insbesondere für den lokalen Schutz der Schleimhäute verantwortlich ist.

### **2.7.7 Einfluss von MKFS auf die gastrointestinale Mikrobiota bei Absetzferkeln**

#### Antibakterielle Wirkmechanismen von MKFS

Aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung wurden MKFS beispielsweise zur Konservierung von Futtermitteln, speziell in Silage (Woolford, 1975), in Lebensmitteln und in pharmazeutischen Produkten (Freese et al., 1973; Ostling und Lindgren, 1993) eingesetzt. Viele *in vitro*-Untersuchungen belegen, dass mittelkettige Fettsäuren und ihre Monoglyceride pathogene Bakterien inaktivieren können.

In den frühen 70er Jahren betrachtete man Fettsäuren überwiegend als anionische Oberflächenwirkstoffe, die aufgrund dieser Eigenschaft antibakterielle Effekte erzielen konnten (Kabara et al., 1972). Eine Membrandestabilisierung durch die Einlagerung von MKFS in die Zellwand und Zytoplasmamembran der Bakterien sowie die Hemmung mikrobieller Lipasen, die zur Kolonisation der Haut und intestinalen Mukosa benötigt werden, können weitere mögliche Wirkmechanismen darstellen (Isaacs et al., 1995; Bergsson et al., 1998, 2002). Die Aktivierung autolytischer Enzyme soll außerdem bei einer wirksamen Abwehr von Pathogenen eine Rolle spielen (Tsuchido et al., 1985). *In vitro*-Untersuchungen konnten eine negative Korrelation zwischen einem steigendem pH-Wert und der Wirksamkeit der MKFS aufzeigen, so dass die antibakterielle Wirkung möglicherweise auch *in vivo* vom Dissoziationsgrad der Fettsäuren abhängig ist. Der undissoziierten Form wird generell eine stärkere Wirkung zugesprochen (Hsiao und Siebert, 1999; Sun et al., 2002). Die Aufnahme der undissoziierten Fettsäuren in die Bakterienzelle soll zytotoxische Effekte zur Folge haben. In der Zelle sollen MKFS, gleich den kurzkettigen organischen Säuren, im alkalischen Zytoplasma in Protonen und Anionen dissoziieren und eine pH-Wert-Absenkung bewirken.

Infolge dessen werden zytoplasmatische Enzyme inaktiviert, was zum Absterben der Bakterienzelle führt (Freese et al., 1973; Hsiao und Siebert, 1999). Der pH-Wert des umgebenden Milieus kann insofern die Wirksamkeit von MKFS entscheidend beeinflussen (Eklund, 1983; Hsiao und Siebert, 1999; Sun et al., 2002). Bei neutralen pH-Werten liegen MKFS überwiegend in dissoziierter Form vor, erst bei pH-Werten zwischen 3 und 6 kann das Gleichgewicht zugunsten der undissoziierten Form verschoben werden und möglicherweise eine höhere antibakterielle Wirkung bedingen (Bach und Babayan, 1982; Greenberger und Skillmann, 1969; Odle et al., 1997; Dierick et al., 2002 a).

#### In vitro- und in vivo-Untersuchungen zum Einfluss von MKFS auf die Mikrobiota beim Absetzferkel

Die Entwicklung der Mikrobiota und ihre Bedeutung für die abgesetzten Ferkel wurde bereits unter Punkt 2.4.1 bzw. 2.4.2 ausführlich erörtert.

*In vitro* zeigte aus dem Magen gesäugter Kaninchen isoliertes Milchfett eine antibakterielle Wirkung. Das Milchfett hatte dabei eine stärkere inhibitorische Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus* und *Clostridium perfringens*, verglichen mit *Escherichia coli* und *Streptococcus faecalis*. Die in der Milch enthaltenden mittelkettigen Fettsäuren Capryl- und Caprinsäure zeigten die stärkste Aktivität (Canas-Rodriguez und Smith, 1966). Es folgten weitere *in vitro*-Studien, um die potenzielle antibakterielle Wirkung verschiedener mittelkettiger Fettsäuren zu untersuchen. Die Kombination von Capryl- und Caprinsäure konnte unter Simulierung gastraler Bedingungen *in vitro* beim Erreichen einer Konzentration von 0,35 g MKFS / 100 g Medium (25 mM) bzw. 0,45 g / 100 g frische Digesta eine signifikante (> 10 fache) Reduktion der anaeroben und koliformer Keime bewirken, Konzentrationen unterhalb dieser Grenze wurden als unwirksam eingestuft (Dierick et al., 2002 a, b). Die Hemmung koliformer Keime und von *Salmonella* Typhimurium konnte auch an einem porzinen permanenten Zellkulturmodell, unter Simulierung der im Zäkum vorherrschenden Verhältnisse, erfolgreich getestet werden. Allerdings konnten diese Daten *in vivo* nicht reproduziert werden (Messens et al., 2010). Die *in vitro* benötigte minimale Hemmkonzentration (MHK), um *E. coli* und *Salmonella* spp. zu inhibieren, lag für Caprinsäure bei 0,5 mM (Sprong et al., 2001) bzw. für Caprylsäure bei 12 mM (Hsiao und Siebert, 1999). Die Erhöhung des pH-Wertes bedingte *in vitro* eine Veränderung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von MKFS gegenüber *Salmonella* Typhimurium. Bei pH-5,0 befand sich die MHK der Säuren bei 20 mM, die Anhebung des pH-Wertes auf 6,0 bedingte den Anstieg der MHK auf über 40 mM (Boyen et al., 2008).

*In vivo* wurde die Auswirkung von Natrium-Caprat auf die ileale Mukosa von Ratten von Cox et al. (2008) untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Salz der Fettsäure eine Adhäsion und nachfolgende Invasion von *Salmonella* Typhimurium in die Schleimhaut verhindern konnte. Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten auf, dass die bakterizide Wirkung der Fettsäure gegenüber *Salmonella* Typhimurium Konzentrationsabhängig ist. So konnte eine signifikante Reduktion bei einer Konzentration von 30 mM Na-Caprat erzielt werden. Nach einer gleichzeitigen oralen Applikation von Monocaprin (2,5 mg/ml) und *Vibrio cholerae* an Mäuse konnte im Ileum und Zäkum dieser Erreger in der Versuchsgruppe nicht mehr nachgewiesen werden. Dies könnte eine prophylaktische Indikation bestätigen, da es möglich erscheint, eine Kolonisation pathogener Erreger durch MKFS zu verhindern (Petschow et al., 1998). Auch beim Nutzgeflügel wurden MKFS hinsichtlich antibakterieller Effekte überprüft. Durch *Campylobacter jejuni* induzierte Gastroenteritiden stellen weltweit gefährliche Zoonoseerkrankungen beim Menschen dar. Infiziertes Geflügelfleisch wird als Hauptinfektionsquelle gesehen. Um die *Campylobacter*-Infektionen in Geflügelbetrieben zu minimieren, wurde Monocaprin mit dem Futter oder über das Trinkwasser eingesetzt (Hilmarsson et al., 2006). Die Zugabe von 2,5 mM (0,06 %) Monocaprin als Emulsion in das

Tränkewasser führte zu einer Reduktion der Erregermengen in Wasser- und Schlachtieruntersuchungen bis unter die Nachweisgrenze (Hilmansson et al., 2006). Die Zulage MK-TG in Kombination mit Lipasen ermöglichte bei Absetzferkeln eine signifikante Reduktion der anaeroben Gesamtkeimzahl, Laktobazillen und *E. coli*. in der Digesta von Magen und Duodenum (Dierick et al 2002 b). Die Fütterung von *Cuphea*-Samen (*C. lanceolata* und *C. ignea*) und Lipase bei Absetzferkeln führte zu einer tendenziellen Reduktion der Gesamtkeimzahl koliformer Keime im proximalen Dünndarm bzw. Erhöhung im Magen und distalen Dünndarm. Die Gesamtkeimzahl der Streptokokken wiederum war im gesamten Dünndarm signifikant geringer, jene der Laktobazillen lediglich im distalen Abschnitt des Dünndarms (Dierick et al., 2003). Der simultane Zusatz von gecoateter Buttersäure und Caprylsäure im Futter (3,1 g/kg) abgesetzter Ferkel führte nach der gezielten Infektion mit *Salmonella* Typhimurium ( $7 \times 10^7$  KbE) zu einer geringeren fäkalen Ausscheidung des Erregers bei gleichzeitiger Hemmung der intestinalen Kolonisation (Boyen et al., 2008). In der Studie von Buchheit (2009) über den Einfluss von MKFS in der Fütterung von Absetzferkeln lag im distalen Jejunum die Konzentration koliformer Bakterien in den Versuchsgruppen mit Capryl- und Caprinsäure signifikant über der Kontrollgruppe. Aus der Digesta des Zäkums von Absetzferkeln konnten nach Zusatz von MKFS zum Futter weder für Caprylsäure noch für Caprinsäure antibakteriell wirkende Konzentrationen detektiert werden (Buchheit, 2009).

## **2.8 Fragestellung und Versuchsziel**

Die Zeit nach dem Absetzen stellt für Ferkel eine kritische Phase dar. Die Tiere sind in dieser Zeit zahlreichen Belastungsfaktoren ausgesetzt. Gastrointestinale Erkrankungen in Verbindung mit einer geringeren biologischen Leistung zu Beginn der Aufzuchtphase führen zu gravierenden ökonomischen Verlusten in der Schweinehaltung. Dieses Problem wurde in der Vergangenheit in gewissem Umfang durch den Einsatz von Futterzusatzstoffen mit antibiotischer Wirkung maskiert. Durch das seit 2006 existierende Verbot ergibt sich die Notwendigkeit Alternativen zu entwickeln, um die tiergesundheitsliche und ökonomische Situation in der Ferkelproduktion zu verbessern. Die in der Literaturübersicht aufgeführten Studien zeigen, dass MKFS aufgrund ihrer trophischen und antimikrobiellen Wirkung im vorderen Verdauungstrakt, Effekte auf die Nährstoffverdaulichkeit, die Mikrobiota sowie die intraepithelialen Lymphozyten haben können. *In vivo*-Untersuchungen bei Absetzferkeln sind einerseits aufgrund der anhaltenden Suche nach Alternativen zu antibiotischen Leistungsförderer als auch aufgrund der viel versprechenden Hinweise aus der Literatur sinnvoll und notwendig. Die vorliegende Studie zielte demnach auf die Beantwortung folgender Fragen:

1. Ermöglicht die zusätzliche Supplementierung von kurzkettigen organischen Säuren eine Ansäuerung des vorderen Verdauungstraktes und bedingt diese eine stärkere antibakterielle Wirkung der MKFS bei Absetzferkeln?
2. Beeinflussen MKFS und/oder kurzkettige organische Säuren die Länge der Darmzotten bzw. die Tiefe der Darmkrypten im Dünndarm von Absetzferkeln?
3. Welche modulierenden Effekte besitzen MKFS und/oder kurzkettige organische Säuren auf die Besiedlung des Dünndarms durch intraepithelialer Lymphozyten von Absetzferkeln?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 96 abgesetzte, männliche, kastrierte Ferkel (*EUROC x Piétrain*) (*Schweinehaltung Rödigsdorf GmbH, 99510 Apolda*) eingesetzt. Die Ferkel waren beim Absetzen durchschnittlich  $25 \pm 1$  Tage alt. Der Versuch erfolgte in drei aufeinander folgenden, konsekutiven Versuchsreihen. In jeder Versuchsreihe wurden 32 Ferkel randomisiert auf vier Gruppen verteilt.

#### **3.2 Haltung**

Die Haltung erfolgte am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin, in zwei gleich strukturierten Stallräumen in Flatdeckabteilen. In allen Versuchsgruppen wurden zwei Ferkel in einer Bucht zusammengehalten, diese wurden als eine Versuchseinheit angesehen. Bei jedem Versuchsdurchgang betrug beim Einstellen die Raumtemperatur 28 °C und wurde anschließend stufenweise auf 25 °C abgesenkt. Die Luftfeuchte betrug 65 % und ein Lichtprogramm gewährleistete eine 16stündige Licht- und eine 8stündige Dunkelphase. Den Tieren stand zu jeder Zeit frisches Wasser über Nippeltränken zur Verfügung. Die Fütterung erfolgte generell in den ersten drei Wochen *ad libitum*. Um die Tiere für die Sektionstage vorzubereiten, wurde in der vierten Woche restriktiv gefüttert, wobei 300 g Futter pro Tier und Mahlzeit vorgelegt wurde (6, 12 und 17 Uhr). Es wurden Plastikbälle als Spielzeug angeboten.

#### **3.3 Versuchsfutter und Fütterung**

Das Futter aller Versuchsgruppen (Tabelle 5 und 6) wurde durch die Firma Vitamex (*Drongen, Belgien*) hergestellt, wobei die Diäten einheitlich aus einer Grundmischung entstammten. Allen Mischungen wurde in der letzten Fütterungsphase über acht Tage außerdem 0,3 % Chromoxid (*Chromium(III)oxide (50 µm, ≥ 98 %)*, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland*) zugesetzt, das als Marker für die Verdaulichkeitsanalyse genutzt wurde. Die Futtermischungen wurden den Ferkeln in trockener und geschroteter Form vorgelegt. Die Kontrollgruppe erhielt ein Ferkelaufzuchtfutter nach Empfehlungen der GfE (2006). Der Versuchsfuttermischung der Gruppe KOS (kurzkettige organische Säuren) wurde 1,05 % eines Produktes bestehend aus Fumar- und Milchsäure zugesetzt. Das Gesamtprodukt enthielt 71 % KOS (56 % Fumarsäure und 44 % Milchsäure) sowie 29 % Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>) als Trägerstoff. Der Versuchsgruppe KOS und MKFS (mittelkettige Fettsäuren) wurde zusätzlich 0,3 % eines Produkts, welches Caprylsäure (C8:0) und Caprinsäure (C10:0) enthielt, beigefügt. Das Gesamtprodukt enthielt je 25 % Capryl- bzw. Caprinsäure und 50 % (SiO<sub>2</sub>). Die Ferkel der Versuchsgruppe MKFS erhielten ebenfalls 0,3 % Capryl- und Caprinsäure, dieser Futtermischung wurde außerdem 0,05 % eines rohfaserhaltigen Produkts zugesetzt, wobei davon ausgegangen wird, dass dieses aufgrund der geringen Konzentration keinen Einfluss auf die erfassten Parameter hat. Die Zulage der einzelnen Futtermittelzusatzstoffe erfolgte im Austausch mit Mais, um die durch die Zulage hervorgerufenen energetischen Unterschiede auszugleichen.

**Tabelle 5:** Übersicht über die verschiedenen Versuchsgruppen und Diäten

<b>Gruppen</b>	<b>Rationen</b>
Kontrollgruppe	Basisdiät für Absetzferkel ohne Zulage
Gruppe MKFS	Basisdiät für Absetzferkel mit 0,3 % mittelkettigen Fettsäuren (MKFS) <sup>1</sup>
Gruppe KOS	Basisdiät für Absetzferkel mit 1,05 % kurzkettigen organischen Säuren (KOS) <sup>2</sup>
Gruppe MKFS+KOS	Basisdiät für Absetzferkel mit 0,3 % MKFS und 1,05 % KOS

<sup>1</sup> Das Produkt enthielt je 25 % Capryl- und Caprinsäure und 50 % Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>);

<sup>2</sup> das Produkt enthielt 71 % organische Säuren (Mischung aus 44 % Milchsäure und 56 % Fumarsäure) und 29 % SiO<sub>2</sub>

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Grundfuttermischung und Futterzusatzstoffe aller Ferkel nach Angaben des Herstellers (*Vitamex, Belgien*)

Inhaltsstoffe	Gruppe			
	Kontrolle	MKFS	KOS	KOS + MKFS
Mais	171,1	167,6	160,6	157,6
Weizen	147,0	147,0	147,0	147,0
Gerste	344,9	344,9	344,9	344,9
Sojaextraktionsschrot	222,5	222,5	222,5	222,5
Kartoffeleiweiß	5,2	5,2	5,2	5,2
Molke	52,7	52,7	52,7	52,7
Sojaöl	14,2	14,2	14,2	14,2
Kalziumkarbonat	10,6	10,6	10,6	10,6
Monokalziumphosphat	5,5	5,5	5,5	5,5
Natriumchlorid	4,7	4,7	4,7	4,7
L-Lysin-HCl	5,5	5,5	5,5	5,5
Methionin	2,2	2,2	2,2	2,2
Threonin	2,4	2,4	2,4	2,4
Tryptophan	0,7	0,7	0,7	0,7
Enzymvormischung <sup>1</sup>	0,6	0,6	0,6	0,6
Mineralstoff- und Vitamin Prämix <sup>2</sup>	10,2	10,2	10,2	10,2
Mittelkettige Fettsäure <sup>3</sup>	-	3,0	-	3,0
Organische Säuren <sup>4</sup>	-	-	10,5	10,5
Rohfaserhaltiges Produkt	-	0,5	-	-

OS = organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure);  
<sup>1</sup>Enzyme je kg Vormischung: 16667 FBG EC 3.2.1.6, 4166667 BGU EC 3.2.1.4., 333333 FXU EC 3.2.1.8., 1250000 FYT EC 3.1.26.; <sup>2</sup>Zusatzstoffe je kg Futtermittel: 120 mg Eisen, 156 mg Kupfer, 98 mg Zink, 78 mg Mangan, 0,34 mg Selen, 0,95 mg Iod, 15014 I.E. Vitamin A, 2022 I.E. Vitamin D, 98 mg Vitamin E, 1,6 mg Vitamin K3, 1,5 mg Vitamin B1, 5,4 mg Vitamin B2, 2,9 mg Vitamin B6, 43 µg Vitamin B12, 18 mg Nikotinsäure, 38 mg Ethoxyquin, 76 mg BHT.; <sup>3</sup>beinhaltet je kg Futter: 0,75 g Capryl (C:8)- und 0,75 g Caprinsäure (C:10); <sup>4</sup>beinhaltet pro kg Futter: 4,16 g Fumarsäure und 3,28 g Milchsäure

### **3.4 Versuchsdurchführung**

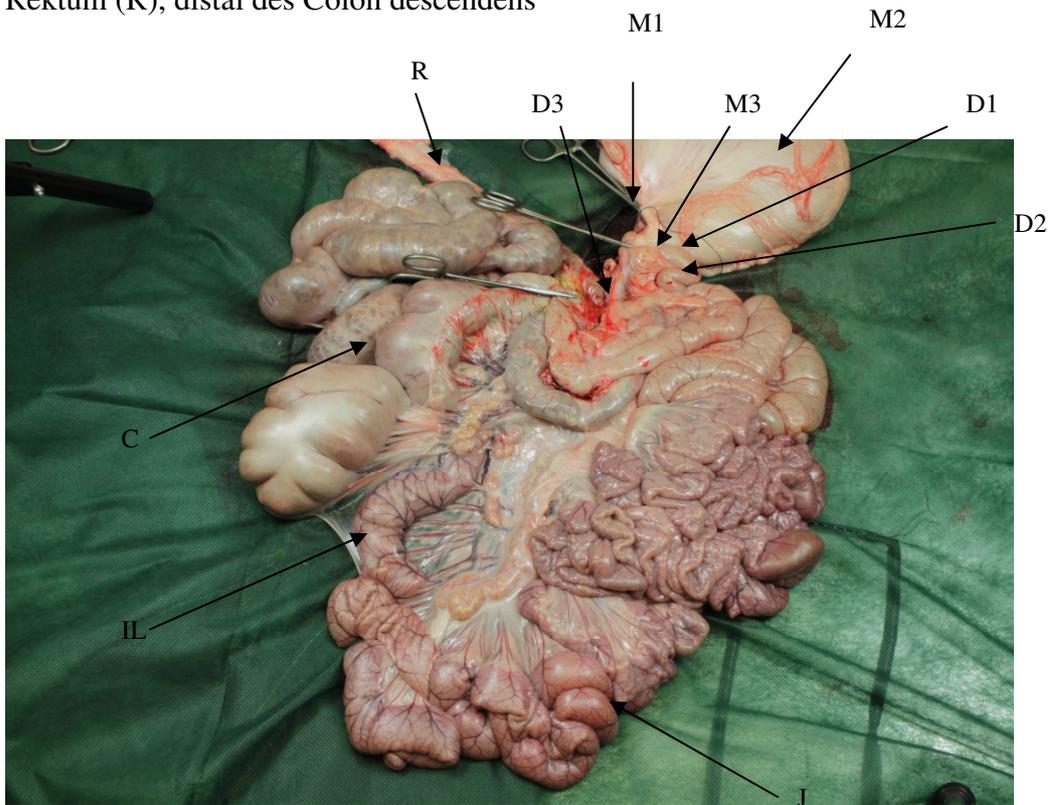
Unmittelbar vor dem Einstellen wurden die Tiere gewogen und randomisiert auf vier Gruppen aufgeteilt. Alle drei Tage erfolgte eine Gesundheitsbewertung anhand eines Bewertungsschemas nach Buchheit (2009) (Anhang, Tab. 43) sowie eine wöchentliche Erhebung der Futteraufnahme und Lebendmasse. Die gesamte Versuchsphase erstreckte sich einheitlich über 28 Tage. Am 28., 29., und 30. Versuchstag eines jeden Versuchsdurchganges wurde je ein Ferkel pro Gruppe randomisiert ausgewählt und euthanasiert (insgesamt neun Tiere pro Gruppe). Vor dem Tag der Probenentnahme erfolgte die letzte Fütterung um 17 Uhr. Die morgendliche Fütterung am jeweiligen Tag wurde so organisiert, dass die Zeitspanne vom Zugang zum Futter bis zur Probengewinnung für jedes Ferkel ca. drei Stunden betrug. Durch diese Vorgehensweise sollte sowohl eine möglichst starke Füllung des Gastrointestinaltrakts, als auch die Vergleichbarkeit der Digestaparameter zwischen den Gruppen und Tieren erreicht werden.

### **3.5 Sektionsgang und Probengewinnung**

Die Ferkel wurden mit Ketaminhydrochlorid (*Ursotamin®*, 10%ig; *Serumwerk Bernburg AG, Deutschland*) und Azaperon (*Stresnil®*, *Jansen-Cilag, Neuss, Deutschland*) intramuskulär (0,2 ml / 0,1 ml pro kg KM) sediert und anschließend durch die intrakardiale Applikation eines Kombinationspräparates bestehend aus Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid und Embutramid (*T61®*, *Intervet, Deutschland*) euthanasiert. Unverzüglich danach wurde der Bauchraum durch einen Schnitt in der Linea alba eröffnet. Für die Erstellung histologischer Schnitte wurden *in situ* zwei ca. 5 cm lange Gewebeproben (ohne Peyersche Platten) aus dem mittleren Jejunum entnommen. Die Darmstücke wurden antimesenterial aufgeschnitten und auf Kork gespannt, vorsichtig mit warmer PBS Lösung gespült, um sie von Digesta zu säubern und mit der Schleimhautoberfläche auf die Fixierungsmedien überführt. Aus benachbarten Abschnitt des mittleren Jejunums (ohne Peyersche Platten) wurde außerdem für die durchflusszytometrischen Analysen ein mind. 20 cm langes Darmstück entnommen. Der Magen sowie das restliche Darmkonvolut wurden anschließend exentriert und für die Entnahme der Digestaprobe vorbereitet. Aus dem Magen wurden aus drei verschiedenen Inzisionsstellen (Cardia-, Fundus- und Pylorusbereich) sowie aus einer homogenisierten Sammelprobe Digesta gewonnen. Sofern genügend Darminhalt vorhanden war, wurde aus dem Duodenum im Bereich der Pars cranialis, Pars descendens und Pars ascendens sowie aus dem mittleren Jejunum, Ileum, Kolon (Colon ascendens) und Rektum Inhalt entnommen. Um eine ausreichende Digestamenge zur Bestimmung der praecaecalen Verdaulichkeit zu gewinnen, wurde der Inhalt des Ileums und distalen Jejunums vereint, sodass insgesamt zwei Meter des distalen Dünndarms für die Verdaulichkeitsanalysen herangezogen wurden. Rektuminhalt zur Auswertung der Gesamtverdaulichkeit wurde jeweils im zweiten und dritten Versuchsdurchgang entnommen. Für die anschließende pH-Wertmessung wurden die Magen- und Darminhalte in 15 ml Plastikgefäße (*Greiner Bio One, Frickhausen, Deutschland*) überführt. Die verbliebene Menge wurde in 50 ml Greinerröhrchen (*Greiner Bio One, Frickhausen, Deutschland*) verbracht und bei -80° C bis zur weiteren Analytik gelagert.

An den folgenden Stellen wurden Gewebe bzw. Digesta entnommen (Abb. 1):

1. Magen Cardia (M1), Magen Fundus (M2), Magen Pylorus (M3)
2. Duodenum pars cranialis (D1), zwischen Pylorus und Flexura duodeni cranialis
3. Duodenum pars descendens (D2), distal der Flexura duodeni cranialis
4. Duodenum pars ascendens (D3), distal der Flexura duodeni caudalis / Pars transversa
5. Jejunum (J), aus der Mitte
6. Ileum (IL), distale Hälfte
7. Colon ascendens (C), unmittelbar distal des Zäkums
8. Rektum (R), distal des Colon descendens



**Abbildung 1:** Entnahmestellen der Gewebe- und Digestaprobe  
(Foto: mit der freundlichen Genehmigung von Jens Ötvös)

### **3.6 Futtermitteluntersuchungen**

Die Roh Nährstoffgehalte der Futtermischungen wurden nach den Standardmethoden der Weender-Analyse entsprechend der Empfehlungen der VDLUFA, Methodenbuch III, analysiert (Naumann und Bassler 2004). Die Futtermittelproben wurden zuvor auf eine Größe von 0,5 mm gemahlen. Alle Futtermittelanalysen erfolgten für jeden Durchgang separat und jeweils anhand einer Doppelbestimmung.

#### **3.6.1 Roh Nährstoffe (Weender Analyse)**

Die für die Bestimmung der Roh Nährstoffe genutzten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

##### Trockensubstanz (TS)

Für die Bestimmung der Trockensubstanz wurden 1 g Futter in einen Porzellantiegel eingewogen, bei 105 °C für vier Stunden im Trockenschrank getrocknet und anschließend in einen Exsikkator zum Abkühlen verbracht. Die Proben wurden erneut gewogen und der TS-Gehalt errechnet, der in Prozent der ursprünglichen Substanz (uS) angegeben wurde.

##### Rohasche (Ra)

Im Anschluss an die TS Bestimmung wurden die Proben für sechs Stunden bei 600° im Muffelofen verascht. Nach Abkühlung im Exsikkator konnte der Rohaschegehalt über die Auswaage ermittelt werden.

##### Rohprotein (Rp)

Nach Einwaage von 400 mg der jeweiligen Futterproben erfolgte die Analyse des Rohproteins über die Messung des Stickstoffgehaltes der Probe nach der Dumas-Verbrennungsmethode mithilfe eines Makro-Elementaranalysators.

##### Rohfett (Rfe)

Die Rohfettanalyse erfolgte nach Naumann und Bassler (2004), wobei jedoch auf den Säureaufschluss verzichtet wurde, da sich daraus keine Unterschiede der Analyse ergeben hatten. Nach Einwaage von ca. 1 g Probenmaterial in spezielle Filterbeutel erfolgte eine Extraktion des Fettes für 3 Stunden mit Petrolether nach Soxhlet, woran sich eine Trocknung bei 103 °C im Trockenschrank für 30 Minuten anschloss, um den Petrolether abzdampfen. Die Menge an Rohfett wurde durch die Gewichtsbestimmung des Probengefäßes mit und ohne Rohfett rechnerisch ermittelt.

##### Rohfaser (Rfa)

Die Bestimmung des Rohfasergehaltes erfolgte mithilfe eines Rohfaseranalysators. Dazu wurden 0,5 g Probenmaterial in spezielle Filterbeutel eingewogen und in 1,25%iger Schwefelsäure (6,96 ml Säure in 1000 ml Aqua dest.) gekocht, nach dem Absaugen der flüssigen Phase wurde 1,25%ige Natronlauge (12,5 g NaOH in 1000 ml Aqua dest.) hinzugefügt und danach mit heißem destilliertem Wasser gespült. Nach der Entnahme aus dem Analysator wurden die Proben bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet, gewogen und dann im Muffelofen bei 500 °C verascht. Der Rohfasergehalt errechnete sich durch Subtraktion des Gewichtes der Rohasche vom Gewicht des getrockneten Inhalts der Filterbeutel.

### **3.6.2 Mineralstoffe und Spurenelemente**

Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

#### Probenvorbereitung

Nach der Veraschung von ca. 1 g Futtermittel über Nacht im Muffelofen wurden die abgekühlten Proben in 6 ml konzentrierter Salzsäure (37-38 %) und 20 ml destilliertem Wasser gelöst. In einem zuvor aufgeheizten Sandbad (210-220 °C) wurden die Proben für 50 min inkubiert und der Inhalt quantitativ über einen Faltenfilter in einen 50 ml-Messkolben überführt. Die Lagerung bis zur vollständigen Analyse erfolgte in 50 ml Polyethylen-Flaschen bei Raumtemperatur.

#### Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink und Eisen

Der Gehalt an Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink und Eisen wurde in der Aschelösung mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt.

#### Phosphor

Für die Bestimmung des Phosphorgehalts im Futter wurden 100 µl der Aschelösung mit 500 µl einer Nitrovanadatmolybdat-Lösung, einem Farbreagenz, bestehend aus Salpetersäure und den P-Komplexbildnern Ammoniummolybdat (Lösung A) und Ammoniummetavanadat (Lösung B) versetzt und anschließend mit Reinstwasser auf 1,5 ml aufgefüllt. Das in der Probe enthaltene Phosphat reagierte in dem salpetersauren Milieu zu einem gelben Farbkomplex, dessen Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen wurde. Anhand einer Kalibrierkurve konnte dann der Phosphorgehalt bestimmt werden.

#### **Herstellung von Nitrovanadatmolybdatreagenz:**

<b>1. Lösung A:</b> Ammoniummolybdat	100	g
Ammoniak (25%ig)	10	ml
Reinstwasser ad	1000	ml
<b>2. Lösung B:</b> Ammoniummetavanadat	2,35	g
Salpetersäure (65%ig)	7	ml
Reinstwasser ad	1000	ml

Unter Rühren wurden langsam 200 ml der Lösung A mit 200 ml der Lösung B versetzt, nochmals 134 ml Salpetersäure (65 %ig) hinzugegeben und mit Reinstwasser auf 1000 ml aufgefüllt.

### **3.6.3 Säurebindungskapazität**

10 g der jeweiligen Futtermischung wurde in 90 ml Aqua dest gelöst, um anschließend die Säurebindungskapazität zu überprüfen. Nach pH-Wertmessung erfolgte die Absenkung des pH-Wertes auf 3,0 durch die Titration mit einer 1 M Salzsäure. Die dazu benötigte Menge (ml) der Salzsäure wurde mit 100 multipliziert und die so errechnete Säurebindungskapazität als Milliequivalente (mEq) pro kg angegeben. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7:** Für die Futteruntersuchungen eingesetzte Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Zentrifugalmühle, Zm 100	Retsch GmbH	Haan, Deutschland
Analysewaage Typ Genius	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Heraeus <sup>®</sup> Trockenschrank T5042	Heraeus electronic	Hanau, Deutschland
Exsikkator Typ Novus NS 24/29	Schott/Duran	Mainz, Deutschland
Muffelofen Heraeus <sup>®</sup> Thermicon <sup>®</sup> P	Thermo Scientific	Karlsruhe, Deutschland
Makro-Elementaranalysator: vario max CN	Elementar Analysesystem GmbH	Hanau, Deutschland
Rohfaser-Analysator: Ankom <sup>2000</sup> Fibre Analyser	Ankom Technology	Macedon, USA
Atomabsorptionsspektrometer: vario 6	Analytik Jena GmbH	Jena, Deutschland
Photometer: Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
XT4 Filter Bags	Ankom Technology	Macedon, USA
F57 Filter Bags	Ankom Technology	Macedon, USA
Petroleumbenzin, reinst	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid ≥99 %	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (98 %) Qualität	J. T. Baker	Griesheim, Deutschland
Salpetersäure (65 %) Qualität	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (37 %) s.o.	J. T. Baker	Griesheim, Deutschland
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat >99 % p.a. krist.	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Ammoniummonovanadat zur Analyse	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland

### **3.6.4 Quantifizierung der Futterzusatzstoffe**

#### **L- und D-Laktat**

Die Bestimmung der Milchsäure erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).

Die Bearbeitung und Messung der Futtermittel- und Digestaprobe erfolgte in gleicher Vorgehensweise. Die für die HPLC eingesetzten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

#### **Probenaufbereitung für die Quantifizierung von D- / L-Laktat**

Da beide Verbindungen wasserlöslich sind, wurde ein wässriger Extrakt der Proben auf einer chiralen Säule isokratisch von Matrixbestandteilen getrennt und quantifiziert. Der stationären Phase wurde zusätzlich eine Vorsäule vorgeschaltet, sie ermöglicht eine Minimierung von Verunreinigungen in der Hauptsäule. Für die Bestimmung der Milchsäure in den Futterproben wurde zuvor 0,5 g Futter in Eppendorfgefäße eingewogen. Eine Lösung aus 2,5 mM Kupfer-II-Sulfat und 2-Propanol (95:5 Verdünnung) diente dabei als Fließmittel für die HPLC. Es wurde jeweils 1 ml einer 0,5 mM Kupfer-II-Sulfatlösung in jede Probe verbracht, gut gemischt und 10 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte zur Proteinfällung die Zugabe von je 50 µl Carrezlösung I und II, nach jedem Zwischenschritt wurde erneut gemischt sowie für 10 Minuten bei 14.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig über eine 2-ml-Injektionsspritze durch einen sterilen Cellulose-Acetatspritzenvorsatzfilter in neue Eppendorfgefäße überführt und mittels 0,5 mM Kupfer-II-Sulfatlösung verdünnt.

**Herstellung der Probenextraktverdünnungen mit 0,5 mM Kupfer-II-Sulfat-Lösung:**

Magen

1:10 Verdünnung: 100 µl Probe und 900 µl Kupfer-II-Sulfat-Lösung

Dünndarm

1:5 Verdünnung: 200 µl Probe und 800 µl Kupfer-II-Sulfat-Lösung

Dickdarm

1:2,5 Verdünnung: 400 µl Probe und 600 µl Kupfer-II-Sulfat-Lösung

Zur Durchführung einer quantitativen Analyse erfolgten zuvor die Erstellung der Eluenten und der Kalibrierreihe:

**Herstellung der Eluenten:**

- 1) 2,5 mM Kupfer-II-Sulfat-Lösung mit 2-Propanol:

Kupfer-II-Sulfat	399,02	mg
2- Propanol	50	ml
Reinstwasser ad	1000	ml
- 2) 0,5 mM Kupfer- II-Sulfat-Lösung:

Kupfer-II-Sulfat	79,80	mg
Reinstwasser ad	1000	ml

**Herstellung der Kalibrierreihe mit 0,5 mM Kupfer-II-Sulfatlösung:**

- 1) Stammlösung 10 mM

D- und L-Laktat	49,9	mg
Kupfer-II-Sulfatlösung	25	ml
- 2) 1 mM Lösung

Stammlösung	100	µl
0,5 mM Kupfer-II-Sulfatlösung	900	µl
- 3) 0,1 mM Lösung

1 mM Lösung	100	µl
0,5 mM Kupfer-II-Sulfatlösung	900	µl

**Herstellung weiterer Lösungen:**

- 1) Carrez I:

Zinkchlorid	17	g
Reinstwasser	100	ml
- 2) Carrez II:

Kaliumhexacyanoferrat (II)	15	g
Reinstwasser	100	ml

**Tabelle 8:** Für die Laktatbestimmung genutzte Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
HPLC, Agilent 1100	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Chromeleon Software, Version 6.80	Dionex GmbH	Idstein, Deutschland
Phenomenex Chirex 3126 (D)- penicillamine 150 x 4,6 mm (Hauptsäule)	Phenomenex	Torrance CA, USA
Phenomenex C18 4.0 L mm x 2,0 ID mm (Vorsäule)	Phenomenex	Torrance CA, USA
Zentrifuge: Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Rüttler: Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG,	Schwabach, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries	West Palm Beach, USA
Injektionsspritzen, 2 ml	Terumo	Eschborn, Deutschland
Celulose-Acetat- Spritzenvorsatzfilter, 0,45µm	VWR International	Darmstadt, Deutschland
Probengefäße mit Glaseinsatz, Screw cap vials, clear (Part No. 5182-0714)	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Kupfer-II-Sulfat (wasserfrei)	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Technipur Zinkchlorid	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat-II-Trihydrat	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Reinstwasser	Millipore Company	Massachusetts, USA

### Fumarsäure

Die Bestimmung von Fumarsäure erfolgte durch ein akkreditiertes Labor mittels HPLC (LUFÄ, Münster, Deutschland).

### Mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure)

Die Gaschromatographie (GC) ermöglicht die Auftrennung leicht flüchtiger Komponenten, die gasförmig oder unzersetzt verdampfbar sind.

Die Bearbeitung und Messung der Futtermittel- und Digestaprobe erfolgte in gleicher Vorgehensweise und wird nur an dieser Stelle ausführlich beschrieben. Die für die Gaschromatographie eingesetzten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

### Probenaufbereitung für die Quantifizierung von Capryl- und Caprinsäure

100 mg der jeweiligen Futtermischung wurden in 2 ml Eppendorfgefäße eingewogen. Für die gaschromatographische Bestimmung wurde Tridecansäure (C:13) als interner Standard verwendet, C:8 (Caprylsäure) und C:10 (Caprinsäure) wurden zur Kalibrierung bei der Messung herangezogen.

30 mg des internen Standards wurde in eine 10 ml Hexan-Isopropanol-Lösung verbracht. Die Proben wurden wie folgt behandelt:

Zu jeder Probe wurden 150 µl des internen Standards und 150 µl einer 0,5 M Salzsäure pipettiert und anschließend in 1,5 ml einer Hexan- Isopropanol-Lösung (3:2) aufgenommen. Um eine gute Durchmischung zu erreichen, wurden die Proben ausreichend geschüttelt sowie anschließend für 30 min auf einem Rüttler inkubiert und für ca. 1 min in ein Ultraschallbad überführt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 5 min und 14.000 xg zentrifugiert. Zur Methylierung der freien Fettsäuren wurden 100 µl des Überstandes mit 50 µl n-Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) in GC-Probengefäße mit Glaseinsatz zur Analyse überführt und, um eine optimale Vermischung zu erreichen, kurz gemischt. Jeweils 150 µl der

Kontrollen C:8 (Caprylsäure) und C:10 (Caprinsäure) wurden gleich den zu untersuchenden Proben behandelt und zur Aufrechterhaltung des Mischungsverhältnisses in 1,35 ml eines Hexan-Isopropanol-Gemisches gelöst. Die chromatographische Trennung der mittelkettigen Capryl- und Caprinsäure wurde mit der Polyethylenglykol-Kapillarsäule HP-INNOWax (Länge: 30 m; Durchmesser: 530 µm) durchgeführt.

**Herstellung einer (3:2) Hexan-Isopropanol-Lösung:**

Hexan	300	ml
2-Propanol	200	ml

**Herstellung des internen Standards:**

C:13	30	mg
Hexan-Isopropanol (3:2)	10	ml

Am Gaschromatographen wurden folgende Parameter eingestellt:

1. Injektortemperaturprogramm: 150 °C; 0,02 min  
250 °C; 2,5 min
2. Ofenprogramm: 80 °C (Initialtemperatur); 0,5 min  
100 °C; 1 min  
190 °C; 4 min
3. Analysezeit: 10,25 min
4. Splitverhältnis: 1:1

**Tabelle 9:** Für die Gaschromatographie genutzten Geräte und Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Staat</b>
Gaschromatograph Modell 6890N	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Agilent Chemstation Software	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Zentrifuge: Zentrifuge 5415 C	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Rüttler Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG,	Schwabach, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries	West Palm Beach, USA
Ultraschallbad Senorex Super nRk 106	Bandelin electronic GmbH&Co.KG	Berlin, Deutschland
Probengefäße mit Glaseinsatz, Screw cap vials, clear (Part No. 5182-0714)	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Glasliner, Agilent 5183-2037	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Septen Agilent 5183-4761	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Säule HP-INNOWax	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Tridecanoic acid, ≥ 98%	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Hexansäure, ≥ 99%	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Oxalsäure-Dihydrat	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
n-Hexan	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
n-Trimethylsulfoniumhydroxid	Macherey- Nagel GmbH&Co.KG	Düren, Deutschland

### **3.7 Erhebung zootechnischer Parameter**

#### Beurteilung des Gesundheitszustandes

Der Gesundheitszustand der einzelnen Ferkel wurde an jedem dritten Versuchstag anhand eines Bewertungssystems (Anhang, Tab. 43) nach Buchheit (2009) überprüft.

#### Futteraufnahme und Futteraufwand

Die Ermittlung der Futteraufnahme pro Bucht erfolgte durch die Futtereinwaage und die Rückwaage des verbliebenen Futters einmal pro Woche (*DE Plattformwaage SL12.000, Bizerba GmbH & Co .KG, Balingen, Deutschland*). Die Erhebung des Futteraufwandes erfolgte rechnerisch. Die Summe der Futteraufnahme sowie die der Lebendmassezunahme wurden dabei in der Kalkulation für jede Bucht zu je zwei Tieren berücksichtigt.

$$\text{Futteraufwand} = \frac{\text{Futteraufnahme [kg]}}{\text{Lebendmassezunahme [kg]}}$$

#### Lebendmasseentwicklung und Lebendmassezunahme

Jedes Ferkel wurde beim Einstellen, während der Versuchszeit einmal pro Woche und am Tag der Probenentnahme gewogen (*DE Plattformwaage 60E300K200XL, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland*). Die Lebendmassezunahme wurde rechnerisch mithilfe der Lebendmassedaten ermittelt.

### **3.8 Verdauungsphysiologische Parameter**

#### **3.8.1 pH-Wert der Digesta**

Von den Darminhalten der Lokalisationen M1, M2, M3, D1, D2, D3, Jejunum, Ileum und Kolon wurde eine ausreichende Menge in ein 15-ml-Gefäß überführt. Der pH-Wert wurde mit einer pH-Einstich-Elektrode gemessen, nachdem eine 2-Punktkalibrierung mit Standardlösungen pH 4 und pH 7 durchgeführt worden war. Da aus dem Abschnitten D1, D2 und D3 einiger Tiere nicht ausreichend Digesta gewonnen werden konnte, war eine pH-Wert-Messung in dieser Lokalisation nicht für alle Tiere möglich. Für die pH-Wertmessung genutzte Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 10 aufgelistet.

#### **3.8.2 Trockensubstanz der Digesta**

Die zur Bestimmung der Trockensubstanz genutzten Geräte sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Digesta der Lokalisationen Magen, Jejunum, Ileum, Kolon und Rektum wurde in zuvor abgewogene 50-ml-Gefäße eingewogen und bei -80 °C eingefroren. Danach wurden die Proben mithilfe der Vakuumgefrieretrocknung für 2 Tage getrocknet. Die Gefäße mit der gefriergetrockneten Digesta wurden erneut gewogen. Nach Abzug der Leergewichte der Gefäße wurde anhand folgender Formel der prozentuale Trockensubstanzgehalt berechnet:

$$\% \text{ TS} = \left( \frac{\text{Gefriergetrocknete Auswaage}}{\text{Frische Einwaage}} \right) \times 100$$

### **3.8.3 Praecaecale und Gesamtverdaulichkeit der Nährstoffe**

Geräte und Chemikalien, die für die Bestimmung der praecaecalen und Gesamtverdaulichkeit genutzt wurden, sind in Tabelle 10 aufgelistet. Für die Messung des Chromgehalts in der Digesta wurde zuvor eine homogenisierte Sammelprobe aus dem distalen Jejunum und Ileum (praecaecale Verdaulichkeit) bzw. aus dem Rektuminhalt (Gesamtverdaulichkeit) erstellt und über 2 Tage gefriergetrocknet. Im Anschluss wurden die Proben auf eine Größe von 0,5 mm gemahlen und ca. 0,5 g der Digesta in Tiegeln eingewogen und im Muffelofen über Nacht verascht. Am Folgetag wurden 4 ml Kaliumbromatlösung (w = 4,5 %) und 3 ml Mangansulfatlösung (w = 0,3 %) zugefügt und bis zum Erreichen einer Suspension leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Proben für 50 Minuten bei 210-220 °C im Sandbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben quantitativ durch einen Faltenfilter in einen 50-ml-Messkolben überführt, in die zuvor je 6,25 ml einer 1,47%igen Kalziumchloridlösung vorgelegt worden waren und anschließend mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt wurden. Aus den so aufbereiteten Proben wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie die Menge an enthaltenem Chrom ermittelt.

#### Berechnung der Verdaulichkeiten

Die praecaecale und Gesamtverdaulichkeit wurde für Rohprotein, Rohfett und die Trockensubstanz erhoben. Die Inhaltsstoffe von Digesta und Futter wurden mit den Chromgehalten dieser Poolprobe und des Futters über folgende Formel in Beziehung gesetzt:

$$\text{Verdaulichkeit [\%]} = 100 - \frac{\text{Chromgehalt}_{\text{Futter}} [\text{g/kg}]}{\text{Chromgehalt}_{\text{Digesta}} [\text{g/kg}]} \times \frac{\text{Nährstoff}_{\text{Digesta}} [\text{g/kg}]}{\text{Nährstoff}_{\text{Futter}} [\text{g/kg}]} \times 100$$

#### **Herstellung der verwendeten Lösungen:**

##### **Kaliumbromatlösung (4,5 %):**

KBrO <sub>4</sub>	4,5	g
Aqua dest. ad	100	ml

##### **Mangansulfatlösung (0,3 %):**

MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10	g
Aqua dest. ad	100	ml

Abschließend wurden drei ml dieser Lösung bis zum Erreichen der finalen Konzentration (0,3 %) mit Phosphorsäure (85 %) auf 100 ml aufgefüllt.

##### **Kalziumchloridlösung (1,47 %):**

CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	14,67	g
Aqua dest. ad	1000	ml

**Tabelle 10:** Für die Messung des pH-Werts, der Trockensubstanz, der praecaecalen und Gesamtverdaulichkeit genutzte Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Analysewaage Typ Genius InLab®410pH-	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Kombinationselektrode	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Mahlmaschine, Zm 100	Retsch GmbH	Haan, Deutschland
Vakuum-Gefriertrockner: Alpha 1-4	Christ GmbH	Osterode am Harz, Deutschland
Muffelofen Heraeus®Thermicon®P	Thermo Scientific	Karlsruhe, Deutschland
Atomabsorptionsspektrometer vario 6	Analytik Jena GmbH	Jena, Deutschland
Greiner Röhrchen	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Gefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Faltenfilter, 595 ø 125mm	Whatmann GmbH	Dassel, Deutschland
Messkolben (50 ml)	EM Techcolor	Eberstadt, Deutschland
pH-Pufferlösung pH 7	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
pH-Pufferlösung pH 4	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Kaliumbromat zur Analyse		
EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kalziumchloriddihydrat, reinst	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Mangansulfatmonohydrat	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland

### **3.9 Bestimmung der mittelkettigen Fettsäuren in der Digesta**

Für die GC-Bestimmung der MKFS wurde zuvor 100 mg der Digestaprobe aus dem Magen (homogenisierte Sammelprobe), Duodenum (sofern genügend Inhalt vorhanden war, erfolgte die Analyse aus allen drei entnommenen Abschnitten) sowie aus dem mittleren Jejunum in 2 ml fassende Eppendorfgefäße eingewogen. Eine ausführliche Beschreibung der MKFS Bestimmung erfolgte bereits bei der Erhebung der bei der Futtermitteluntersuchung unter Punkt 3.6.4 die verwendeten Geräte und Chemikalien sind ebenfalls in Tabelle 9 (3.6.4) zu finden.

### **3.10 Mikrobiologische Parameter**

#### **3.10.1 Quantifizierung der Laktobazillen und Enterobakterien mittels qPCR**

Die quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qPCR) ermöglicht die durch spezifische Primer festgelegte Vervielfältigung bestimmter Nukleotidsequenzen und darüber hinaus die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Dies erfolgt durch mittels Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes, dessen Fluoreszenz sich bei der Bildung des PCR-Produktes entfaltet. Dadurch kann in jedem PCR-Zyklus auf die Menge des PCR-Produktes zurückgeschlossen werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Aus den Fluoreszenzmessungen der gesamten PCR ergibt sich eine sigmoidale Amplifikationskurve. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten qPCRs wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green eingesetzt. Bei SYBR® Green handelt es sich um einen DNA-Farbstoff, der nach der Bindung an doppelsträngige DNA fluoresziert. Alle für die DNA-Aufbereitung und Durchführung der qPCR verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 13 aufgelistet.

#### **Herstellung der DNA-Extrakte**

Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers mithilfe des QIAamp DNA stool sample extraction Kits (QIAGEN Sample & Assay Technologies, Hilden,

*Deutschland*), mit Ausnahme des Lyseschritts, der bei 90 °C durchgeführt wurde. Dazu wurden 200 mg Probenmaterial aus dem Magen, Jejunum, Ileum und Kolon in 2 ml Eppendorfgefäße eingewogen und aufgearbeitet. Die DNA-Menge nach diesem Protokoll entspricht der DNA aus 200 mg eingesetzter Probenmenge.

#### Bestimmung der DNA-Konzentration

Der DNA-Gehalt der extrahierten Proben wurde mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green und einem Real-Time-PCR-Gerät mit dazugehöriger PCR-Software von Stratagene bestimmt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mit RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt und einem DNA-Master-Mix zugegeben. Als Kalibrierreihe diente Kalbsthymus in einer Konzentration von 150 bis 5 pg/µl. Für jede Messung wurde eine neue Kalibrierreihe pipettiert und mithilfe des Realtime PCR-Programms von Stratagene konnte der Gehalt der bakteriellen DNA über die Standardreihe ermittelt werden.

#### **Herstellung der SYBR® Green-Gebrauchslösung (1:10):**

SYBR® Green 10.000 x	20	µl
RNase-freies Wasser	180	µl

#### **Herstellung des 2 fach DNA-Master-Mix (192 Ansätze):**

10 x TEN-Puffer	500	µl
ROX-Referenzfarbstoff	4	µl
SYBR® Green (1:10)	4	µl
RNase-freies Wasser	4495	µl

#### Durchführung der quantitativen Echtzeit PCR

Die qPCR wurde ebenfalls mit einem Real-Time-PCR-Gerät von Stratagene und dem dazugehörigen PCR-Programm ausgeführt. Für die quantitative Bestimmung von Enterobakterien und Laktobazillen aus DNA-Extrakten der Digesta des Magens, Jejunums, Ileums und Kolons wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Primerpaare genutzt. Aus den DNA-Extrakten wurde je 1 µl mit 24µl Master Mix in ein PCR-Gefäß pipettiert. Der Master Mix wurde nach Angaben des Herstellers (*Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland*) vorbereitet.

**Tabelle 11:** Für die qPCR genutzte Primer

Detektierte Bakteriengruppen	Primer	Produktgröße	Zielgen	Primersequenz (5' → 3')	Referenz
Laktobazillen	Lac1-F	340 bp	16s rDNA	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A	Rinttila <i>et al.</i> (2004)
	Lac2-R			CAC CGC TAC ACA TGG AG	
Enterobakterien	Entero-F	340 bp	16s rDNA	GTT AAT ACC TTT GCT CAT	Malinen <i>et al.</i> (2003)
	Entero-R			TGA ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT	

Die qPCR-Analysen von Enterobakterien und Laktobazillen wurden unter den in Tabelle 12 beschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Als Quantifizierungsstandards wurden DNA-Extrakte aus sterilem Sauenkot genutzt, die mit Referenzstämmen inokuliert waren

(Vahjen et al., 2007) (siehe Anhang, Tab. 45 und 46). Eine Schmelzkurvenanalyse erfolgte am Ende der qPCR, um unspezifische PCR-Produkte oder Bildung von Primer-Dimeren zu detektieren. Die Temperatur des Reaktionsgemisches wurde dazu schrittweise (0,2 °C) von 55 °C auf 95 °C erhöht, nach jeder Erhöhung wurde die Fluoreszenz gemessen. Wird die spezifische Schmelztemperatur eines PCR-Produktes erreicht, denaturiert die doppelsträngige DNA und ein messbarer Abfall der Fluoreszenz wird sichtbar, da durch diesen Vorgang das SYBR® Green freigesetzt wird.

**Tabelle 12:** Reaktionsbedingungen und PCR-Parameter

Aktivierung	1x	95 °C/15 min
Amplifizierungszyklus	40x	
Denaturierung		95 °C/15 sec.
Binden der Primermoleküle		55 °C/60 sec
Elongation der DNA-Fragmente		72 °C/60 sec
Schmelzkurvenanalytik		+

### Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem PCR-Programm von Stratagene. Hierzu wurde der  $C_T$  (cycle threshold)–Wert genutzt. Der  $C_T$ -Wert entspricht dem Zeitpunkt, bei dem die Fluoreszenz der gebildeten PCR-Produkte erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Dieser Zeitpunkt korreliert direkt mit der Anfangskonzentration der Ziel-DNA in der Probe, da zwischen dem  $C_T$ -Wert und dem Logarithmus der eingesetzten Menge eine lineare umgekehrt proportionale Beziehung besteht. Die  $C_T$ -Werte der zu untersuchenden Proben wurden mit denen der eingesetzten Quantifizierungsstandards verglichen, aus deren  $C_T$ -Werten die Software zuvor eine Standardkurve gebildet hatte. Für jede unbekannte Probe konnte somit der Logarithmus der Zellzahl bestimmt werden. Die Ergebnisse aus der Schmelzkurvenanalyse wurden mit denen verglichen, die zuvor für Laktobazillen und Enterobakterien am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin etabliert worden waren (Klär, 2008). Ergebnisse, die eine Abweichung des Schmelzpunktes von mehr als  $\pm 0,5$  °C aufzeigten, wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

**Tabelle 13:** Für die DNA-Aufbereitung und für die Durchführung der qPCR verwendeten Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Real time QPCR System Mx3000P®, Stratagene	Agilent Technologies	Böblingen, Deutschland
Software MxPro QPCR, Stratagene	Agilent Technologies	Böblingen, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5430	Eppendorf Deutschland	Wesseling-Berzdorf., Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries	West Palm Beach, USA
Eppendorfgefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Real Time-PCR-Gefäße	Agilent Technologies	Böblingen, Deutschland
QIAamp® DNA Stool Mini Kit (50)	QIAGEN Sample & Assay Technologies	Hilden, Deutschland
10 x TEN, Assay Buffer	BIO-RAD	München, Deutschland
Calf Thymus DNA	BIO-RAD	München, Deutschland
Ethanol reinst ( $\leq 99\%$ )	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Stratagene Brilliant II SybrGreen 2x with Rox	Agilent Technologies	Böblingen, Deutschland
Speziesspezifische Oligonukleotide	MWG-Biotech AG	Ebersberg, Deutschland

### **3.10.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren**

Die Multiplex PCR (MPCR) ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Zielsequenzen in einem DNA Gemisch. Die PCR-Reaktionsprodukte werden folglich aus mehreren Primerpaaren gebildet, so dass sich die Optimierung einer solchen PCR recht schwierig gestaltet. Nach erfolgreicher Etablierung einzelner Versuchsschritte ermöglicht die Multiplex PCR, mit wenigen Einschränkungen in der Spezifität jedoch eine schnelle und sensitive Screening-Methode zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener bakterieller Faktoren. Die MPCR zum Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren wurde von Göbel (2003) im Institut für Tierernährung, der Freien Universität Berlin validiert. Sie diente in dieser Arbeit als methodische Grundlage für den qualitativen Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren im Kolon und wird im Folgenden nur in den Grundzügen beschrieben. Die genutzten Primer (Tab. 16) wurden bereits von Bosworth und Casey (1997) beschrieben. Die Produktlängen differieren, um den Nachweis mittels der Agarosegelelektrophorese zu ermöglichen. Die Synthese der Primer wurde von der Firma MWG-Biotech AG (*Ebersberg, Deutschland*) durchgeführt. Die verwendeten *E. coli*-Referenzstämme finden sich im Anhang. Die für die MPCR verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

#### **Probenaufarbeitung und Auswertung**

Anhand von DNA-Extrakten aus der Digesta des Kolons erfolgte die Differenzierung verschiedener Pathogenitätsfaktoren. Die Aufbereitung der DNA wurde bereits unter Punkt 3.10.1 beschrieben. Die Amplifizierung der Gensequenzen wurde mithilfe einer „touchdown“-PCR unter den in Tabelle 14 aufgezeigten Bedingungen durchgeführt, dazu wurden je 1 µl Ziel-DNA und 29 µl Master Mix in ein PCR-Gefäß pipettiert. Die Herstellung des MPCR-Mastermix erfolgte nach Angaben des Herstellers (*QIAGEN Sample & Assay Technologies, Hilden, Deutschland*). Zur Darstellung der in der PCR gebildeten Amplifikate wurden die PCR-Produkte in einer Agarosegelelektrophorese differenziert. Zur Herstellung eines 2,5 % Agarosegels wurde Agarose (2,5 g) in 100 ml 1 x TAE Puffer angesetzt und durch zweimaliges kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Die Agaroselösung wurde mit 10 µl SYBR® Green (Verdünnung 1:10000) versetzt und in einem Geleinsatz ausgegossen. Nach dem Erkalten wurde das Agarosegel in eine horizontale 2,5 l Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 x TAE Puffer überschichtet. Die PCR-Produkte (1µl) wurden mit 8 µl RNase-freiem Wasser und 2 µl Ladepuffer gemischt. Die Proben wurden gemeinsam mit einem DNA-Standard (100 bp Leiter) bei 120 V sowie 40 mA für 2,5 h einer Elektrophorese unterzogen. Die Auswertung der Gele erfolgte mittels UV-Licht mit einer digitalen CCD (charge coupled density camera)-Kamera.

#### **Quantifizierung der Pathogenitätsfaktoren**

Anhand der Beurteilung des Gels wurden die vier am häufigsten vorkommenden Pathogenitätsfaktoren ausgewählt und via qPCR aus der Digesta des Kolons bzw. aus der Digesta des Magens und Ileums quantifiziert. Diese Methode wurde bereits unter Punkt 3.10.1 beschrieben. Die Reaktionsbedingungen wurden ebenfalls bereits in Tabelle 12 (3.10.1) erfasst. Die im Kolon sowie zusätzlich im Magen und Ileum quantifizierten Pathogenitätsfaktoren wurden in Tabelle 16 markiert.

**Tabelle 14:** PCR-Programm für die *E. coli*-MPCR („touchdown PCR“)

1x	95 °C/900 sec
10x	94 °C/30 sec
	60 °C/90 sec. (-0,5 °C / cycle)
	72 °C/90 sec
30x	94 °C/30 sec
	55 °C/90 sec
	72 °C/90 sec
1x	72 °C/600 sec
1x	4 °C

**Herstellung der Lösungen für die MPCR:**

**50x TAE**

Trizma base	242	g
Reinstwasser	600	ml
57,1 ml Eisessig	57,1	ml
0,5 M EDTA (pH 8)	100	ml
Reinstwasser ad	1000	ml

**1x TAE**

50 x TAE	100	ml
Reinstwasser ad	5000	ml

**Tabelle 15:** Für die MPCR genutzten Geräte und Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Staat</b>
PCR Cycler T1	Biometra	Göttingen, Deutschland
Agarosegelelektrophorese	Biometra	Göttingen, Deutschland
CCD-Kamera (charge coupled density camera)	Raytest	Straubenhardt, Deutschland
Eppendorfgefäße, steril	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
8 er strips für Biometra Cycler (PCR-Reaktionsgefäße)	Biometra	Göttingen, Deutschland
MetaPhor Agarose (Auflösung 50-1500bp)	Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Multiplex PCR Mastermix	QIAGEN Sample & Assay Technologies	Hilden, Deutschland
Trizma base	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Essigsäure (≤99%)	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure) >99 % p.a. ACS	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Reinstwasser	Millipore Company	Massachusetts, USA

**Tabelle 16:** Für die MPCR verwendeten Primerpaare zum Nachweis von *E. coli* Pathogenitätsfaktoren (Bosworth und Casey, 1997)

Gene der Pathogenitätsfaktoren	Produktgröße	Primer Name	Primersequenz (5' → 3')
<u>est- Ib</u>	158	StaP1	CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT
		StaP2	TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG
<u>est- II<sup>1,2</sup></u>	113	STb1	TGC CTA TGC ATC TAC ACA AT
		STb2	CTC CAG CAG TAC CAT CTC TA
<u>Fan</u>	230	K991	AAT ACT TGT TCA GGG AGA AA
		K992	AAC TTT GTG GTT AAC TTC CT
<u>Elt- Ia</u>	272	LT1	GGC GTT ACT ATC CTC TCT AT
		LT2	TGG TCT CGG TCA GAT ATG T
<u>fedA<sup>1,2</sup></u>	313	F181	TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA
		F182	ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG
<u>Fas<sup>1</sup></u>	409	987P1	AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC
		987P2	GTA ACT CCA CCG TTTGTA TC
<u>Fae</u>	499	K881	GTT GGT ACA GGT CTT AAT GG
		K882	GAA TCT GTC CGA GAA TAT CA
<u>Fimf41a</u>	612	F411	AGT ATC TGG TTC AGT GAT GG
		F412	CCA CTA TAA GAG GTT GAA GC
<u>Stx2e<sup>1</sup></u>	733	SLT1	AAT AGT ATA CGG ACA GCG AT
		SLT2	TCT GAC ATT CTG GTT GAC TC

<sup>1</sup>quantifiziert im Kolon

<sup>2</sup>quantifiziert im Magen, Ileum und Kolon

### **3.10.3 Bakterielle Metaboliten**

#### **Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren**

Die Gehalte der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren wurden aus der Digesta des Magens, mittleren Jejunums, Ileums und Kolons mithilfe der Gaschromatographie bestimmt. Nach dem Auftauen wurden 300 mg Digestamaterial eingewogen und in 1 ml Verdünnungslösung aufgenommen, die 0,5 mM Capronsäure (C:6) als internen Standard enthielt. Die Proben wurden kurz vermischt, für 1 Stunde auf einen Rüttler verbracht und anschließend bei 16000 xg für 8 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Stellte sich der Überstand nach dem Zentrifugationsschritt nicht klar dar, erfolgte eine zusätzliche Zentrifugation für 5 min bei gleicher Umdrehungsgeschwindigkeit. Als externer Standard wurde eine Mischung kurzkettiger Fettsäuren (*SULPECO 4-6975 „Volatile Acids Standard Mix“, Bellefonte, USA*) verwendet. Von den Digestaprobe des Magens wurden 500 µl des Überstandes mit 500 µl der Verdünnungslösung versetzt. Aus den Jejunum- und Ileumproben wurden je 400 µl des Überstandes mit 800 µl Verdünnungslösung und 100 µl der Kolonüberstände wurden mit 1000 µl Verdünnungsmedium versetzt. Alle Proben wurden erneut gut vermischt und mit einer Polyethylenglykol-Kapillarsäule HP-INNOWax (Länge: 30 m; Durchmesser: 530 µm) gaschromatographisch getrennt.

Am Gaschromatographen wurden folgende Parameter eingestellt:

1. Injektortemperaturprogramm: 100 °C; 0,02 min  
150 °C; 0,5 min  
250 °C, 2,00 min  
90 °C
2. Ofenprogramm: 70 °C (Initialtemperatur); 0,5 min  
140 °C; 1 min  
190 °C; 3 min
3. Analysezeit: 9,59 min
4. Splitverhältnis: 1:1

Der Gehalt der Fettsäuren wurde durch Integrierung (Flächenintegration) ermittelt. Um Ergebnisse, die unterhalb der Nachweisgrenze statistisch auswerten zu können, wurde der mittlere Wert zwischen Null und der Nachweisgrenze der jeweiligen Fettsäure gewählt. Die für die Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren verwendeten Chemikalien und Geräte befinden sich unter Punkt 3.6.4 (Tab. 9). Die spezifisch für die Analyse der kurzkettigen Fettsäuren genutzten Chemikalien sind an dieser Stelle gesondert aufgeführt.

#### **Herstellung verwendeter Lösungen:**

**Standardlösung (0,5 mM) kurzkettiger Fettsäuren** (*SULPECO 4-6975 „Volatile Acids Standard Mix“*)

SUPELCO Stammlösung (10 mM)	50	µl
Oxalsäure-Dihydrat	10	mg
Reinstwasser	950	µl

#### **Verdünnungslösung für Proben:**

Herstellung einer Stammlösung (10 mM):

Hexansäure	250	µl
Oxalsäure-Dihydrat	2	g
Reinstwasser ad	200	ml

**Herstellung der Verdünnungslösung (0,5 mM):**

Stammlösung	50	ml
Natriumazid ( $\geq 99\%$ p.a., Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)	2,5	g
Reinstwasser ad	1000	ml

**Bestimmung von D- und L-Laktat**

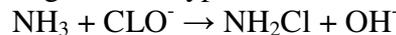
Die Methode wurde bereits unter Punkt (3.6.4) aufgeführt. Die verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 8 (Punkt 3.6.4) aufgelistet. Um Ergebnisse die unterhalb der Nachweisgrenze statistisch auswerten zu können, wurde der mittlere Wert zwischen Null und der Nachweisgrenze für L- bzw. von D-Laktat gewählt.

**Bestimmung von Ammonium**

Die Untersuchung der Ammoniumkonzentrationen erfolgte aus dem Magen, Jejunum, Ileum sowie Kolon mit einer im Institut etablierten Methode in Mikrotiterplatten, basierend auf der Berthelot-Reaktion. In Tabelle 17 sind die Geräte und Chemikalien für die Ammonium- bzw. Ammoniakbestimmung aufgelistet.

Prinzip der Berthelot-Reaktion:

Das Verhältnis von Ammonium und Ammoniak wird durch den vorliegenden pH-Wert bestimmt. Ab pH 7 überwiegt der Gehalt an Ammonium, so dass die Reaktion in einem alkalischen Bereich (pH-13) stattfindet, wodurch sich das Gleichgewicht zugunsten des Ammoniaks verschiebt. Dieses reagiert mit Hypochlorit zu Monochloramin:



Das Monochloramin wiederum reagiert mit Thymol über N-Chlor-2-isopropyl-5-methylchinon-monoamin zum entsprechenden Indophenol. Im alkalischen Medium liegt das entstandene Indophenolmolekül in blauer Form vor, dessen Konzentration über die Extinktion photometrisch bestimmt werden kann.

Probenaufbereitung:

Die zuvor auf 500 mg eingewogenen und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagerten Proben wurden für 15 min bei Raumtemperatur aufgetaut und in 1 ml kalter 100 mM MOPS (3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure)-Lösung aufgenommen, 1 min gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 17000 xg für 10 min bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  wurde der Überstand in neue 2 ml Eppendorfgläser überführt.

Bestimmung der Extinktion:

Die Messung erfolgte in Mikrotiterplatten anhand einer Doppelbestimmung und mit einer täglich frisch angesetzten Standardreihe. Zuvor erfolgte die Validierung der optimalen Verdünnungsstufe für alle Darmabschnitte. Die Proben aus dem Magen, Jejunum und Ileum wurden mit einem Verdünnungsfaktor von 15, die Digestaprobe aus dem Kolon wurden mit einem Verdünnungsfaktor von 25 gemessen. Nach Vorlage von 20  $\mu\text{l}$  der verdünnten Probenüberstände erfolgte die Zugabe von je 100  $\mu\text{l}$  einer gebrauchsfertigen Reagenz-I-(Phenol-Nitroprussidlösung (diese Lösung beinhaltet 5 % Phenol und 0,0255 % Na-Nitropussid) von *Sigma-Aldrich*) und Reagenz-II-Lösung (0,2 % Na-Hypochloritlösung). Nach jedem Zwischenschritt wurde durch ein dreimaliges Auf- und Abpipettieren eine sorgfältige Vermischung gewährleistet. Nach 10 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgte die erste Messung mithilfe eines Mikrotiterplattenlesegeräts, nach einer anschließenden Inkubation von 5 min wurde der Messvorgang wiederholt. Für die

Berechnung des Ammoniumgehaltes im Extrakt wurde zusätzlich der Probenleerwert (20 µl Probe + 200 µl Verdünnungslösung), Reagenzienleerwert (20 µl Verdünnungslösung + je 100 µl Reagenz-I- und II) und der Wert für die Verdünnungslösung (220 µl Verdünnungslösung) bei jeder Messung miterfasst. Die Ammoniumkonzentration im Extrakt wurde anhand einer Kalibriergeraden bestimmt und über den Bezug zur Probeneinwaage konnte der Ammoniumgehalt in der Probe ermittelt werden.

**Herstellung der Lösungen:**

**100 mM MOPS (3-(N-Morpholino)-2hydroxypropansulfonsäure)-Lösung (pH 7):**

MOPS	2,0928 g
Reinstwasser	200 ml

**1000µM Ammoniumchlorid-Lösung:**

100 mM NH <sub>4</sub> Cl-Lösung	0,0535 g
100 mM MOPS-Lösung, pH-7	10 ml

Nach Mischung erfolgte eine 2fache 1:10-Verdünnung-, so dass eine 1000µM Endkonzentration erzielt worden ist.

**0,2 % Na-Hypochloritlösung (Reagenz-II):**

1 M NaOH-Lösung	59 ml
12 % Na-Hypochlorit-Lösung	1 ml

**Herstellung einer Standardreihe:**

Die Standardreihe wurde mit 100 mM MOPS-Puffer (pH-7) hergestellt.

**Tabelle 17:** Geräte und Chemikalien für die Bestimmung von Ammonium

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Mikrotiterplattenleser InLab®410 pH-	Tecan GmbH	Mainz, Deutschland
Kombinationselektrode Mikrotiterplatten, U-Form	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Eppendorf Gefäße	Anicrin S.R.L.	Scorze, Italien
Pufferlösung pH 7	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pufferlösung pH4	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Phenol nitroprusside	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Alkaline Hypochlorite solution	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Na-Hypochlorit, 0,2%	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
MOPS (3-(N-Morpholino)-2- hydroxypropansulfonsäure) ≥99 %	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid ≥99,5 %	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Reinstwasser	Sigma	Steinheim, Deutschland
	Millipore Company	Massachusetts, USA

### **3.11 Histologische Aufarbeitung der Darmwandproben**

Die beiden entnommenen Ganzwandproben des mittlere Jejunum wurden in einer modifizierten Bouin'schen Lösung nach Hollande bzw. in 4 % neutral gepufferter Formalinlösung (37 % Formol + 2 x PBS in Aqua dest) fixiert. Die histologische Bearbeitung der Darmwandproben erfolgte innerhalb einer Woche nach Sektionsende. Die Darmwandproben wurden mit Igelstacheln auf Korkplatten ausgespannt und mit der Schleimhautoberfläche auf beide Medien verbracht, für 24 Stunden fixiert, anschließend nach einem spezifisch festgelegten Entwässerungsprogramm bearbeitet und in Paraffin ausgegossen. Nach einer Woche wurden die gewonnenen Paraffinblöcke geschnitten. Diese Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert. Die für die histologische Arbeit verwendeten Geräte und Chemikalien finden sich in Tabelle 19. Puffer und Lösungen, die zusätzlich für immunhistochemische Nachweise verwendet wurden, sind unter Punkt 3.15.1 aufgeführt. Die Probenentnahme für die histologischen- und immunhistochemischen Arbeiten erfolgte nur für die Kontrollgruppe, die Gruppe der kurzzeitigen OS sowie für die Gruppe kurzzeitiger OS und MKFS.

#### **Herstellung der modifizierten Bouin'schen Lösung:**

Pikrinsäurelösung 10 %	106	g
Aqua dest.	2000	ml
Formollösung 37 %	227	ml
Kupfer- II-Acetat-Lösung	60	g
Aqua dest. ad	2400	ml

Bei jeder Gewebeentnahme wurden Kupfer-II-Acetatlösung sowie 37 %iges Formol frisch zugegeben, die Lösung der Pikrinsäure erfolgte in ca. 40 °C warmem Aqua dest.

#### **Herstellung der 4 %igen Formalinlösung:**

Formol 37 %	108	ml
2 x PBS	500	ml
Aqua dest. ad	1000	ml

Die Herstellung der doppelt konzentrierten PBS- Lösung erfolgte durch die Vermengung von 19,1 g PBS-Pulver in einem Liter Aqua dest.

#### **Anfertigung der histologischen Schnittpräparate**

Aus den in toto fixierten Darmabschnitten wurden ca. 2 cm lange und 2 cm breite Gewebeproben zugeschnitten und in Einbettungskapseln verbracht.

#### **Einbettung der Proben in Paraffin**

Zur Einbettung der Proben in spezielles Paraffin für die Histologie wurden die in Einbettungskassetten befindlichen Probenausschnitte folgendem Entwässerungsschema ausgesetzt:

- Spülen mit Leitungswasser für 2 Stunden (formalinfixierte Proben)
- PBS über Nacht (formalinfixierte Proben)
- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %)
- Entfernen des Alkohols mit Isopropanol und Xylol
- Ausbettung der Gewebeproben mit 60 °C warmem Paraffin

Das Entwässerungsprogramm für die in Bouin und Formalin fixierten Proben stellte sich in gleicher Weise dar. Um die Proben von überschüssigem Formalin zu befreien, wurde hierbei noch ein Spülgang mit Leitungswasser und PBS vollzogen. Die Entwässerung in 70- und 80 %igem Alkohol erfolgte jeweils über zwei Tage, wobei ein täglicher Alkoholwechsel gewährleistet wurde. Die Dehydrierung in 96 %igem Alkohol und anschließende Klärung in Isopropanol (2-Propanol) und Xylol sowie die Zugabe der Proben in Paraffin erfolgte jeweils an einem Tag. Die Gewebeschnitte wurden für je zwei Stunden in 96 %igem Alkohol und Isopropanol (2-Propanol) inkubiert, folgend für 30 min in Xylol verbracht, welchem zuvor 96 %iges Ethanol in einem Verhältnis von 1:1 zugesetzt wurde. Nach dreimaliger 30-minütiger Klärung mit reinem Xylol wurden die Proben über Nacht in 60 °C warmes Paraffin I zugegeben und am Folgetag in frisches Paraffin II und III für je eine Stunde überführt. Mithilfe einer Ausgießstation wurden abschließend Paraffinblöcke ausgegossen und diese durch eine integrierte Metallplatte zum Erkalten gebracht.

### Schneiden der Paraffinblöcke

Die erkalteten Paraffinblöcke wurden mit einem Schlittenmikrotom in einer Stärke von 5 µm geschnitten, in einem 40 °C warmen Wasserbad gestreckt und auf adhäsive (silanisierte) Glasobjektträger aufgezogen. Die angefertigten Schnitte wurden zur Trocknung bei 37 °C über Nacht in einem Wärmeschrank inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.12 Färbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Eosin**

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung handelt es sich um eine dichromatische Färbung, die sich aus dem basischen Kernfarbstoff Hämatoxylin und dem sauren Zytoplasmafarbstoff Eosin zusammensetzt (Böck, 1989). Sie stellt in der Histologie eine Standardfärbung dar, um eine gute Differenzierung einzelner Zellbestandteile zu erreichen. Der Zellkern reagiert dabei blauviolett, das Zytoplasma sowie die Muskulatur und das kollagene Bindegewebe färben sich rot. Das elastische Bindegewebe erhält eine blassrosa Färbung. Die Anfärbung der Schnitte erfolgte nach entsprechendem Färbeprotokoll:

(1) Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte:

- |                        |    |     |
|------------------------|----|-----|
| • Xylol I              | 15 | min |
| • Xylol II             | 15 | min |
| • Isopropanol          | 3  | min |
| • 96 % Alkohol         | 3  | min |
| • 80 % Alkohol         | 3  | min |
| • 70 % Alkohol         | 3  | min |
| • Spülen in Aqua dest. | 2  | min |

Vor jeder Färbereihe mussten die Schnitte zuerst in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 80 %, 70 %) rehydriert werden.

(2) Färbung mit Hämalaun-Eosin

- |  |       |     |
|--|-------|-----|
| • Färben mit Hämalaun sauer nach Mayer   | 10    | min |
| • Bläuen mit fließendem Leitungswasser   | 10    | min |
| • Färben mit 1 %igem Eosin in Aqua dest. | 3     | min |
| • Spülen mit Aqua dest.                  | 20-30 | sek |

Der 1 %igen Eosin-Gebrauchslösung (1 g Eosin in 1000 ml Aqua dest.) wurden an jedem Färbetag fünf Tropfen Eisessig zugeführt.

(3) Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe

- |                |   |     |
|----------------|---|-----|
| • 70 % Alkohol | 3 | min |
|----------------|---|-----|

- 80 % Alkohol 3 min
- 96 % Alkohol 3 min
- Isopropanol 2 min
- Xylol I 5 min
- Xylol II 5 min

(4) Eindecken mit dem Einbettmedium Histokitt

Das Eindecken mit Histokitt erfolgte ohne vorheriges Abtrocknen direkt aus dem Xylol heraus.

### **3.13 Immunhistochemischer Nachweis jejunaler CD3<sup>+</sup>-IEL**

Mithilfe der Immunhistochemie ist es möglich, durch eine Antikörperreaktion gezielt Proteine (Epitope) im Gewebeschnitt zu detektieren. Dieser Nachweis beruht auf der Affinität primärer Antikörper zu bestimmten Epitopen als eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Eine anschließende Visualisierung kann durch verschiedene Detektionssysteme dargestellt werden. Prinzipiell wird dabei zwischen einer direkte und einer indirekten Methode unterschieden. Folgend soll nur die hier verwendete indirekte Methode (Zwei-Schritt-Methode) näher beschrieben werden. Bei dieser Methode bindet ein spezifischer Primärantikörper an das zu untersuchende Antigen (Epitop). In einem zweiten Schritt wird ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper, welcher sich gegen den Primärantikörper richtet, aufgetragen und über eine Enzym-Substrat-Reaktion (Umsetzung eines farblosen Chromogens) wird eine Farbentstehung ausgelöst. Der dazu verwendete monoklonale Antikörper PPT3 (Tab. 18) richtet sich gegen die Epsilonketten des CD3-Proteinkomplexes, dieser ist mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert und wurde für die Markierung CD3 positiver intraepithelialer Lymphozyten des mittleren Jejunums verwendet. Die für die immunhistochemischen Nachweise verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 19 aufgeführt. Puffer und Lösungen, die zusätzlich für die histologische Aufarbeitung genutzt wurden sind unter Punkt 3.13.1 aufgeführt.

**Tabelle 18:** Für den immunhistochemischen Nachweis CD3<sup>+</sup>-IEL verwendete Primärantikörper

Name / Klon	Donor/Isotyp	Spezifität	Konzentration (µg/ml)	Hersteller
PPT3	Maus/IgG <sub>1κ</sub> (monoklonal)	Porcines CD3ε	5	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Anti-Mouse IgG <sub>1</sub>	Maus/IgG <sub>1</sub>	Keine <sup>1</sup> Isotypenkontrolle	<sup>2</sup>	DAKO, Golstrup, Dänemark

- 1) Isotypenkontrolle, Überprüfung der spezifischen Bindung des Primärantikörpers
- 2) die Proteinkonzentration wurde auf die des spezifischen Antikörpers (PPT3) eingestellt.

Alle verwendeten Primärantikörper (Tab. 18) wurden bis zum Erreichen einer reaktionsspezifischen Proteinkonzentration mit 1 % BSA (bovines Serumalbumin) in PBS verdünnt (1 g bovines Serumalbumin Pulver wurde mit 100 ml PBS versetzt). Die Etablierung eines reaktionsspezifischen, immunhistochemischen Nachweisprotokolls erfolgte zu Beginn

an den mittels Bouin und Formalin fixierten Paraffinschnitten des mittleren Jejunums eines gleichen Kontrolltieres. Um den Ausschluss falsch positiver Ergebnisse zu gewährleisten, wurden im Zuge eines jeden Reaktionsdurchgangs zusätzliche Präparate mitgeführt. Diese wurden lediglich mit dem Verdünnungsmedium (1 % BSA in PBS) bzw., um die spezifische Bindung des Primärantikörpers zu überprüfen (Isotypenkontrolle), mit einem irrelevanten, nicht reaktiven Kontrollantikörper (Tab. 18) gleicher Proteinkonzentration benetzt.

Jeder Reaktionsdurchlauf erstreckte sich über zwei Tage nach folgender Behandlung:

### 1. Tag

#### Entparaffinierung

- Xylol I 10 min
- Xylol II 10 min
- Isopropanol 2 min
- 96 % Alkohol 2 min
- 196 ml 80 % Alkohol + 4 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) 30 min

Der Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) erfolgte zur Inaktivierung endogener Peroxidasen (z. B. in Hämoglobin und Myoglobin) zur Minderung einer unspezifischen Hintergrundfärbung, da das für die Farbmarkierung verwendete Chromogen durch eine an anti-Maus IgG- gekoppelte Peroxidase im zweiten Schritt oxidiert wird.

- 70 % Alkohol 2 min
- 3 x PBS 5 min

#### Demaskierungsmethoden

Eine Formalinfixierung kann zur Bildung von Schiffchen Basen mit den freien Aminosäurenreste der Polypeptidketten führen und bewirkt über diese Proteinquervernetzung eine Maskierung des nachzuweisenden Proteins („Epitopmaskierung“). Dieser Vorgang kann falsch negative immunhistochemischen Ergebnisse bewirken und bedarf einer zusätzlichen Aufbereitung der Gewebeschnitte. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten diese Verbindungen zu lösen: durch Proteolyse (enzymatisch) oder durch die Zufuhr von Wärme. In dieser Arbeit wurden beide Methoden getestet.

#### Proteolyse mit Demaskierungslösung P

Dabei handelte es sich um fertige 0,1 %ige Pronaselösung (Demaskierungslösung P), die bis zur Benetzung der Schnitte ein bis zwei Tropfen aufgetragen wurde. Die Inkubationszeit betrug 10 bzw. 20 oder 30 min.

#### Wärmebehandlung mit Zitratpuffer

Die Inkubation der Schnitte im Zitratpuffer erfolgte bei 96-98 °C für 30 min. Die Herstellung des Zitratpuffers erfolgte aus zwei verschiedenen Stammlösungen (Hornickel, 2009):

#### **Stammlösung A (0,1 M Zitronensäurelösung):**

Zitronensäure	21	g
Aqua dest.	1000	ml

#### **Stammlösung B (0,1 M Na-Citratlösung):**

Na-Citrat	29,4	g
Aqua dest.	1000	ml

Abschließend wurden 18 ml der Stammlösung A in 82 ml der Stammlösung B verbracht und mit 1000 ml Aqua dest. gemischt.

Nach jedem Vorbehandlungsschritt wurden die Schnitte für 3 x 5 min in PBS gewaschen.

### **Antikörperreaktion**

Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Zuvor wurden die Schnitte mit normalem Ziegenerum vorbereitet. Für diesen Schritt wurde normales Ziegenerum 1:5 verdünnt (500 µl Ziegenerum + 2000 µl PBS) und für 20 min auf die Schnitte aufgetragen. Ziegenerum bindet bei dieser Reaktion elektrostatisch freie Proteingruppen und verhindert dabei unspezifische Antikörper Bindungen. Anschließend wurde das Ziegenerum abgeklopft und der monoklonale Antikörper PPT3 bzw. die Isotypenkontrolle oder lediglich das Verdünnungsmedium aufgetragen. Sämtliche Reaktionsabläufe erfolgten in einer feuchten Kammer, diese wurde mit nassen (Aqua dest.) Zellstofftüchern ausgelegt und schützte das Gewebe vor Austrocknung.

## **2. Tag**

### **Nachweisreaktion**

Für die Visualisierung und somit dem Nachweis einer erfolgreichen Immunreaktion wurden sämtliche Reaktionskomponenten aus dem Envision<sup>®</sup> (Maus) System von DAKO eingesetzt. Zuvor wurden die Schnitte 3 x für 5 min mit PBS gespült, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Der aus diesem System verwendete Sekundärantikörper-Dextran-Polymer-Komplex wurde für 45 min auf die Schnitte pipettiert und in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss folgte eine wiederholte 3 fache Waschung mit PBS und 5minütige Inkubation mit dem Chromogen 3,3' Diaminobenzidin (DAB), welches zuvor frisch verdünnt wurde (10 µl DAB + 1000 µl HRP Substrat Puffer). DAB wird bei erfolgreicher Antigen-Primärantikörper Bindung durch die am Dextran-Polymer gebundene Meerrettichperoxidase (HRP, engl. *Horseradish Peroxidase*) des Sekundärantikörper-Komplexes und in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches die Reaktion katalysiert, in ein braunes, unlösliches Präzipitat umwandelt. Diese spezifische Färbung gilt als Indikator für einen indirekten Nachweis des an den Antikörper gebundenen Epitops (Zwei-Schritt-Methode). Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine wiederholte Spülung mit PBS für 5 min sowie mit fließendem Wasser (10 min).

### **Kerngegenfärbung mit Hämalan**

Nach dem letzten Spülgang erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämalan sauer nach Mayer für 40 sek und anschließender Bläuung unter fließendem Wasser für 10 min.

### **Entwässerung**

Zur Entwässerung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 % und Isopropanol), wobei sie für 2 min in jeder Konzentrationsstufe verblieben. Nach einer Verweildauer von 2 x 5 min in Xylol erfolgte das Eindecken mit Histokitt<sup>®</sup>.

### **3.13.1 Puffer und Lösungen für histologische- und immunhistochemische Arbeiten**

#### **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Stammlösung 20 x:**

- NaCl 160 g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 38,03 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,9 g
- Aqua dest. ad 1000 ml

#### **Herstellung von 1 fach PBS:**

- Stammlösung 50 ml
- Aqua dest. 950 ml

Der 1 x PBS-Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4 und wurde bei 4 °C gelagert.

#### **Herstellung von 80 % Alkohol:**

- 96 % Alkohol 833 ml
- Aqua dest. 167 ml

**Tabelle 19:** Für die histologische und immunhistochemische Aufarbeitung genutzten Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
EC-350 Paraffin-Ausgießstation	Fa. Microm	Walldorf, Deutschland
Grundschlittenmikrotom, Typ 1400	Fa. Leitz	Wetzlar, Deutschland
Heraeus® Trockenschrank T5042	Heraeus electronic	Hanau, Deutschland
Rotilabo® Einbettkassette Makro	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Magnet-Heizrührer, RH-KT/C	IKA Labortechnik GmbH&Co.KG	Staufen, Deutschland
Deckgläser, 24 x 50 mm	VWR International	Darmstadt, Deutschland
Histobond®, Marienfeld	Marienfeld GmbH	Lauda-Königshofen, Deutschland
Paraplast	McCormick Scientific, LLC	St. Louis, USA
Albumin Fraktion V, bovine, pulv. 98 %	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	Hamburg, Deutschland
Hämalaun nach Mayer	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Eosin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Xylol	Fa. Medite	Burgdorf, Deutschland
96 % Alkohol, vergällt mit Methylethylketon (MEK)	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
70 % Alkohol	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histokitt	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
37 % Formol	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Pikrinsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kupfer (II)-Acetat- monohydrat	J.T. Baker	Deventer, Niederlande
PBS (Phosphate Buffered Saline Substance Dulbecco's)	Serva Elektrophoresis	Heidelberg, Deutschland
Dako EnVision+System-HRP, Mouse (K4007)	Fa. Dako	Golstrup, Dänemark
Normales Ziegen Serum (Normal Goat Serum)	Fa. Dako	Golstrup, Dänemark
Wasserstoffperoxid 30 % Rotipuran®	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Demaskierungslösung P Citronensäure	Biologo	Kronshagen, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	Darmstadt, Deutschland
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland

### **3.14 Dokumentation und Auswertung der histologischen und immunhistochemischen**

#### **Analysen**

Die Längenmessungen der Dünndarmzotten- und Krypten erfolgten an den formalinfixierten und HE-gefärbten Paraffinschnitten des mittleren Jejunums bei 40 facher Vergrößerung. Die Quantifizierung der CD3<sup>+</sup>-IEL wurde an den mit Zitratpuffer vorbehandelten immunhistochemischen Schnitten bei 400 facher Vergrößerung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch ein Lichtmikroskop (*Photomikroskop III, Fa. Zeiss, Deutschland*) mithilfe einer digitalen Mikroskopkamera (*DP 72, Fa. Olympus, Deutschland*) und mit dem dazugehörigen Analyseprogramm (*Cell Sense Software, Fa. Olympus, Deutschland*). Pro Tier und Darmabschnitt wurden je vier Schnitte ausgewertet, wobei pro Schnitt fünf Zotten und Krypten vermessen bzw. die in den Zotten CD3<sup>+</sup> gefärbten IEL gezählt wurden. Die morphometrische Analyse erfolgte durch eine einfache Blindbestimmung bzw. die Zählung

der CD3<sup>+</sup> markierten IEL durch eine doppelte Blindbestimmung. Die Durchführung der Blindbestimmungen erfolgte durch die vorherige Kodierung der spezifischen Tiernummer durch fortlaufende Probennummern. Zur Gewährleistung der Objektivität geschah dies durch eine Person, für die die Versuchsdiäten unbekannt waren. Zur statistischen Auswertung konnten, aufgrund der schlecht erhaltenen Darmmorphologie, lediglich sechs Tiere pro Gruppe miteinbezogen werden.

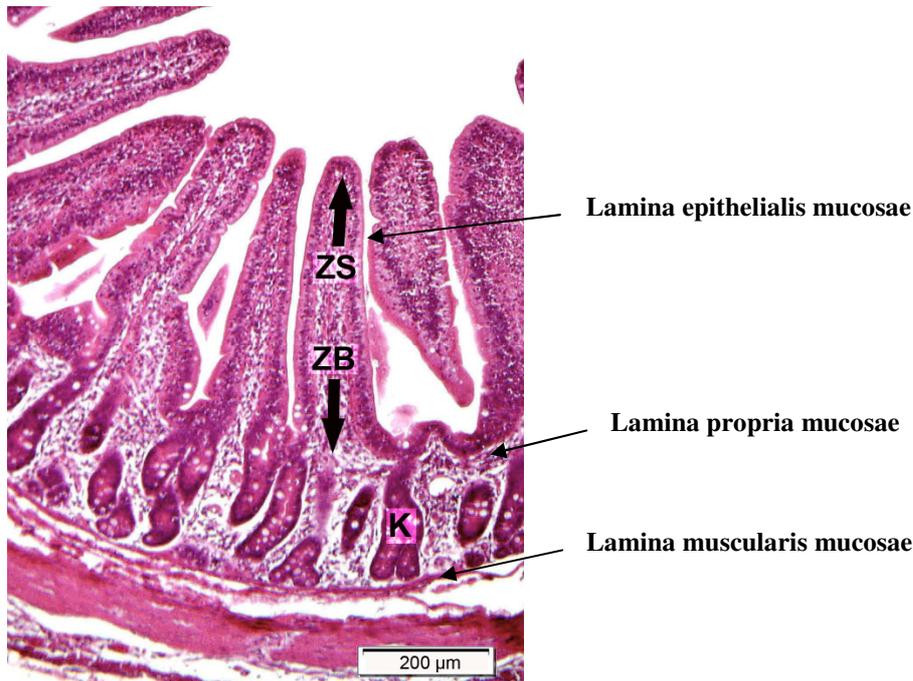
#### Bestimmung der Zottenlänge

Zur Auswertung wurden nur vollständig und gerade erfasste Zotten herangezogen. Die Länge der Zotten wurde dabei definiert als Länge einer Linie zwischen der Zottenspitze und Zottenbasis. Das Niveau des Öffnungsbereiches der Krypten galt dabei als Zottenbasis.

#### Bestimmung der Kryptentiefe

Nur unverzweigte Krypten wurden in der Messung miteinbezogen. Als Tiefe der Krypten wurde die Verbindungslinie zwischen Kryptenöffnung und Kryptenbasis definiert.

Es wurden nur die Bereiche der Gewebeschnitte ausgewertet, in denen die Schleimhaut nicht aufgefaltet, sondern parallel zur Tunica muscularis verlief, da ansonsten veränderte Kontraktionszustände der Lamina muscularis mucosae eine Verzerrung der Zotten- und Kryptenlänge bedingen. In Abbildung 2 findet sich die schematische Darstellung der Messbereiche zur Bestimmung der Zottenlänge und Kryptentiefe.



**Abbildung 2:** Darstellung der Dünndarmschleimhaut und schematische Markierung der Bestimmung von Zottenlänge und Kryptentiefe am mittleren Jejunum eines 53 Tage alten Ferkels (LM, HE, 4 x ); **ZS**=Zottenspitze, **ZB**=Zottenbasis, **K**=Darmkrypte

### Quantifizierung der CD3<sup>+</sup>-IEL

Die Erhebung der CD3<sup>+</sup>-IEL erfolgte nur an vollständigen und intakten Darmzotten. Die Angaben zur Zellzählung bezogen sich auf 100 Enterozyten und diente teilweise einem Vergleich der Quantifizierung CD3<sup>+</sup>-IEL mithilfe der Durchflusszytometrie (Punkt 3.17).

### **3.15 Nachweis IEL mittels Durchflusszytometrie**

Bei der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) ist nicht nur das Zählen und die Differenzierung bestimmter Zellen möglich, sondern auch das exakte Sortieren durch die zuvor durchgeführte Markierung mittels Fluoreszenzfarbstoffen. Die auf diese Weise markierten Zellen werden an einem monochromatischen Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet und das von den Zellen abgestrahlte Licht, wird von Photodetektoren detektiert und von Photomultipliern verstärkt. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörper. Die Grundlage dieses Verfahrens basiert, wie bei der Immunhistochemie, auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Die Phänotypisierung der verschiedenen IEL-Populationen erfolgte anhand ihrer Oberflächenmoleküle (Tab. 1, Literaturkapitel (2.3.1)), die dazu verwendeten Primärantikörper befinden sich in Tabelle 20. Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper waren für den Nachweis des gebundenen Primärantikörpers mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC bzw. PE markiert (Tab. 21). Die Quantifizierung der CD3<sup>+</sup>-IEL diente mitunter zum methodischen Vergleich der Quantifizierung der CD3<sup>+</sup>-IEL durch das immunhistochemische Nachweisverfahren. Hierfür wurde auch bei den durchflusszytometrischen Arbeiten der gleiche Primärantikörper PPT3 verwendet, dieser konnte jedoch aus organisatorischen Gründen nur bei den Tieren der zweiten und dritten Versuchsreihe eingesetzt werden. Die für die durchflusszytometrischen Analysen verwendete Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 22 aufgelistet.

**Tabelle 20:** Für die Phänotypisierung IEL verwendeten Primärantikörper

<b>Primärantikörper (Name / Klon)</b>	<b>Donor/Isotyp</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
PPT3 <sup>1</sup>	Maus/IgG <sub>1κ</sub>	Porcines CD3ε	1:200	SouthernBiotech, Birmingham, USA
CD2	Maus/IgG <sub>2a</sub>	Porcines CD2	1:200	VMRD, Inc., Pullman, USA
PGBL22A <sup>2</sup>	Maus/IgG <sub>1</sub>	Po-TcR1-N4, bindet an δ- Kette	1:100	VMRD, Inc., Pullman, USA
PG164A	Maus/IgG <sub>2a</sub>	Porcines CD8β	1:100	VMRD, Inc., Pullman, USA
G7 (CD16)	Maus/IgG <sub>1</sub>	Porcines CD16	1:100	Acris Antibodies, Herford, Deutschland
CD5	Maus/IgG <sub>1</sub>	Porcines CD5	1:100	VMRD, Inc., Pullman, USA

<sup>1</sup>der Klon PPT3 wurde auch für den immunhistochemischen Nachweis verwendet. <sup>2</sup>Primärantikörper zum Nachweis von γδ<sup>+</sup>T-Zellen.

**Tabelle 21:** Für die Phänotypisierung der IEL verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper <sup>1</sup>	Primärantikörper	Verdünnung	Farbstoff
Goat IgG <sub>1</sub> <sup>1</sup>	Anti-Mouse PPT3	1:100	FITC
Goat IgG <sub>2a</sub> <sup>1</sup>	Anti-Mouse CD2	1:100	FITC
Goat IgG <sub>1</sub> <sup>1</sup>	Anti-Mouse PGBL22A	1:200	PE
Goat IgG <sub>2a</sub> <sup>1</sup>	Anti-Mouse CD8β	1:100	FITC
Goat IgG <sub>1</sub> <sup>1</sup>	Anti-Mouse G7 (CD16)	1:200	PE
Goat IgG <sub>1</sub> <sup>1</sup>	Anti-Mouse CD5	1:200	PE

<sup>1</sup>die verwendeten Sekundärantikörper wurden von der *Fa. SouthernBiotech, Birmingham, USA* hergestellt, FITC = Fluoresceinisothiocyanat; PE = Phycoerythrin

### Aufarbeitung der Darmproben

Aus dem mittleren Jejunum wurde ein mind. 20 cm langes Stück (ohne Peyersche Platten) entnommen und unverzüglich in PBS überführt. Das Darmstück wurde an einem Ende mit einem Bindfaden abgebunden und invertiert, die Darmschleimhaut wurde dabei nach außen gestülpt und der abgebundene Darm mit PBS befüllt. Die Darmproben wurden in 70 ml HBSS-DTT-Medium überführt und für 5 min bei 37 °C in einen Schüttelinkubator verbracht. Im Anschluss wurde das Medium verworfen und das Darmstück in 100 ml frischem HBSS-EDTA-Medium inkubiert und für 35 min bei 37 °C und 110 Rotationen/min geschüttelt. Der Darm wurde folgend in frisches HBSS-EDTA-Medium überführt und der gleichen Behandlung erneut unterzogen. Die aus jeder EDTA-Inkubation gewonnene Zellsuspension wurde jeweils über eine Gaze in ein 50 ml Falcon-Röhrchen geleitet und bei 600 xg für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die zwei so gewonnenen Zellpellets wurden einzeln in 4-8 °C kaltem RPMI-Medium (ca. 10 ml) resuspendiert und vereinigt. Der so zusammengeführten Zellsuspension (20 ml) wurde 50 µl DNase (1 mg/ml) zugegeben und diese anschließend bei 37 °C für 5 min inkubiert. Danach erfolgte eine wiederholte Zentrifugation unter den bereits beschriebenen Bedingungen. Das Pellet wurde dann mit ca. 15-30 ml Percoll (25 %ig) in Suspension gebracht und bei Raumtemperatur für 20 min bei 600 xg zentrifugiert. Der Überstand, welcher restlichen Mukus und tote Zellen enthielt, wurde verworfen und das freigelegte Zellpellet wurde unverzüglich in 4-8 °C kaltes RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden nochmals bei 4 °C und 300 xg für 10 min zentrifugiert und im Anschluss wurde eine 5-10 fache Menge an Lysis-Puffer (Ammoniumchloridlösung) zugegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und unter gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden abschließend in 5 ml RPMI-Medium aufgenommen und für die FACS-Färbungen 100 µl (1 x 10<sup>6</sup> Zellen) eingesetzt.

### **Herstellung der benötigten Medien und Puffer:**

#### **HBSS-DTT-Medium (500 ml):**

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution ohne CaCl <sub>2</sub> und MgSO <sub>4</sub> )	
1,4-Dithiothreitol (DTT)	2 mM
Hepes	0,01 M

**HBSS-EDTA-Medium (500 ml):**

HBSS (ohne CaCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub>)

EDTA 1 mM

Hepes 1 mM

**Lyse-Puffer (Ammoniumchlorid-Lösung):**

NH<sub>4</sub>Cl 155 mM

KHCO<sub>3</sub> 10 mM

EDTA 0,1 mM

**Percoll (90 %):**

10 x HBSS 10 ml

NaHCO<sub>3</sub> 0,175 g

Percoll 90 ml

Das verwendete 10 x HBSS-Medium enthielt kein NaHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub>. Die Herstellung von 90 %igem Percoll diente als Ausgangslösung für die Herstellung der 25 %igen Gebrauchslösung

**Percoll (25 %):**

HBSS (ohne CaCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub>) 43,34 ml

Percoll (90 %) 16,66 ml

Auswertung der FACS-Daten

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest pro<sup>®</sup> (Tab. 22), wobei als Darstellungen das Streudiagramm (Density Plot) gewählt wurde. Mithilfe des Streudiagramms können einzelne Zellpopulationen anhand verschiedener Merkmale wie Morphologie, aber auch Bindung von Antikörpern voneinander abgegrenzt und weiter untersucht werden. Die Angaben der Auswertung erfolgten als Anteil (%) der exprimierten Oberflächenmoleküle auf IEL des mittleren Jejunums bezogen auf die gesamte Lymphozytenfraktion bzw. auf die mikroskopisch gezählte Gesamtanzahl (Mittelwert aus beiden Blindbestimmungen) CD3<sup>+</sup> markierter IEL (absolute Anzahl).

**Tabelle 22:** Für die durchflusszytometrischen Analysen benötigten Geräte und Materialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort, Staat</b>
Heraeus <sup>®</sup> Megafuge <sup>®</sup> 1.0R	Thermo Scientific	Karlsruhe, Deutschland
MaxQShakers	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
FACS Calibur <sup>®</sup>	Becton Dickinson Bioscience	San José, USA
CellQuest pro <sup>®</sup>	Becton Dickinson Bioscience	San José, USA
FACS-Röhrchen	Falcon (Becton Dickinson)	Franklin Lake, USA
Sefar Nitex (120µm Nylon Netz)	Sefar AG	Heiden, Schweiz
HBSS	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
EDTA > 99 % (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
1,4-Dithiothreitol >99 %	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	Hamburg, Deutschland
Instamed 9.55 g/L PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
RPMI,1640-Medium	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Percoll <sup>™</sup>	GE Healthcare Bio Science	Uppsala, Schweden
DNase	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	Hamburg, Deutschland
Hepes Pufferan <sup>®</sup> >99 %	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Suprapur Ammoniumchlorid 99,995 (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat ≥ 99 %, Ph.Eur. (KHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland

### **3.16 Statistische Auswertungen**

Die statistische Auswertung wurde mithilfe des Programms SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago Illinois, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test (mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors) auf Normalverteilung überprüft. Normalverteilte Daten wurden durch den Mittelwert und Standardabweichung beschrieben und dargestellt. Für die nicht normalverteilten Daten erfolgte die Ermittlung des Median sowie von Minimum und Maximum.

Bei Normalverteilung der Daten basierte der Nachweis einer möglichen Beeinflussung der erhobenen Parameter durch mittelkettige Fettsäuren bzw. organische Säuren sowie durch die Interaktion beider Faktoren auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (allgemeines lineares Modell). Die Nullhypothese, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen existierten, wurde verworfen, sofern sich die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert)  $p \leq 0,05$  ergaben. Um in diesem Fall vorliegende Gruppenunterschiede festzustellen, erfolgte anschließend die Anwendung des LSD-Tests als Post-Hoc-Signifikanztest. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) wurde mit  $p \leq 0,05$  als signifikant und mit  $p \leq 0,10$  als tendenziell angesehen.

Bei nicht normalverteilten Daten wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt sowie bei Vorliegen des Signifikanzniveaus  $p \leq 0,05$  ein Signifikanztest nach Wilcoxon-Mann-Whitney angeschlossen. Die Parameter D-, L- und Gesamtlaktat sowie die Konzentrationen der mittelkettigen- und kurzkettigen Fettsäuren (prozentualer Anteil) variierten hinsichtlich ihres Verteilungsverhaltens in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts. Da überwiegend keine Normalverteilung der Daten vorlag und um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde hier auf die bereits beschriebenen nichtparametrischen Testverfahren zurückgegriffen.

Aufgrund der Gruppenanzahl konnte für die histologischen, immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Nachweise keine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt werden. Bei Normalverteilung dieser Daten erfolgte anschließend die Anwendung einer einfaktoriellen Varianzanalyse sowie als Post-Hoc-Signifikanztest der LSD-Test.

## 4. Ergebnisse

Zunächst sollen die Ergebnisse der Futtermitteluntersuchungen dargestellt werden, gefolgt von der biologischen Leistung der Versuchstiere und den Ergebnissen der Analysen aus dem gewonnenen Sektionsmaterial. Die Erhebungen der Leistungsparameter erfolgten anhand der Daten von 94 Versuchstieren. Der versuchsbedingte Sektionsvorgang wurde an jeweils drei Tieren pro Gruppe und Durchgang durchgeführt. Im Anschluss erfolgt die Darlegung der Ergebnisse aus den durchgeführten Digestauntersuchungen aus den verschiedenen Lokalisationen des Verdauungstrakts, wobei an dieser Stelle darauf hingewiesen wird, dass aufgrund der geringen Chymusmengen aus den verschiedenen Abschnitten des Duodenums D1 (Pars cranialis), D2 (Pars descendens) und D3 (Pars ascendens) lediglich die Bestimmung des pH-Wertes sowie die Messung der Konzentrationen der MKFS (C:8 und C:10) durchgeführt werden konnten. Rektumchymusproben für die Bestimmung der Trockensubstanz und der Gesamtverdaulichkeit wurden nur aus den Tieren der zweiten und dritten Versuchsreihe entnommen. Die Konzentrationsbestimmung der mittelkettigen Fettsäuren Caprylsäure (C:8) und Caprinsäure (C:10) erfolgte aus den vorderen Verdauungstraktabschnitten (Magen, D1, D2, D3 und Jejunum). Die Quantifizierung der Enterobakterien, Laktobazillen sowie der qualitative und quantitative Nachweis vorkommender *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren erfolgte aus der Digesta von sechs Tieren pro Gruppe, diese wurden randomisiert ausgewählt.

Abschließend erfolgt die Beschreibung der histologischen und immunhistochemischen Befunde sowie die Darstellung der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Kontrollgruppe, der Gruppe KOS und der Gruppe KOS und MKFS.

### 4.1 Versuchsdiäten

In der vorliegenden Studie kamen vier verschiedene Mischfuttermittel (Tab. 6, Punkt 3.3) zum Einsatz, die einer einheitlichen Grundmischung entstammten. Alle Futtermittelanalysen erfolgten für jeden Durchgang separat. Die Ergebnisse der Analysen der Zusammensetzung sind in Tabelle 23 bzw. Tabelle 24 dargestellt und werden als Mittelwerte einer Futtermittelvariante angegeben.

**Tabelle 23:** Rohnährstoff-, Mineralstoff- und Spurenelementgehalte sowie Säurebindungskapazität der eingesetzten Mischfuttermittel (Mittelwert<sup>1</sup>)

	Gruppe			
	- KOS		+ KOS	
	- MKFS	+ MKFS	- MKFS	+ MKFS
Trockensubstanz (g/kg uS)	888,8	889,9	887,5	888,6
Rohasche (g/kg TS)	62,9	64,5	64,5	67,3
Rohprotein (g/kg TS)	207,3	205,3	202,6	204,0
Rohfett (g/kg TS)	61,2	58,5	59,1	62,3
Rohfaser (g/kg TS)	46,5	47,4	49,5	50,3
Kalzium (g/kg TS)	9,7	9,6	9,6	9,8
Phosphor (g/kg TS)	5,5	5,4	5,5	5,5
Natrium (g/kg TS)	2,6	2,8	2,8	2,9
Kalium (g/kg TS)	8,1	8,2	8,1	8,0
Magnesium (g/kg TS)	1,6	1,6	1,6	1,6
Eisen (mg/kg TS)	451	462	445	467
Zink (mg/kg TS)	142	139	130	128
Kupfer (mg/kg TS)	114	122	123	126
Chrom (g/kg TS)	3,6	3,8	3,7	3,9
Pufferkapazität (mEq/kg)	545	515	510	495

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); TS = Trockensubstanz; uS = ursprüngliche Substanz; mEq = Milliequivalent; <sup>1</sup>Mittelwert aus den Untersuchungsergebnissen der drei Versuchsreihen

**Tabelle 24:** Analytierte Konzentrationen der zugesetzten Futterzusatzstoffe in den Versuchsdiäten (Mittelwert<sup>1</sup>)

g/kg TS	Gruppe			
	- KOS		+ KOS	
	- MKFS	+ MKFS	- MKFS	+ MKFS
L-Laktat	0,45	0,29	3,97	3,74
D-Laktat	0,09	0,12	0,13	0,11
Fumarsäure	<0,50	<0,50	4,16	4,15
Caprylsäure	0,09	0,56	0,12	0,67
Caprinsäure	0,06	0,48	0,08	0,52

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); <sup>1</sup>Mittelwert aus den Untersuchungsergebnissen der drei Versuchsreihen

## **4.2 Gesundheitsbeurteilung**

In allen drei durchgeführten Versuchsreihen konnten keine Unterschiede hinsichtlich der gesundheitlichen Parameter und der Durchfallinzidenz mittels des Bonitierungsschlüssels zwischen den Gruppen ermittelt werden. Daher wurde auf eine weitere Darstellung an dieser Stelle verzichtet. Die nach dem Bewertungsschema für jeden Gesundheitsparameter zusammengefassten Ergebnisse der einzelnen Fütterungsgruppen finden sich im Anhang (Tab. 44).

In der zweiten Versuchsreihe musste der Verlust eines Ferkels der Versuchsgruppe MKFS verzeichnet werden, dieses war bereits am Tage der Einstallung durch Atemwegs- sowie Herz-Kreislauf-Probleme und einer geringeren Lebendmasse auffällig. Dieses Tier wurde in der ersten Fütterungswoche aus dem Versuch genommen.

## **4.3 Zootechnische Parameter**

In allen drei Versuchsreihen wurden jeweils zwei Ferkel in einer Bucht zusammengehalten, diese wurden bei der Auswertung der zootechnischen Parameter als eine Versuchseinheit angesehen. Für jede Versuchsreihe wurden die Daten für je vier Flatdecks pro Gruppe erhoben bzw. im zweiten Durchgang für die Gruppe MKFS, durch den Ausschluss einer Versuchseinheit (siehe Punkt 4.2), lediglich drei Flatdecks.

### **4.3.1 Futteraufnahme und Futteraufwand**

Die mittlere tägliche Futteraufnahme der Ferkel am Ende der einzelnen Versuchswochen und über den gesamten Versuchszeitraum ist in Tabelle 25 dargestellt. Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit begannen die Ferkel bereits am Tag der Einstallung bzw. zu Beginn des ersten Versuchstages mit der Futteraufnahme. Die Aufnahme des Futters wurde nicht deutlich durch die Futterzusatzstoffe beeinflusst. In der dritten Versuchswoche lag die mittlere tägliche Futteraufnahme der Ferkel bei Zusatz MKFS tendenziell ( $p = 0,093$ ) höher, verglichen mit den Tieren, die entweder das Basisfutter oder ausschließlich KOS über das Futter erhielten. Der Futteraufwand (Tab. 26) über die gesamte *ad libitum*-Fütterungsphase wurde durch den Zusatz von MKFS signifikant ( $p = 0,009$ ) beeinflusst, wobei sich der mittlere Futteraufwand der Kontrollgruppe deutlich über demjenigen der Gruppe MKFS bzw. tendenziell über demjenigen der Gruppe MKFS und KOS befand. Der Futteraufwand innerhalb der einzelnen Versuchswochen blieb indes unbeeinflusst.

### **4.3.2 Lebendmasse und Lebendmassezunahme**

Die Ferkel aller Versuchsreihen wurden randomisiert auf die Versuchsgruppen verteilt. Zu Beginn der Studie befand sich die Lebendmasse der Ferkel insgesamt, über alle drei Versuchsreihen, in einer Spanne von 5,1 bis 8,7 kg, lediglich eines der Tiere aus dem ersten Versuchsdurchgang wies ein geringeres Eingangsgewicht auf (4,86 kg). Bereits nach der ersten Fütterungswoche konnte eine Zunahme der Lebendmasse aller Tiere verzeichnet werden. Die mittleren Einstallgewichte sowie die wöchentlich erhobenen mittleren Lebendmassen der Ferkel der verschiedenen Gruppen sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Die Erhebung der mittleren Lebendmasse zum Ende jeder einzelnen Fütterungswoche und über den gesamten *ad libitum*-Fütterungszeitraum differierte nicht zwischen den Tieren der verschiedenen Fütterungsgruppen. Die Berechnung der täglichen Lebendmassezunahme ergab für den Abschluss der dritten Versuchswoche deutliche Unterschiede (Tab. 28), wobei die mittlere Zunahme der Ferkel durch den Zusatz von mittelkettigen Fettsäuren signifikant ( $p < 0,001$ ) beeinflusst wurde. Die Gruppe MKFS erzielte in dieser Woche die höchste mittlere Zunahme, sie lag deutlich über derjenigen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe KOS. Die kombinierte Fütterung von MKFS und KOS erbrachte in gleicher Versuchswoche

lediglich im Vergleich zur Gruppe KOS eine signifikante bzw. verglichen mit der Kontrollgruppe eine tendenzielle Steigerung der täglichen Lebendmassezunahme. Die tägliche Zunahme in den übrigen Fütterungswochen und über die gesamte Phase der ad libitum-Fütterung während der ersten drei Versuchswochen wurde nicht durch die Fütterungsadditiva beeinflusst.

**Tabelle 25:** Mittlere tägliche Futtermittelaufnahme (kg) der vier Versuchsgruppen am Ende der einzelnen Fütterungswochen und über die gesamte Versuchszeit (Mittelwert und Standardabweichung)

	- KOS		+ KOS		<i>P</i>		
	- MKFS (n=12)	+ MKFS (n=11)	- MKFS (n=12)	+ MKFS (n=12)	KOS	MKFS	MKFS x KOS
1. Woche	0,29 ± 0,09	0,25 ± 0,06	0,29 ± 0,06	0,27 ± 0,05	0,580	0,212	0,652
2. Woche	0,58 ± 0,13	0,53 ± 0,06	0,56 ± 0,10	0,54 ± 0,09	0,949	0,220	0,487
3. Woche	0,63 ± 0,12	0,69 ± 0,10	0,64 ± 0,12	0,69 ± 0,09	0,811	0,093	0,892
4. Woche <sup>1</sup>	0,78 ± 0,05	0,79 ± 0,06	0,79 ± 0,06	0,79 ± 0,05	0,375	0,744	0,741
Gesamtversuch <sup>2</sup>	0,50 ± 0,08	0,49 ± 0,04	0,50 ± 0,04	0,50 ± 0,06	0,746	0,916	0,633

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); *P* = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; <sup>1</sup>restriktive Fütterungswoche; <sup>2</sup>Gesamtversuch = über die dreiwöchige ad libitum Fütterung

**Tabelle 26:** Futtermittelaufwand der vier Versuchsgruppen am Ende der einzelnen Fütterungswochen und über den Gesamtversuchszeitraum (Mittelwert und Standardabweichung)

	- KOS		+ KOS		<i>P</i>		
	- MKFS (n=12)	+ MKFS (n=11)	- MKFS (n=12)	+ MKFS (n=12)	KOS	MKFS	MKFS x KOS
1. Woche	1,72 ± 0,65	1,63 ± 0,56	1,46 ± 0,45	1,45 ± 0,62	0,161	0,755	0,804
2. Woche	1,42 ± 0,48	1,22 ± 0,29	1,26 ± 0,16	1,33 ± 0,27	0,725	0,483	0,137
3. Woche	1,34 ± 0,29	1,27 ± 0,10	1,42 ± 0,26	1,34 ± 0,20	0,222	0,247	0,983
4. Woche <sup>1</sup>	1,73 ± 0,35	1,94 ± 0,31	1,76 ± 0,25	1,83 ± 0,30	0,674	0,105	0,419
Gesamtversuch <sup>2</sup>	1,39 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,15 <sup>ab</sup>	1,30 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,913	0,009	0,189

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); *P* = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; <sup>1</sup>restriktive Fütterungswoche; <sup>2</sup>Gesamtversuch = über die dreiwöchige ad libitum Fütterung; unterschiedliche Indizes (a,b) innerhalb einer Reihe geben signifikante Unterschiede an (*p*<0,05).

**Tabelle 27:** Mittlere Lebendmasse (kg) der vier Versuchsgruppen am Tag der Einstallung und am Ende der einzelnen Fütterungswochen (Mittelwert und Standardabweichung)

	- KOS		+ KOS		P		
	- MKFS (n=12)	+ MKFS (n=11)	- MKFS (n=12)	+ MKFS (n=12)	KOS	MKFS	MKFS x KOS
Einstallen	6,82 ± 0,65	6,93 ± 0,62	6,86 ± 0,70	6,87 ± 0,58	-	-	-
1. Woche	8,13 ± 1,01	8,17 ± 0,93	8,38 ± 1,12	8,38 ± 0,97	0,407	0,937	0,942
2. Woche	11,10 ± 1,49	11,31 ± 0,89	11,52 ± 1,40	11,39 ± 1,30	0,486	0,924	0,642
3. Woche <sup>1</sup>	14,42 ± 1,76	15,09 ± 0,95	14,71 ± 1,64	15,02 ± 1,33	0,786	0,234	0,663
4. Woche <sup>2</sup>	17,67 ± 1,84	18,00 ± 1,19	17,94 ± 1,71	18,14 ± 1,72	0,658	0,563	0,890

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); P = Überschreitungswahrscheinlichkeit (P-Wert); n = Anzahl der gültigen Fälle; <sup>1</sup>Gesamtversuch = über die dreiwöchige ad libitum Fütterung; <sup>2</sup>restriktive Fütterungswoche

**Tabelle 28:** Mittlere tägliche Lebendmassezunahme (kg) der vier Versuchsgruppen am Ende der einzelnen Fütterungswochen und über die gesamte Versuchszeit (Mittelwert und Standardabweichung)

	- KOS		+ KOS		P		
	- MKFS (n=12)	+ MKFS (n=11)	- MKFS (n=12)	+ MKFS (n=12)	KOS	MKFS	MKFS x KOS
1. Woche	0,19 ± 0,09	0,18 ± 0,08	0,22 ± 0,08	0,22 ± 0,09	0,140	0,819	0,862
2. Woche	0,42 ± 0,10	0,45 ± 0,09	0,45 ± 0,07	0,43 ± 0,11	0,919	0,948	0,424
3. Woche	0,47 ± 0,06 <sup>bc</sup>	0,54 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,52 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,251	< 0,001	0,939
4. Woche <sup>1</sup>	0,46 ± 0,10	0,42 ± 0,08	0,46 ± 0,10	0,45 ± 0,09	0,591	0,198	0,503
Gesamtversuch <sup>2</sup>	0,36 ± 0,07	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,05	0,39 ± 0,05	0,685	0,157	0,669

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); P = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; <sup>1</sup>restriktive Fütterungswoche; <sup>2</sup>Gesamtversuch = über die dreiwöchige ad libitum Fütterung; unterschiedliche Indizes (a,b,c) innerhalb einer Reihe geben signifikante Unterschiede an (p<0,05).

## **4.4 Verdauungsphysiologische Parameter**

### **4.4.1 pH-Wert der Digesta**

Die mittleren pH-Werte der untersuchten Darmabschnitte sind in Tabelle 29 dargestellt. Die geringere Probenanzahl in den Abschnitten D1 (Pars cranialis) und D3 (Pars ascendens) lassen sich dadurch erklären, dass aus diesen Bereichen nicht von allen Versuchstieren genügend Digesta gewonnen werden konnte. Die Unterschiede hinsichtlich postprandialer pH-Werte stellten sich wie folgt dar: Der gastrale pH-Wert im Bereich des Mageneingangs (M1) blieb durch die zugesetzten Futterzusatzstoffe unverändert, wobei im Fundusbereich (M2) der pH-Wert der Gruppen, die MKFS über das Futter erhielten, tendenziell ( $p = 0,094$ ) und im Bereich des Magenausgangs (M3) signifikant ( $p = 0,004$ ) beeinflusst wurde. In beiden Abschnitten lagen die mittleren pH-Werte der Tiere, welche MKFS als Zusatz erhielten, unter denjenigen ohne MKFS. Im Abschnitt M3 befand sich der mittlere pH-Wert der Gruppe, welche lediglich KOS über das Futter verabreicht bekam, signifikant über demjenigen der Gruppe MKFS und der kombinierten Futtervariante MKFS und KOS. Der pH-Wert der Kontrollgruppe lag in der Digesta des gleichen Abschnittes lediglich tendenziell über demjenigen der Gruppe MKFS und über jenem der Gruppe MKFS und KOS. Die duodenalen pH-Werte der Fütterungsgruppen unterschieden sich in keinem der drei analysierten Abschnitte. Die mittleren pH-Werte der jejunalen und ilealen Digesta wurden ebenfalls durch den Zusatz von MKFS signifikant ( $p = 0,041$  bzw.  $p = 0,046$ ) bzw. der jejunale zusätzlich tendenziell ( $p = 0,091$ ) durch die kombinierte Fütterung MKFS und KOS verändert. In beiden Abschnitten befand sich der mittlere pH-Wert der Gruppe MKFS signifikant unter demjenigen der Kontrollgruppe. In der Digesta des Kolons konnte keine von der Fütterung abhängige pH-Wert-Modulierung nachgewiesen werden.

### **4.4.2 Trockensubstanzgehalt der Digesta**

Die Ergebnisse der Trockensubstanzbestimmung aus der Digesta der verschiedenen Abschnitte des Verdauungssystems sind in Tabelle 30 zusammengefasst. Der mittlere Trockensubstanzgehalt der Fütterungsgruppen unterschied sich in keinem der untersuchten Abschnitte.

### **4.4.3 Scheinbare praecaecale und Gesamtverdaulichkeiten von Trockensubstanz, Rohprotein und Rohfett**

Die prozentualen Werte der scheinbaren praecaecalen und Gesamtverdaulichkeit der Trockensubstanz, des Rohproteins und des Rohfetts sind in Tabelle 31 aufgezeigt. Es ergaben sich lediglich bei der Auswertung des Rohfetts deutliche Unterschiede, wobei der Zusatz von MKFS die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit des Rohfetts signifikant ( $p = 0,035$ ) reduzierte. Die praecaecale Verdaulichkeit des Rohfetts der Gruppe MKFS und KOS lag dabei tendenziell unter derjenigen der Kontrollgruppe. Der geringere Probenumfang für die Bestimmung der praecaecalen Verdaulichkeit des Rohfetts ergab sich dadurch, dass nicht genügend Darminhalt aus den Tieren jeder Versuchsgruppe gewonnen werden konnte. Die Gesamtverdaulichkeit der erhobenen Parameter unterschied sich nicht zwischen den Gruppen.

#### **4.5 Bestimmung der mittelkettigen Fettsäuren in der Digesta**

Die Ergebnisse der Analysen für die untersuchten Darmabschnitte sind in Tabelle 32 zusammengefasst. Um eine übersichtliche Darstellung zu gewährleisten, wurde an dieser Stelle auf die Aufführung der Überschreitungswahrscheinlichkeiten (*P*-Werte) für die Gruppenunterschiede verzichtet und nur signifikante Gruppenunterschiede aufgeführt.

Die Bestimmung der Konzentrationen für die über das Futter zugeführten mittelkettigen Fettsäuren ergab für Caprylsäure (C:8) und für Caprinsäure (C:10) folgende Unterschiede: Im Mageninhalt der Tiere aus den Gruppen MKFS sowie MKFS und KOS lagen die Gehalte beider Fettsäuren einheitlich über denjenigen ohne MKFS, Gleiches wurde auch für die Gruppe MKFS in der Digesta der Abschnitte D1 (Pars cranialis) und D2 nachgewiesen wurde. Die Digesta aus D1 und D2 zeigte hinsichtlich der Capryl- und Caprinsäurekonzentrationen außerdem folgende Differenzen: Im Abschnitt D1 lag die nachweisbare Menge an Caprylsäure der Gruppe MKFS und KOS signifikant über derjenigen der Kontrolle bzw. im Falle der Caprinsäure signifikant über derjenigen der Kontrollgruppe und Gruppe KOS. Die Messung der Digesta D2 ergab für beide Fettsäuren signifikant höhere Konzentrationen für die Gruppe MKFS und KOS, verglichen mit der Ferkelgruppe, die ausschließlich kurzkettige organische Säuren als Zusatz erhielt. Die Konzentration der Caprinsäure der Gruppe MKFS, KOS und MKFS+KOS lag zudem im Abschnitt D3 über derjenigen der Kontrollgruppe. Die Auswertung des Inhaltes aus dem Jejunum ergab ebenfalls für Caprinsäure signifikante Unterschiede, wobei die Konzentration der Säure der Gruppe MKFS und KOS über derjenigen der Kontrolle und Gruppe KOS lag.

**Tabelle 29:** Mittlere pH-Werte der Digesta der untersuchten Lokalisationen des GI-Trakts der Versuchsferkel der vier Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung)

	- KOS		+ KOS		<i>P</i>		
	- MKFS (n=9)	+ MKFS (n=9)	- MKFS (n=9)	+ MKFS (n=9)	KOS	MKFS	MKFS x KOS
M1	3,81 ± 0,88	4,29 ± 0,93	4,08 ± 0,74	4,00 ± 1,16	0,979	0,506	0,340
M2	3,22 ± 0,81	2,81 ± 1,40	3,57 ± 0,95	2,87 ± 1,01	0,531	0,094	0,667
M3	3,45 ± 0,80 <sup>ab</sup>	2,76 ± 0,80 <sup>b</sup>	3,60 ± 0,78 <sup>a</sup>	2,78 ± 0,92 <sup>b</sup>	0,752	0,004	0,801
D1	5,56 ± 0,77 (n=7)	5,62 ± 1,06 (n=7)	5,18 ± 0,95 (n=8)	5,64 ± 1,10 (n=7)	0,588	0,439	0,554
D2	5,65 ± 0,72	5,27 ± 0,72	5,20 ± 0,79	5,66 ± 1,21	0,913	0,878	0,130
D3	5,62 ± 0,73 (n=8)	4,74 ± 0,11 (n=2)	5,62 ± 1,04 (n=8)	5,73 ± 1,69 (n=5)	0,305	0,430	0,303
Jejunum	6,55 ± 0,24 <sup>a</sup>	6,21 ± 0,31 <sup>b</sup>	6,42 ± 0,32 <sup>ab</sup>	6,39 ± 0,27 <sup>ab</sup>	0,816	0,041	0,091
Ileum	7,27 ± 0,56 <sup>a</sup>	6,62 ± 0,86 <sup>b</sup>	7,06 ± 0,38 <sup>ab</sup>	6,92 ± 0,61 <sup>ab</sup>	0,811	0,046	0,199
Kolon	5,72 ± 0,23	5,65 ± 0,20	5,70 ± 0,32	5,82 ± 0,36	0,421	0,767	0,266

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); M1 = Magen Cardia, M2 = Magen Fundus, M3 = Magen Pylorus, D1=Duodenum pars cranialis, D2=Duodenum pars descendens, D3=Duodenum pars ascendens; *P* = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; unterschiedliche Indizes (a,b) innerhalb einer Reihe geben signifikante Unterschiede an ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 30:** Trockensubstanz (% der uS) aus der Digesta der untersuchten Lokalisationen des GI-Trakts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung)

	- KOS		+ KOS		<i>P</i>		
	- MKFS	+ MKFS	- MKFS	+ MKFS	KOS	MKFS	MKFS x KOS
	(n=9)	(n=9)	(n=9)	(n=9)			
Magen	25,13 ± 5,18	27,87 ± 4,49	24,39 ± 6,82	24,68 ± 6,47	0,277	0,401	0,496
Jejunum	13,11 ± 3,29	13,13 ± 2,95	14,29 ± 2,28	11,15 ± 3,97	0,693	0,120	0,114
Ileum	13,25 ± 1,96	13,25 ± 2,43	14,44 ± 3,10	14,36 ± 4,42	0,245	0,956	0,957
Kolon	18,49 ± 2,43	16,49 ± 3,39	18,52 ± 1,95	19,78 ± 4,98	0,116	0,734	0,124
Rektum (n=6)	28,10 ± 1,80	28,17 ± 1,06	28,49 ± 2,07	26,47 ± 5,21	0,380	0,554	0,345

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure);  
*P* = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle

**Tabelle 31:** Scheinbare praecaecale und Gesamtverdaulichkeit der Trockensubstanz, des Rohproteins und des Rohfetts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (% der Aufnahme) (Mittelwert und Standardabweichung)

		- KOS		+ KOS		<i>P</i>		
		- MKFS	+ MKFS	- MKFS	+ MKFS	KOS	MKFS	MKFS x KOS
		(n=9)	(n=9)	(n=9)	(n=9)			
<b>Praecaecale Verdaulichkeit</b>	Trockensubstanz	60,60 ± 7,99	59,89 ± 5,47	60,33 ± 4,31	60,67 ± 4,87	0,888	0,918	0,774
	Rohprotein	68,37 ± 6,78	62,93 ± 6,29	64,14 ± 5,06	65,00 ± 6,68	0,581	0,242	0,108
	Rohfett	91,11 ± 2,81	88,25 ± 4,27 (n=8)	90,09 ± 5,05 (n=8)	87,30 ± 4,11 (n=8)	0,357	0,035	0,845
<b>Gesamt- verdaulichkeit</b>	Trockensubstanz	77,22 ± 4,63	78,85 ± 3,75	78,84 ± 2,82	78,14 ± 3,38	0,741	0,732	0,398
	Rohprotein	73,08 ± 6,54	76,55 ± 4,70	75,37 ± 5,25	74,48 ± 4,41	0,957	0,513	0,269
	Rohfett	82,96 ± 5,00	82,68 ± 6,34	81,38 ± 7,58	78,00 ± 5,26	0,171	0,424	0,497

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); *P* = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle

**Tabelle 32:** Konzentration der Capryl- und Caprinsäure (g/kg uS) der Digesta des vorderen GI-Trakts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Median (Minimum-Maximum))

		- KOS		+ KOS		P
		- MKFS	+ MKFS	- MKFS	+ MKFS	
		(n=9)	(n=9)	(n=9)	(n=9)	
M	C:8	0,02 (0,01-0,02) <sup>b</sup>	0,23 (0,01-0,31) <sup>a</sup>	0,01 (0,01-0,03) <sup>b</sup>	0,20 (0,01-0,25) <sup>a</sup>	< 0,001
	C:10	0,01 (0,01-0,02) <sup>b</sup>	0,18 (0,01-0,25) <sup>a</sup>	0,01 (0,01-0,01) <sup>b</sup>	0,17 (0,1-0,20) <sup>a</sup>	< 0,001
D1	C:8	0,004 (0,00-0,01) <sup>b</sup>	0,03 (0,01-0,10) <sup>a</sup>	0,003 (0,00-0,01) <sup>c</sup>	0,04 (0,01-0,05) <sup>ac</sup>	0,008
		(n=6)	(n=4)	(n=5)	(n=3)	
	C:10	0,003 (0,00-0,01) <sup>b</sup>	0,03 (0,01-0,10) <sup>a</sup>	0,002 (0,00-0,01) <sup>b</sup>	0,04 (0,01-0,05) <sup>a</sup>	0,006
D2	C:8	0,005 (0,01-0,02) <sup>b</sup>	0,02 (0,01-0,07) <sup>a</sup>	0,002 (0,00-0,01) <sup>c</sup>	0,02 (0,01-0,12) <sup>ab</sup>	0,005
		(n=7)	(n=5)	(n=5)	(n=4)	
	C:10	0,003 (0,00-0,02) <sup>b</sup>	0,02 (0,01-0,08) <sup>a</sup>	0,002 (0,00-0,00) <sup>b</sup>	0,02 (0,00-0,14) <sup>a</sup>	0,006
D3	C:8	0,002 (0,00-0,01)	0,05 (0,01-0,14)	0,003 (0,00-0,01)	0,03	0,074
		(n=5)	(n=3)	(n=4)	(n=1)	
	C:10	0,002 (0,00-0,01) <sup>b</sup>	0,05 (0,01-0,14) <sup>a</sup>	0,002 (0,00-0,00) <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,004
J	C:8	0,02 (0,01-0,03)	0,01 (0,00-0,04)	0,02 (0,01-0,03)	0,02 (0,01-0,03)	0,181
	C:10	0,01 (0,01-0,02) <sup>b</sup>	0,01 (0,00-0,03) <sup>ab</sup>	0,01 (0,00-0,02) <sup>b</sup>	0,02 (0,01-0,05) <sup>a</sup>	0,024

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl (C:8) - und Caprinsäure (C:10)); M = Magen (Sammelprobe), D1 = Duodenum pars cranialis, D2 = Duodenum pars descendens, D3 = Duodenum pars ascendens, J = Jejunum (Mitte); P = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; unterschiedliche Indizes (a,b,c) innerhalb einer Reihe geben signifikante Unterschiede an (p<0,05).

## **4.6 Mikrobiologische Parameter**

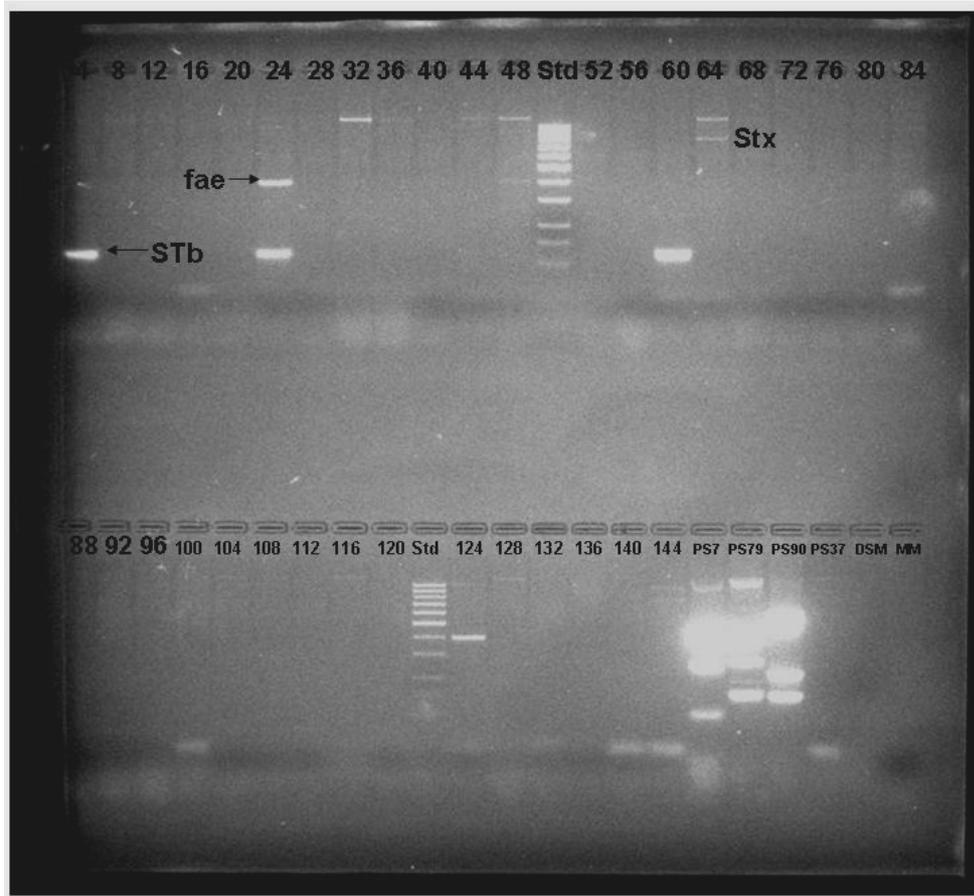
### **4.6.1 Quantifizierung der Laktobazillen und Enterobakterien mittels qPCR**

Die mittlere Zellzahl der Laktobazillen und Enterobakterien aus der Digesta der analysierten Lokalisationen wurde in Tabelle 33 aufgeführt.

Die Quantifizierung der Laktobazillen ergab für keinen der untersuchten Darmabschnitte signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen. Die Untersuchung der Enterobakterien aus der Digesta des Magens ergab einen gesicherten Effekt ( $p = 0,019$ ) durch den Zusatz KOS bzw. einen tendenziellen ( $p = 0,052$ ) durch MKFS auf die mittlere Zellzahl dieser Bakteriengruppen, wobei die mittlere Anzahl in der Versuchsgruppe mit dem alleinigen Zusatz von kurzkettigen organischen Säuren tendenziell unter derjenigen der Kontrollgruppe bzw. signifikant unter der Zellzahl der Versuchsgruppe MKFS lag. Im Jejunum und Kolon wurden ähnliche Verschiebungen deutlich. Im Jejunum wirkte sich der Zusatz MKFS bzw. MKFS und KOS signifikant ( $p = 0,042$  bzw.  $p = 0,049$ ) auf die mittlere Anzahl der Enterobakterien aus, wobei der mittlere Bakteriengehalt im Kolon lediglich durch MKFS beeinflusst wurde ( $p = 0,025$ ). Die Anzahl der Enterobakterien der MKFS-Gruppe befand sich im Jejunum signifikant über derjenigen der anderen Gruppen. Die Tiere der KOS-Gruppe wiesen in der Digesta des Kolons die geringste Zellzahl an Enterobakterien auf. Sie lag signifikant unter derjenigen der MKFS-Gruppe bzw. tendenziell unter der Zellzahl der Fütterungsvariante KOS und MKFS.

### **4.6.2 Qualitativer Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren mittels MPCR**

Die Multiplex PCR (MPCR) diente als qualitativer Nachweis vorkommenden *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren im Kolon. Die vier am häufigsten detektierten Pathogenitätsfaktoren waren est-II (STb), Stx2e (STx), Fas (987p) und fedA (F18ab) (Abb. 3). Diese wurden anschließend aus der Digesta des Kolons bzw. est-II und fedA zusätzlich aus dem Magen- und Ileuminhalt quantifiziert.



**Abbildung 3:** Agarosegel zur Darstellung vorkommender *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren im Kolon der Versuchsferkel mittels MPCR; Std = Standard (100bp), 4-24 = Kontrolle, 28-48 = Gruppe KOS, 52-72 = Gruppe MKFS und KOS, 76-96 = Gruppe MKFS, PS7 = *E. coli* (estII; fae; stx2e), PS79 = *E. coli* (elt-Ia; estIb; fan), PS90 = *E. coli* (elt-Ia; FedA; fae), PS37 = *E. coli* (estII; fas), DSM = *E. coli* DSM2840, MM = negative Kontrolle

#### **4.6.3 Quantitativer Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren mittels qPCR**

Bei der Quantifizierung der est-II-Amplifikate (STb) im Magen und Ileum lagen in beiden Abschnitten lediglich zwei Tiere der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe MKFS und KOS sowie bei fedA (F18ab) keines der Tiere über der Nachweisgrenze. In Tabelle 34 findet sich aus diesem Grund lediglich die Auflistung der Zellzahl der Amplifikate für alle im Kolon quantifizierten Pathogenitätsfaktoren. KOS scheinen insbesondere die mittlere Zellzahl der est-II-, Stx2e- und Fas-positiven *E. coli*-Stämme signifikant ( $p = 0,014$  bzw.  $p < 0,001$ ) beeinflusst zu haben. Die Evaluierung möglicher potenzierender Wirkung nach paralleler Fütterung KOS und MKFS über die Versuchszeit konnte aufgrund geringer Fallzahlen nur für die Faktoren STb und 987p ausgewertet werden. Gruppenunterschiede hinsichtlich der quantifizierten Faktoren stellten sich folgendermaßen dar: Die Zellzahl der est-II-Amplifikate (STb) lag bei den Tieren der KOS-Gruppe tendenziell ( $p = 0,052$ ) unter derjenigen der Gruppe, die lediglich MKFS erhielt, zusätzlich lag die mittlere Zellzahl Stx2e (STx) positiver *E. coli*-Stämme bei gleicher Versuchsgruppe ebenfalls tendenziell unter derjenigen der Kontrollgruppe. KOS und MKFS gemeinsam konnten die mittlere Fas (987p)-Amplifikat-Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell reduzieren. Aufgrund der zu geringen Fallzahl für die Ermittlung der Anzahl fedA (F18ab)-positiver *E. coli*-Stämme konnten die Daten nicht statistisch ausgewertet werden.

**Tabelle 33:** Mittlere Zellzahl [ $\log_{10}$  Zellen/g Digesta (uS)] von Laktobazillen und Enterobakterien der untersuchten Lokalisationen im GI-Trakt der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung)

Bakteriengruppe	Lokalisation	- KOS		+ KOS		<i>P</i>		
		- MKFS (n=6)	+ MKFS (n=6)	- MKFS (n=6)	+ MKFS (n=6)	KOS	MKFS	MKFS x KOS
Laktobazillen	Magen	9,24 ± 0,40	8,99 ± 0,88	9,52 ± 0,72	8,93 ± 0,98	0,702	0,148	0,567
	Jejunum	8,77 ± 0,40	8,58 ± 0,54	8,83 ± 0,28	8,85 ± 0,43	0,284	0,581	0,493
	Ileum	8,80 ± 0,51	8,98 ± 0,99	8,96 ± 0,53	9,16 ± 0,99	0,560	0,530	0,974
	Kolon	9,23 ± 0,44	9,19 ± 0,60	9,22 ± 0,44	8,85 ± 0,41	0,330	0,255	0,369
Enterobakterien	Magen	3,99 ± 0,40 <sup>ab</sup>	4,35 ± 0,91 <sup>a</sup>	3,17 ± 0,51 <sup>b</sup>	3,88 ± 0,98 <sup>ab</sup>	0,019	0,052	0,528
	Jejunum	3,14 ± 0,71 <sup>b</sup>	4,54 ± 1,34 <sup>a</sup>	3,30 ± 0,79 <sup>b</sup>	3,34 ± 0,80 <sup>b</sup>	0,146	0,042	0,049
	Ileum	4,56 ± 1,61	5,32 ± 2,27	4,41 ± 0,66	4,73 ± 1,68	0,555	0,381	0,713
	Kolon	7,00 ± 0,49 <sup>ab</sup>	7,40 ± 1,17 <sup>a</sup>	6,45 ± 0,25 <sup>b</sup>	7,33 ± 0,81 <sup>ab</sup>	0,274	0,025	0,401

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); *P* = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; unterschiedliche Indizes (a,b) innerhalb einer Reihe geben signifikante Unterschiede an ( $p < 0,05$ )

**Tabelle 34:** Mittlere Zellzahlen [ $\log_{10}$  Zellzahl/g Digesta (uS)] pathogener *Escherichia coli* im Kolon der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung)

Pathogenitätsfaktoren	- KOS		+ KOS		KOS	P	
	- MKFS (n=6)	+ MKFS (n=6)	- MKFS (n=6)	+ MKFS (n=6)		MKFS	MKFS x KOS
STb (est-II)	4,59 ± 0,84	5,00 ± 1,36	3,43 ± 1,87	3,74 ± 0,95	0,014	0,462	0,923
STx (Stx2e)	4,97 ± 0,11 (n=2)	ND	1,95 ± 1,33 (n=2)	2,45 ± 1,58 (n=2)	< 0,001	0,551	-
987p (Fas)	2,49 ± 1,33 (n=3)	1,63 ± 0,20 (n=4)	1,28 ± 0,92 (n=2)	1,28 ± 0,46 (n=4)	0,031	0,240	0,241
F18 (fedA)	1,46 (n=1)	1,92 ± 0,09 (n=3)	3,06 (n=1)	ND	-	-	-

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure);

P = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; ND (*nicht detektierbar*) = Zellzahl unterhalb der Nachweisgrenze

#### **4.6.4 Bakterielle Metaboliten**

##### **Kurzkettige Fettsäuren**

Die Bestimmung der Gesamtkonzentration der kurzkettigen Fettsäuren (Tab. 35) zeigte folgende Unterschiede: Der Zusatz MKFS beeinflusste die mittlere Gesamtkonzentration in der Digesta des Jejunums signifikant ( $p = 0,010$ ), wobei jene der Gruppe MKFS deutlich unter derjenigen der Gruppe KOS bzw. tendenziell unter derjenigen der Kontrollgruppe lag. Die Konzentration der Fettsäuren der Gruppe KOS befand sich im gleichen Abschnitt zusätzlich tendenziell über jener der Gruppe KOS und MKFS. Im Kolon dagegen bewirkte die Fütterung KOS eine signifikante ( $p = 0,023$ ) Reduktion der mittleren Gesamtkonzentration der nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren, wobei jene der Gruppe KOS signifikant unter derjenigen der Gruppe MKFS lag. In der Digesta des Kolons lag die Gesamtkonzentration der Gruppe MKFS und KOS außerdem tendenziell unter derjenigen der Gruppe MKFS. Die Betrachtung des prozentualen Anteils der einzelnen kurzkettigen Fettsäuren in Bezug zur Gesamtkonzentration (Tab. 36) ergab keine Unterschiede.

##### **D- und L-Laktat**

Die D- und L-Laktat-Konzentrationen der einzelnen Gruppen aus der Digesta der analysierten gastrointestinalen Bereiche sind in Tabelle 37 zu finden. Zur Beurteilung der metabolischen Aktivität der laktatbildenden Bakterien erfolgte zusätzlich die rechnerische Ermittlung der Gesamtkonzentration für Laktat. Die D- und L-Laktatgehalte sowie die Gesamtlaktatkonzentration aller untersuchten Darmabschnitte wiesen keine statistisch abgesicherten Differenzen zwischen den Gruppen auf. Die L-Laktatkonzentration in der Digesta des Magens der KOS-Gruppe lag jedoch über derjenigen der anderen Fütterungsgruppen, wobei dies bereits im Jejunum nicht mehr nachzuweisen war.

##### **Ammonium**

Die mittleren Ammoniumgehalte aus der Digesta der untersuchten Abschnitte des Verdauungstrakts sind in Tabelle 38 zusammengefasst. Die Konzentrationen von Ammonium konnten in den verschiedenen Bereichen durch keinen der Futterzusätze beeinflusst werden.

**Tabelle 35:** Gesamtkonzentration der kurzkettigen Fettsäuren (mmol/kg (uS)) in der Digesta der untersuchten Lokalisationen des GI-Trakts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung)

	- KOS		+ KOS		KOS	<i>P</i>	
	- MKFS (n=9)	+ MKFS (n=9)	- MKFS (n=9)	+ MKFS (n=9)		MKFS	MKFS x KOS
Magen	6,87 ± 7,46	9,20 ± 4,40	9,28 ± 5,10	7,26 ± 4,80	0,893	0,932	0,214
Jejunum	2,44 ± 0,82 <sup>ab</sup>	1,78 ± 0,78 <sup>b</sup>	2,57 ± 0,91 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,72 <sup>ab</sup>	0,598	0,010	0,994
Ileum	4,73 ± 2,73	5,26 ± 2,45	4,32 ± 1,44	5,11 ± 1,97	0,690	0,340	0,852
Kolon	119,24 ± 17,30 <sup>ab</sup>	126,14 ± 10,60 <sup>a</sup>	111,08 ± 13,15 <sup>b</sup>	113,03 ± 17,37 <sup>ab</sup>	0,023	0,344	0,597

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure), MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure);  
*P* = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; unterschiedliche Indizes (a,b) innerhalb einer Reihe geben signifikante Unterschiede an (p<0,05).

**Tabelle 36:** Prozentualer Anteil der einzelnen kurzkettigen Fettsäuren in Bezug auf die Gesamtmenge in der Digesta (uS) der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Median (Minimum-Maximum))

		- KOS		+ KOS		P
		- MKFS (n=9)	+ MKFS (n=9)	- MKFS (n=9)	+ MKFS (n=9)	
Magen	Essigsäure	97,70 (95,88-99,23)	98,11 (95,97-99,02)	98,16 (95,44-98,58)	97,36 (92,77-98,59)	0,315
	Propionsäure	1,43 (0,13-2,23)	0,87 (0,55-2,25)	1,04 (0,65-2,51)	1,57 (0,75-3,36)	0,289
	i-Buttersäure	0,02 (0,00-0,36)	0,01 (0,00-0,12)	0,01 (0,00-0,31)	0,09 (0,01-0,68)	0,090
	n-Buttersäure	0,39 (0,11-0,70)	0,23 (0,06-0,70)	0,24 (0,09-0,70)	0,36 (0,18-0,61)	0,157
	i-Valeriansäure	0,41 (0,15-1,43)	0,79 (0,14-1,40)	0,44 (0,01-1,95)	0,60 (0,02-2,56)	0,899
	n-Valeriansäure	0,01 (0,00-0,25)	0,002 (0,00-0,14)	0,003 (0,00-0,12)	0,01 (0,00-0,32)	0,432
Jejunum	Essigsäure	95,05 (81,74-97,98)	95,12 (90,70-97,44)	95,15 (88,57-97,35)	96,70 (84,64-98,46)	0,550
	Propionsäure	2,81 (1,47-17,54)	2,30 (1,62-5,74)	1,58 (1,04-10,92)	1,84 (0,48-4,54)	0,461
	i-Buttersäure	0,32 (0,01-0,68)	0,05 (0,01-0,40)	0,05 (0,01-0,50)	0,03 (0,01-0,67)	0,594
	n-Buttersäure	0,24 (0,02-0,66)	0,36 (0,01-2,00)	0,22 (0,01-0,47)	0,55 (0,01-1,30)	0,198
	i-Valeriansäure	0,62 (0,01-1,28)	0,53 (0,01-2,34)	0,39 (0,01-0,88)	0,43 (0,02-11,88)	0,755
	n-Valeriansäure	0,01 (0,01-0,44)	1,49 (0,46-3,65)	0,01 (0,01-3,06)	0,01 (0,01-0,02)	0,350
Ileum	Essigsäure	91,58 (87,99-94,42)	88,41 (68,17-96,40)	88,45 (85,60-94,59)	90,03 (22,26-94,34)	0,428
	Propionsäure	3,46 (2,59-5,79)	3,95 (1,63-26,51)	4,25 (2,81-7,57)	4,08 (2,07-74,24)	0,742
	i-Buttersäure	0,01 (0,00-0,02)	0,01 (0,00-0,02)	0,01 (0,01-0,01)	0,01 (0,00-0,02)	0,760
	n-Buttersäure	1,91 (0,79-3,89)	2,84 (0,25-4,81)	2,72 (0,66-4,27)	2,16 (1,61-9,20)	0,779
	i-Valeriansäure	2,37 (0,44-5,27)	2,65 (0,94-8,82)	3,08 (0,75-6,51)	2,36 (1,15-17,03)	0,896
	n-Valeriansäure	0,00 (0,00-0,01)	0,00 (0,00-0,01)	0,01 (0,00-0,01)	0,00 (0,00-0,1)	0,760
Kolon	Essigsäure	53,09 (46,28-64,52)	53,06 (47,64-57,33)	54,72 (48,62-59,97)	54,55 (50,69-57,22)	0,977
	Propionsäure	25,58 (21,15-33,87)	25,60 (20,62-32,20)	27,90 (20,21-31,79)	27,19 (19,58-30,84)	0,961
	i-Buttersäure	0,46 (0,21-1,60)	0,41 (0,17-0,95)	0,62 (0,09-1,69)	0,41 (0,17-0,95)	0,523
	n-Buttersäure	14,04 (11,40-16,55)	15,69 (11,74-19,66)	13,14 (9,14-22,29)	15,69 (11,74-19,66)	0,369
	i-Valeriansäure	0,57 (0,26-2,12)	0,49 (0,16-1,11)	0,71 (0,05-2,31)	0,58 (0,24-3,61)	0,346
	n-Valeriansäure	2,86 (1,07-4,77)	2,67 (1,57-4,63)	2,74 (1,07-5,26)	3,43 (1,46-4,28)	0,804

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure), MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); P = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle

**Tabelle 37:** D- und L-Laktat Konzentrationen (mmol/kg uS) der Digesta der untersuchten Lokalisationen des GI-Trakts der Ferkel der vier Versuchsgruppen (Median (Minimum-Maximum))

		- KOS		+ KOS		<i>P</i>
		- MKFS (n=9)	+ MKFS (n=9)	- MKFS (n=9)	+ MKFS (n=9)	
Magen	D-Laktat	2,54 (0,00-21,81)	5,88 (0,00-34,99)	14,87 (0,00-39,96)	3,52 (0,00-39,05)	0,588
	L-Laktat	9,80 (2,10-37,13)	13,23 (1,66-41,59)	31,71 (1,68-60,40)	13,94 (0,91-39,73)	0,186
	Laktat <sup>1</sup>	14,62 (2,58-58,94)	19,11 (1,66-74,18)	48,62 (1,68-89,64)	16,76 (0,91-78,78)	0,325
Jejunum	D-Laktat	0,00 (0,00-0,66)	0,03 (0,00-6,79)	0,12 (0,00-4,13)	0,03 (0,00-3,96)	0,701
	L-Laktat	16,57 (10,24-23,12)	17,02 (8,66-29,54)	23,07 (6,83-35,46)	18,22 (8,98-35,74)	0,935
	Laktat <sup>1</sup>	16,57 (10,24-23,12)	17,02 (8,66-33,76)	23,15 (6,83-39,59)	18,22 (9,01-35,81)	0,923
Ileum	D-Laktat	0,00 (0,00-46,26)	0,74 (0,00-83,61)	8,51 (0,00-48,93)	0,10 (0,00-38,27)	0,521
	L-Laktat	22,56 (3,80-92,20)	13,86 (7,20-126,40)	21,92 (4,30-79,90)	13,83 (4,20-107,20)	0,914
	Laktat <sup>1</sup>	22,56 (3,80-138,50)	16,27 (7,31-209,97)	27,44 (4,30-128,80)	14,31 (4,17-145,46)	0,768
Kolon	D-Laktat	1,36 (0,00-12,60)	0,54 (0,09-11,90)	0,37 (0,00-19,10)	0,68 (0,00-17,45)	0,879
	L-Laktat	1,51 (0,00-12,24)	0,72 (0,26-13,48)	0,41 (0,00-19,31)	0,80 (0,00-17,46)	0,759
	Laktat <sup>1</sup>	2,87 (0,00-24,84)	0,61 (0,00-25,38)	0,87 (0,00-38,41)	1,62 (0,00-34,91)	0,852

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); *P* = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; <sup>1</sup>Gesamtlaktat

**Tabelle 38:** Konzentration des Ammoniums (mmol/kg (uS)) der Digesta der untersuchten Lokalisationen des GI-Trakts (Mittelwert und Standardabweichung)

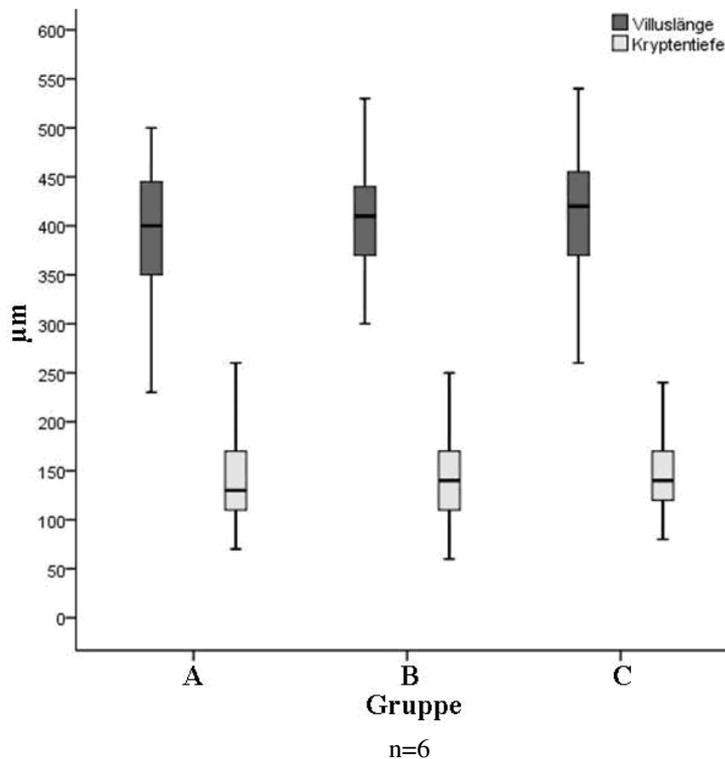
	<b>- KOS</b>		<b>+ KOS</b>		KOS	<b>P</b>	
	<b>- MKFS</b>	<b>+ MKFS</b>	<b>- MKFS</b>	<b>+ MKFS</b>		<b>MKFS</b>	<b>MKFS x KOS</b>
	(n=9)	(n=9)	(n=9)	(n=9)			
Magen	1,71 ± 0,60	1,97 ± 0,59	2,20 ± 0,86	1,99 ± 0,86	0,258	0,905	0,309
Jejunum	3,31 ± 1,08	2,79 ± 0,83	3,26 ± 1,38	2,95 ± 0,88	0,875	0,211	0,756
Ileum	1,98 ± 1,01	2,17 ± 0,67	2,41 ± 0,95	2,19 ± 1,05	0,443	0,961	0,497
Kolon	9,99 ± 5,4	8,16 ± 4,59	11,09 ± 7,70	13,40 ± 10,21	0,168	0,918	0,369

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure);  
P = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle

#### **4.7 Messung von Darmzottenlänge und Kryptentiefe im mittleren Jejunum**

##### **Darmzottenlänge und Kryptentiefe**

Die Messung der Villuslänge und Kryptentiefe an den Gewebeschnitten des mittleren Jejunums ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. In Abbildung 4 sind die jeweiligen Medianwerte sowie das Maximum und Minimum der Gruppen A (Kontrollgruppe), B (KOS) und C (KOS und MKFS) in Boxplots dargestellt (die zentralen 50 % der Daten befinden sich in der Box, in der der Median durch eine horizontale Linie gekennzeichnet ist).



**Abbildung 4:** Darstellung der gemessenen Villuslänge und Kryptentiefe an den Gewebeschnitten des mittleren Jejunums

Gruppe A = Kontrollgruppe

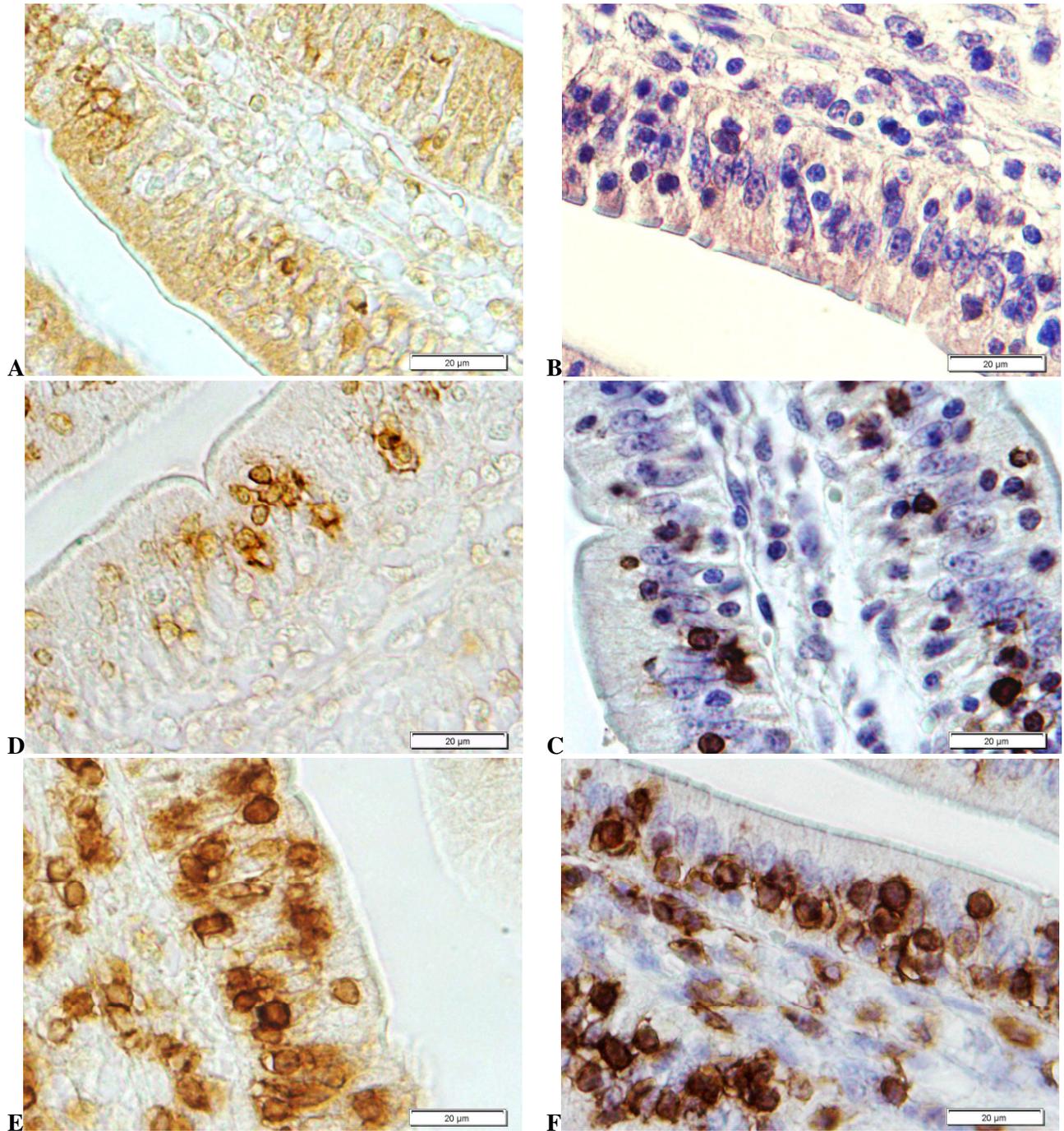
Gruppe B = KOS (Fumar- und Milchsäure)

Gruppe C = KOS und MKFS (Capryl- und Caprinsäure)

Median (Minimum-Maximum)

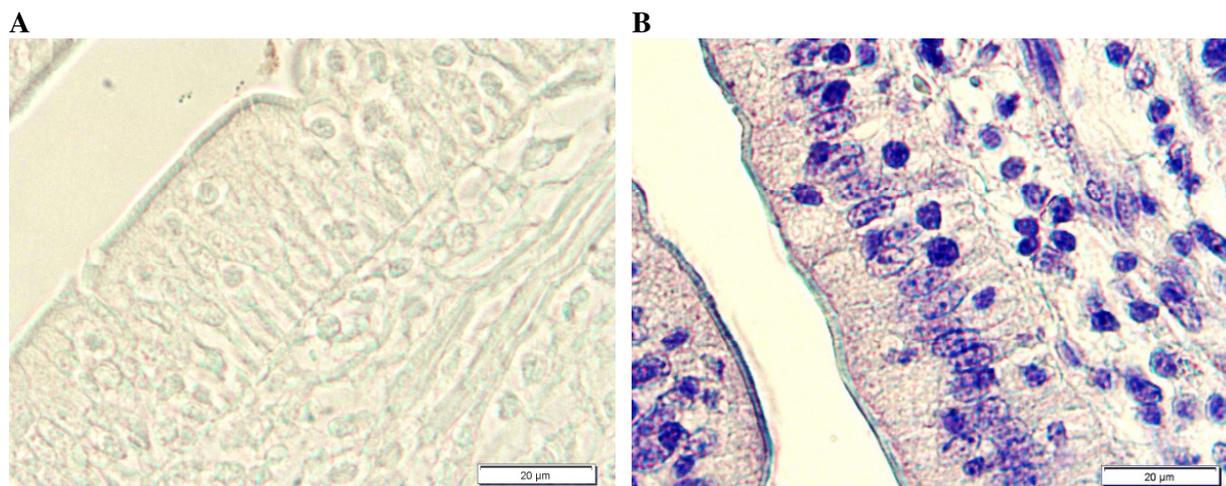
#### **4.8 Quantifizierung CD3<sup>+</sup>-IEL im mittleren Jejunum mittels Immunhistochemie**

Die Durchführung der Zählung CD3<sup>+</sup> markierter IEL erfolgte an formalinfixierten und mit Zitratpuffer vorbehandelten Gewebeschnitten, da sich dies als effektivste Vorbereitung auf das mit dem CD3- spezifischen Primärantikörper PPT3 durchgeführte immunhistochemische Nachweisverfahren erwies (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Beispiel für immunhistochemisch (braun) gefärbte  $CD3^+$ -IEL im mittleren Jejunum (Kontrolltier), mit (rechts) und ohne (links) Gegenfärbung (LM, x 400):  
A, B: ohne Vorbehandlung; C, D: mit Pronase (30 Min.); E, F: mit Zitratpuffer (30 Min.); die Maßeinheit entspricht 20 µm

Die Ergebnisse der Isotypenkontrolle des Primärantikörpers PPT3, um die spezifische Bindung des Primärantikörpers zu überprüfen, erlaubten den Ausschluss falsch positiver Ergebnisse (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Isotypenkontrolle des Primärantikörpers PPT3 im mittleren Jejunum (Kontrolltier), ohne (A) und mit (B) Gegenfärbung (LM, x 400)

#### Quantifizierung CD3<sup>+</sup> markierter IEL aus dem mittleren Jejunum

Die mittlere Anzahl der CD3<sup>+</sup> markierten IEL der Kontrollgruppe, der Gruppe KOS und der Gruppe KOS und MKFS (mittelkettige Fettsäuren) sind in Tabelle 39 aufgezeigt. Beide Zählungen und auch die Gesamtauswertung (Mittelwert aus beiden Blindbestimmungen) ergaben für die Versuchsgruppe KOS und MKFS, verglichen mit Gruppe B (KOS), eine vergleichsweise geringere Anzahl an CD3<sup>+</sup>-IEL. Dies konnte jedoch nicht statistisch abgesichert werden.

**Tabelle 39:** Anzahl CD3<sup>+</sup>-IEL pro 100 Enterozyten im mittleren Jejunum der Ferkel der drei Versuchsgruppen (Mittelwert und Standardabweichung)

	Gruppe (n=6)			<i>P</i>
	Kontrolle	KOS	KOS+MKFS	
CD3 <sup>+</sup> -IEL <sup>1</sup>	63,30 ± 4,99	61,60 ± 4,54	57,30 ± 6,13	0,160
CD3 <sup>+</sup> -IEL <sup>2</sup>	57,43 ± 7,11	61,43 ± 5,25	60,00 ± 9,15	0,642
CD3 <sup>+</sup> -IEL Gesamt	60,37 ± 6,61	61,52 ± 4,68	58,65 ± 7,56	0,549

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); *P* = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; IEL = intraepitheliale Lymphozyten; CD = Cluster of Differentiation: Zusammenfassung monoklonaler Antikörper, die dasselbe Zelloberflächenmolekül erkennen. <sup>1,2</sup> Mittelwert aus beiden Blindbestimmungen

#### 4.9 Quantifizierung IEL im mittleren Jejunum mittels Durchflusszytometrie

Der Anteil (%) der exprimierten Oberflächenmoleküle auf den IEL des mittleren Jejunums der Ferkel der Kontrollgruppe, der Gruppe KOS und der kombinierten Fütterungsvariante KOS und MKFS bezogen auf die gesamte Lymphozytenfraktion im Epithel bzw. die Anzahl pro 100 Enterozyten wurde in Tabelle 40 bzw. Tabelle 41 dargestellt. Die unterschiedliche Probenanzahl lässt sich dadurch erklären, dass für den Nachweis jeder Subpopulation nicht bei jedem Tier genügend Zellen gewonnen werden konnten bzw. der Primärantikörper (PPT3)

zum Nachweis CD3<sup>+</sup>-IEL lediglich bei den Tieren der zweiten und dritten Versuchsreihe eingesetzt werden konnte. Die Anzahl der CD3<sup>+</sup>-IEL zeigte keine signifikanten Differenzen zwischen den Fütterungsgruppen. Deutlich wurde jedoch, dass die mittlere Anzahl bei den Tieren der KOS-Gruppe über derjenigen der Kontrollgruppe lag. Der prozentuale Anteil der CD2<sup>+</sup>/γδ<sup>+</sup> markierten IEL der KOS-Gruppe lag im Mittel, verglichen mit der Kontrolle und der Gruppe KOS und MKFS, signifikant (p = 0,027) höher. Der Bezug der einzelnen Lymphozytenpopulationen pro 100 Enterozyten (absolute Anzahl) zeigte keine weiteren Gruppenunterschiede. In Tabelle 42 befindet sich auf Grundlage der nachgewiesenen CD-Oberflächenmoleküle eine Einteilung IEL-Populationen anhand der Kalkulation pro 100 Enterozyten.

**Tabelle 40:** Anteile der IEL im mittleren Jejunum der Ferkel der drei Versuchsgruppen. Angaben in % der detektierten Lymphozyten im Epithel (Mittelwert und Standardabweichung)

	Gruppe			P
	Kontrolle	KOS	KOS+MKFS	
CD3 <sup>+</sup> -IEL	72,03 ± 8,73 (n=6)	82,22 ± 6,89 (n=6)	77,85 ± 8,10 (n=6)	0,117
CD8β <sup>+</sup> -IEL	46,35 ± 8,26 (n=8)	53,98 ± 8,42 (n=9)	51,51 ± 13,15 (n=9)	0,318
CD2 <sup>+</sup> /CD5 <sup>-</sup> -IEL	33,33 ± 9,64 (n=8)	23,18 ± 9,18 (n=9)	27,58 ± 7,61 (n=9)	0,081
CD16 <sup>+</sup> -IEL	28,72 ± 8,85 (n=8)	27,50 ± 6,87 (n=9)	28,36 ± 5,85 (n=9)	0,905
CD2 <sup>+</sup> /γδ <sup>+</sup> -IEL	22,62 ± 4,36 (n=7)	20,72 ± 5,50 (n=9)	18,99 ± 6,28 (n=9)	0,440
CD2 <sup>-</sup> /γδ <sup>+</sup> -IEL	0,63 ± 0,30 <sup>b</sup> (n=8)	1,09 ± 0,54 <sup>a</sup> (n=9)	0,59 ± 0,31 <sup>b</sup> (n=9)	0,027

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); P = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; IEL = intraepitheliale Lymphozyten; CD = cluster of differentiation: Zusammenfassung monoklonaler Antikörper, die dasselbe Zelloberflächenmolekül erkennen. Unterschiedliche Indizes (a,b) innerhalb einer Reihe geben signifikante Unterschiede an (p<0,05).

**Tabelle 41:** Anteile der IEL im mittleren Jejunum der Ferkel der drei Versuchsgruppen pro 100 Enterozyten (Mittelwert und Standardabweichung)

	Gruppe			P
	Kontrolle (n=4)	KOS (n=3)	KOS+MKFS (n=4)	
CD3 <sup>+</sup> -IEL <sup>1</sup>	60,38 ± 6,26	60,27 ± 5,69	58,03 ± 7,95	0,867
CD8β <sup>+</sup> -IEL	36,16 ± 7,77	41,43 ± 5,09	42,29 ± 6,77	0,434
CD2 <sup>+</sup> /CD5 <sup>-</sup> -IEL	28,01 ± 7,64	15,37 ± 9,03	20,25 ± 9,46	0,211
CD16 <sup>+</sup> -IEL	24,97 ± 4,92	17,77 ± 6,74	20,69 ± 7,56	0,377
CD2 <sup>+</sup> /γδ <sup>+</sup> -IEL	17,81 ± 3,70	12,35 ± 4,42	11,35 ± 5,59	0,176
CD2 <sup>-</sup> /γδ <sup>+</sup> -IEL	0,49 ± 0,29	0,69 ± 0,33	0,38 ± 0,18	0,406

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); P = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle; IEL = intraepitheliale Lymphozyten; CD = cluster of differentiation: Zusammenfassung monoklonaler Antikörper, die dasselbe Zelloberflächenmolekül erkennen. <sup>1</sup>Die mittels Immunhistochemie detektierte Gesamtanzahl (Mittelwert aus beiden Blindbestimmungen) CD3<sup>+</sup> markierter IEL.

**Tabelle 42:** Einteilung der im Epithel vorkommenden IEL-Population anhand der in dieser Arbeit nachgewiesenen CD-Moleküle und Kalkulation pro 100 Enterozyten (absolute Werte) am Beispiel der Kontrollgruppe

CD-Antigen	Lymphozyten, die das Antigen exprimieren	Anteil der IEL-Populationen pro 100 Enterozyten
CD3 <sup>+</sup> / CD8 <sub>αβ</sub> -IEL	Zytotoxische T-Zellen (MHC I restringiert)	36,16
CD2 <sup>+</sup> / γδ -IEL	Klassische γδ-T-Zellen	17,81
CD2 <sup>-</sup> / γδ -IEL	Nicht klassische γδ-T-Zellen	< 1
CD2 <sup>+</sup> /CD5 <sup>-</sup> / CD16 <sup>+</sup> -IEL	NK-Zellen	28,01

CD = cluster of differentiation: Zusammenfassung monoklonaler Antikörper, die dasselbe Zelloberflächenmolekül erkennen. IEL = intraepitheliale Lymphozyten; NK = natürliche Killerzellen

## **5. Diskussion**

### **5.1 Hintergrund der Arbeit und Versuchsziele**

Die Zeit nach dem Absetzen stellt für Ferkel eine kritische Phase dar. Gastrointestinale Erkrankungen in Verbindung mit einer geringeren biologischen Leistung zu Beginn der Aufzuchtphase führen zu gravierenden ökonomischen Verlusten und stellen ein Tierschutzproblem dar. MKFS und KOS können in der Ernährung von Absetzferkeln eine schnell verwertbare Energiequelle darstellen, aber auch aufgrund ihrer möglichen Wirkungen auf die intestinale Mikrobiota bzw. auf darmmorphologische Strukturen und auf das darmassoziierte Immunsystem von besonderer Bedeutung sein.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollte einerseits überprüft werden, ob eine kombinierte Fütterung der mittelkettigen Fettsäuren Capryl- und Caprinsäure mit kurzkettigen organischen Säuren (Fumar- und Milchsäure) an Absetzferkel über eine pH-Wert-Absenkung im vorderen Verdauungstrakt eine antibakterielle Wirkung mittelkettiger Fettsäuren ermöglicht. Andererseits sollte durch die Erhebung der Länge der Dünndarmzotten und Kryptentiefe bzw. durch die Quantifizierung intraepithelialer Lymphozyten Effekte von mittelkettigen Fettsäuren und kurzkettigen organischen Säuren auf die Dünndarmschleimhaut und auf das lokale darmassoziierte Immunsystem detektiert werden. Interaktionen mit verdauungsphysiologischen Vorgängen wurden außerdem berücksichtigt.

### **5.2 Bewertung des Studiendesigns und der Versuchsdurchführung**

#### **5.2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Am Tag der Einstellung in den Versuchsstall wurden die verwendeten Ferkel mit einem Alter von  $25 \pm 1$  Tagen im Erzeugerbetrieb abgesetzt. Die Tiere wurden aus einem salmonellenfreien Bestand zugekauft. Da nicht genügend weibliche Tiere zur Verfügung standen und um die Ergebnisse der Untersuchungen besser vergleichen zu können, wurden nur männliche kastrierte Ferkel für alle drei konsekutiven Versuchsreihen eingesetzt. Die Haltung erfolgte am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin, in zwei gleich strukturierten Stallräumen in Flatdeckabteilen, wobei die Einstalltemperatur  $28^{\circ}\text{C}$  betrug. Die Luftfeuchte betrug 65 % und ein Lichtprogramm gewährleistete eine 16stündige Licht- und 8stündige Dunkelphase, so dass gegebene Haltungsbedingungen nicht differierten und sich nicht auf die Ergebnisse der Untersuchungen auswirken konnten. Um einen möglichen Sauenfaktor auf die erhobenen Parameter zu minimieren, stammten die Ferkel von 15 unterschiedlichen Sauen des gleichen Betriebes. In allen Versuchsgruppen wurden, aus tierschutzrelevanten Gründen, zwei Ferkel in einer Bucht zusammengehalten. Es wurde beachtet, dass nur Ferkel von unterschiedlichen Sauen zusammengehalten wurden.

#### **5.2.2 Fütterungsgruppen und Studiendesign**

Am Tag der Einstellung wurden die Versuchsferkel zufällig auf vier Fütterungsgruppen aufgeteilt. Für die Vergleichbarkeit der drei Versuchsdurchgänge entstammten alle Diäten aus einer Grundmischung. Um die statistische Aussage der Ergebnisse zu erhöhen, erfolgte die Auswahl eines zweifaktoriellen Studiendesigns. Die Kontrollgruppe erhielt ein Ferkelaufzuchtfutter nach Empfehlungen der GfE (2006). Der Versuchsfuttermischung der Gruppe KOS wurde 1,05 % eines Produktes (71 % Säure und 29 % Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ )), welchem Fumar- und Milchsäure zugesetzt wurde. Der Versuchsgruppe KOS und MKFS wurde zusätzlich 0,3 % eines Produktes (50 % MKFS und 50 %  $\text{SiO}_2$ , welches Caprylsäure (C8:0) und Caprinsäure (C10:0) enthielt, beigefügt. Das Wirkungsoptimum für Fumarsäure soll in einem Bereich von 1,5-2 % liegen (Kirchgessner und Roth, 1975). Jedoch ist bei einer

Erhöhung des Säureanteils, vermutlich durch den Verlust der Schmackhaftigkeit, in der Ration häufig ein Rückgang des Futtermittelsverzehrs zu beobachten (Thacker et al., 1980; Edmonds et al., 1985; Falkowski und Aherne, 1984; Giesting und Easter, 1985; Radecki et al., 1988). Freie MKFS führen ebenfalls aufgrund ihres ziegenartigen Eigengeruchs häufig zu einer verringerten Futteraufnahme (Odle et al., 1991 a, b; Decuyere und Dierick, 2003), insofern konnte die Konzentration nicht höher als 0,15 % (je 0,75 g/kg Capryl- und Caprinsäure) gewählt werden (Angaben des Herstellers). Die Ferkel der Versuchsgruppe MKFS erhielten ebenfalls Capryl- und Caprinsäure, dieser Futtermischung wurde außerdem 0,05 % eines unbekanntes rohfaserhaltigen Produkts zugesetzt, wobei davon ausgegangen wird, dass dieses aufgrund der geringen Konzentration keinen Einfluss auf die erfassten Parameter hat. Mögliche Effekte des Produktes auf die Ergebnisse der Untersuchungsparameter kann aufgrund der unbekanntes Rohfaserquelle im Folgenden nicht diskutiert werden.

### **5.2.3 Versuchsdurchführung**

Da die Ferkel im Erzeugerbetrieb die Möglichkeit hatten, Beifutter aufzunehmen und um etwaige Einflüsse zu kompensieren, erstreckte sich die Fütterungsphase über 28 Tage, wobei in den ersten drei Wochen die Fütterung *ad libitum* erfolgte. Um die Tiere für die Sektionstage vorzubereiten, wurde in der vierten Woche restriktiv gefüttert. Einerseits ermöglichte dies an den Sektionstagen die Füllung des Gastrointestinaltrakts, andererseits konnte die Vergleichbarkeit der Digestaparameter, insbesondere die der Verdaulichkeitsanalysen zwischen den Gruppen und Tieren, gewährleistet werden. Der Versuch erfolgte in drei aufeinanderfolgenden konsekutiven Versuchsreihen. Die Abstände zwischen den einzelnen Durchgängen betragen, um klimatische Auswirkungen auf die Ergebnisse möglichst gering zu halten, maximal drei Wochen. Die Tötung am Versuchsende erfolgte an drei Folgetagen, wobei an jedem Tag pro Gruppe ein Ferkel euthanasiert wurde. Die morgendliche Fütterung am jeweiligen Tag wurde so organisiert, dass die Zeitspanne vom Zugang zum Futter bis zur Probengewinnung für jedes Ferkel ca. drei Stunden betrug. Die Tötungszeitpunkte in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit variierten zwischen den drei Versuchsreihen, um die Vergleichbarkeit, insbesondere der postprandialen pH-Werte, zu ermöglichen.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 Einflüsse von MKFS und KOS auf verdauungsphysiologische Parameter**

#### Einflüsse auf die zootechnischen Parameter

Die Erhebung der Leistungsparameter Futteraufnahme und Lebendmasse erfolgte wöchentlich. Um Ungenauigkeiten in der Futterrückwaage so gering wie möglich zu halten, wurde unter jeden Futtertrog ein Metallblech verbracht. Die Reste wurden bei der Rückwaage miteinbezogen. Die individuelle Lebendmasse wurde wöchentlich morgens vor der Fütterung ermittelt, wobei sich die Gewichte während der ersten drei *ad libitum*-Versuchswochen auf nicht nüchterne Tiere bezog, da bedingt durch die Art der Fütterung, der Trog zu jeder Zeit Futter enthielt. Bei der Bewertung der Modulation der Leistungsdaten durch die Futterzusatzstoffe ist die Zeitspanne der Erhebungen kritisch zu betrachten. Die Fütterung erfolgte in den ersten drei Wochen *ad libitum* sowie in der letzten Woche restriktiv. Die erste Versuchswoche lässt als Adaptionsphase keine eindeutige leistungsbezogene Aussage, so dass die *ad libitum*-Fütterungszeit vermutlich zu kurz gewählt wurde.

Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit begannen die Ferkel bereits am Tag der Einstellung bzw. zu Beginn des ersten Versuchstages mit der Futteraufnahme. Bereits nach Ende der ersten Fütterungswoche konnte eine Zunahme der Lebendmasse verzeichnet werden.

Eine häufig in der ersten Woche nach dem Absetzen auftretende Futtermittelverweigerung, gepaart mit einer Minderung der Lebendmassezunahme (Bruinix et al., 2001; Le Dividich und Sève, 2000; Zabielski et al., 2008), konnte insofern nicht beobachtet werden. Dies lag vermutlich teilweise an der praktizierten Beifütterung der Saugferkel im Herkunftsbetrieb, da sich die Tiere zumindest auf die neue Textur eines Aufzuchtfeeders einstellen konnten. Da die Ferkel bei Einstellung in den Versuchsstall wieder mit einem neuen Futter konfrontiert wurden sowie zuvor der Belastung eines Transports ausgesetzt wurden, kann die nahezu unverzügliche Futteraufnahme nach Einstellung ebenso durch eine hohe Schmackhaftigkeit des Versuchsfutters begründet sein. Da nach Zusatz KOS und MKFS häufig ein Rückgang des Futterverzehrs zu verzeichnen war (siehe Punkt 5.2.2), kann davon ausgegangen werden, dass die Auswahl der Konzentrationsstufe für die Futterzusatzstoffe im Toleranzbereich der Tiere lag.

Nach Abschluss der Adaptionszeit an das neue Futter wurde ein signifikanter Einfluss der MKFS auf die erhobenen zotechnischen Parameter deutlich. In der dritten Versuchswoche erzielte die Gruppe MKFS die höchste tägliche Lebendmassezunahme, sie lag signifikant über derjenigen der Kontrollgruppe und Versuchsgruppe KOS. Die kombinierte Fütterung von kurzkettigen organischen Säuren und MKFS erbrachte in gleicher Versuchswoche lediglich im Vergleich zur Gruppe KOS eine signifikante bzw. verglichen mit der Kontrollgruppe eine tendenzielle Steigerung der täglichen Lebendmassezunahme. In der vierten restriktiven Fütterungswoche nivellierten sich die erzielten Ergebnisse aus der dritten Versuchswoche. Dies kann wahrscheinlich durch die restriktive Fütterungsweise begründet werden. Es könnte auch aufgrund dieser Ergebnisse der Einsatz MKFS während der akuten Phase nach dem Absetzen bzw. schon als Beifütterung von Saugferkeln sinnvoll erscheinen.

Untersuchungen zum Einsatz MKFS in der Fütterung von Absetzferkeln ergaben Ähnliches. Die kombinierte Gabe von MK-TG mit verschiedenen Lipasen bei Absetzferkeln führte zu einer Erhöhung der täglichen Körpermassenzunahme um 10% und zu einer Absenkung des Futteraufwandes um 3% (Dierick et al., 2002 b). Bei der Überprüfung verschiedener Fettquellen (MK-TG, Sojaöl und tierisches Fett) auf die Lebendmassezunahme und Futteraufnahme wurde zusätzlich deutlich, dass die Fütterung von MK-TG innerhalb der ersten 14 Tage nach dem Absetzen die Lebendmassezunahme steigern und den Futteraufwand verbessern konnte (Dove et al., 1993). Im Gegensatz dazu erhöhte sich in vorliegender Studie die Futteraufnahme nur tendenziell durch den Zusatz MKFS innerhalb der dritten Versuchswoche, der Futteraufwand blieb jedoch unberührt, so dass die Zunahme der Lebendmasse in gleicher Woche nicht ausschließlich über eine Erhöhung der Schmackhaftigkeit zu erklären ist.

Der Zusatz von MKFS beeinflusste die scheinbare präcaecale Verdaulichkeit des Rohfetts signifikant ( $p = 0,035$ ). Die mittlere prozentuale präcaecale Verdaulichkeit des Rohfetts der Gruppe KOS und MKFS lag dabei tendenziell unter derjenigen der Kontrollgruppe, wobei der geringere Probenumfang für die Bestimmung der präcaecalen Verdaulichkeit des Rohfetts vermutlich eine Signifikanz verhinderte. MKFS stellen, verglichen mit langkettigen LKFS, eine für den Organismus schnell verfügbare Energiequelle dar. Der Hauptteil freier MKFS wird bereits im vorderen GI-Trakt aus MK-TG hydrolytisch gespalten und gelangt durch Bindung an Serumalbumin direkt zur Leber (Bloch, 1974; Bach und Babayan, 1982; Guillot et al., 1993; 1994) und kann direkt über die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation zur Energiegewinnung genutzt (Wojtczak und Schonfeld, 1993; Turner et al., 2009). Die auch bei neugeborenen Ferkeln nachgewiesene effizientere energetische Ausnutzung von MKFS, verglichen mit LKFS (Odle et al., 1989), könnte auch die in diesem Versuch vorliegende geringere präcaecale Verdaulichkeit des Rohfetts erklären. Die Vorteile der energetischen Umsetzung MKFS könnte auch die Erhöhung der täglichen Zunahmen der Tiere innerhalb der dritten Versuchswoche teilweise erklären, allerdings ist die aufgenommene Menge so gering, dass andere Faktoren eine Rolle gespielt haben dürften.

Die mit dem Absetzen beobachteten strukturellen und funktionellen Wandlungen im Dünndarm, in der akuten Phase mitunter geprägt durch die massive Reduktion der Zottenhöhe und Enzymaktivität, gelten hinsichtlich der Tiergesundheit durch die Abnahme der Schleimhautintegrität als möglicher Wegbereiter für die Manifestierung schwerwiegender Durchfallerkrankung in Verbindung mit fehlenden Zuwachsraten nach dem Absetzen (Cera et al., 1988; Nabuurs et al., 1995; Pluske et al., 1997; Zabielski et al., 2008). MKFS können auch direkt von den Enterozyten als Energiequelle genutzt werden und sich insofern positiv auf die Regenerationszeit der Dünndarmzotten nach dem Absetzen auswirken (Guillot et al., 1993; Greenberger et al., 1965). Bei Absetzferkeln führte die Fütterung MKFS durch Zusatz von *Cuphea*-Samen (*C. lanceolata* und *C. ignea*) und Lipase zu einer signifikanten Steigerung der Zottenlänge im distalen Bereich des Dünndarms, gepaart mit einer geringeren Kryptentiefe entlang des gesamten Dünndarms und einem größeren Verhältnis von Villuslänge/Kryptentiefe in beiden Abschnitten (Dierick et al., 2003).

Ähnliches zeigten auch die Ergebnisse der morphometrischen Analysen in dieser Arbeit, wobei die längsten Dünndarmzotten in Verbindung mit den tiefsten Krypten die Tiere der Gruppe MKFS und KOS aufwiesen, verglichen mit der Kontrollgruppe und Gruppe KOS. Eine Vertiefung der Krypten soll aus einer Kryptenzellproliferation resultieren; sie soll ab dem dritten Tag nach dem Absetzen der verstärkten Neubildung von Enterozyten dienen und die regenerative Zunahme der Villuslänge ermöglichen (van Dijk et al., 2001; Hedemann et al., 2003; Miller und Slade, 2003; Zabielski et al., 2008). Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigten eine potenzielle fördernde Wirkung der MKFS auf die Darmmorphologie von Absetzferkeln, welche die Steigerung der täglichen Zunahme der dritten Förderungswoche zumindest teilweise erklären könnte. Aufgrund der schlecht erhaltenen Darmmorphologie, vermutlich durch die Manipulation während der Sektion, wurden lediglich sechs Tiere in die Auswertung miteinbezogen, so dass keine statistisch absicherbaren Gruppenunterschiede nachgewiesen wurden. Die Messung der Villuslänge und Kryptentiefe am mittleren Jejunum erfolgte in Kombination mit der Quantifizierung der intraepithelialen Lymphozyten mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie. Durch die gegebene zeitintensive Aufarbeitung der Zellen für die durchflusszytometrischen Nachweise während der Sektionstage wurden die Untersuchungen lediglich für die Tiere der Kontrollgruppe sowie die Gruppen KOS sowie MKFS und KOS durchgeführt.

#### Einflüsse von MKFS und KOS auf die pH-Werte im GI-Trakt und Bedeutung für die Verdaulichkeit der Nährstoffe

Die Salzsäureproduktion ist bei Ferkeln bis zur 8. Lebenswoche nicht vollständig ausgebildet (Manners, 1976). In der Saugperiode liegen die postprandialen (ein bis drei Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme) pH-Werte im Magen in einem Bereich von 3,3 bis 3,9. In dieser Phase wird die Milchsäure (über die mikrobielle Fermentation des Milchzuckers) als hauptsächlichster azidierender Faktor angesehen (Schnabel et al. 1982). Beim Absetzferkel steigen die postprandialen pH-Werte auf bis zu 5,0 an und sinken erst innerhalb der 9. Lebenswoche, bedingt durch die zunehmende Salzsäureproduktionskapazität, wieder auf Werte unter 4,3 (Schnabel et al. 1982; Kamphues, 1988; Buchheit, 2009). Ein Mangel an Salzsäure bewirkt sowohl eine beschleunigte Magenentleerung als auch eine verkürzte Darmpassagezeit, beeinträchtigt die Verdauungsvorgänge und wird als wesentliche Ursache für Verdauungsstörungen und die damit verbundene geringere biologische Leistung der Ferkel angesehen (Roth und Kirchgessner, 1989 a, b; Leśniewska et al., 1998; Boudry et al., 2004; Bligney et al., 2005; Lallès et al., 2007). Eine unzureichende Durchsäuerung des Mageninhalts bedingt außerdem eine verminderte hydrolytische Spaltung von Nahrungsproteinen. Eine umfangreiche Proteolyse findet erst bei Magen pH-Werten unter 4,0 statt, wobei beim Schwein eine maximale Pepsinaktivität in einem Bereich von pH 1,8-2,8

und 3,5-3,8 nachgewiesen werden konnte (Taylor, 1959). Ein zu hoher pH-Wert im Magen gilt außerdem als Risikofaktor im Sinne einer verminderten Barrierewirkung gegen exogene Keime (Smith und Jones, 1963; Sangild et al., 2000). Kurzkettige organische Säuren und mittelkettige Fettsäuren können als Protonendonatoren fungieren und insofern vorliegende pH-Werte reduzieren und einem Salzsäuremangel möglicherweise entgegenwirken. In welchem Umfang dies gelingt, wird durch die Stärke einer Säure bestimmt. Über den pKs-Wert wird die Säurestärke definiert. Je kleiner der pKs-Wert, desto stärker die Säure (Schelhorn, 1951; Fieser und Fieser, 1972; Roth und Kirchgessner, 1989 a).

In vorliegender Untersuchung wurde der gastrale pH-Wert im Bereich des Magenausganges signifikant durch den Zusatz von MKFS moduliert. Die mittleren pH-Werte der Gruppe MKFS sowie MKFS und KOS lagen signifikant unter demjenigen der Gruppe KOS, bei Werten unter 3,0. Der pH-Wert aus der Digesta von Jejunum und Ileum der Gruppe MKFS war, verglichen mit der Kontrollgruppe, ebenfalls signifikant reduziert. Im Gegensatz zu den Erwartungen, hatte die im Magen erzielte Absenkung des pH-Wertes keinen Einfluss auf die Proteinverdaulichkeit. Weder die praecaecale, noch die Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins unterschieden sich zwischen den Gruppen.

Die Ergebnisse der vorliegenden pH-Wert-Messung lassen sich nicht über die pKs-Werte der zugesetzten Säuren begründen. Fumarsäure als zwei-protonige Säure besitzt zwei pKs-Werte (3,0 bzw. 4,4), Milchsäure lediglich einen pKs-Wert von 3,8 (Fieser und Fieser, 1972; Roth und Kirchgessner, 1989 a). Die eingesetzten MKFS Capryl- und Caprinsäure besitzen, verglichen mit Fumar- und Milchsäure, einen höheren pKs-Wert (4,89) (Beckett und Moffat, 1969; Hsiao und Siebert, 1999) und stellen folglich schwächere Säuren dar. Vermutlich wirkte die zeitliche Spanne zwischen der letzten Fütterungsaufnahme und dem Sektionszeitpunkt auf die analysierten pH-Werte ein und bedingt die hier dargelegten Unterschiede. Trotz der bereits beschriebenen Maßnahmen zur Vergleichbarkeit der Werte (Punkt 5.2.2) war es nicht möglich, die Tiere immer in exakt übereinstimmenden zeitlichen Abständen zu euthanasieren, da für den Übergang in eine tiefe Narkose für jedes Ferkel eine individuelle Zeit benötigt wurde.

### **5.3.2 Einflüsse von MKFS und KOS auf die gastrointestinale Mikrobiota unter besonderer Berücksichtigung der pH-Wert Absenkung im vorderen GI-Trakt**

Die Bewertung antibakterieller Effekt durch die Zulage MKFS und/oder KOS erfolgte anhand der Quantifizierung der Laktobazillen, der Enterobakterien sowie der vorkommenden *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren. Die bakteriellen Metaboliten D- und L-Laktat, Ammonium sowie kurzkettige Fettsäuren wurden zur Betrachtung der Fermentationsvorgänge zusätzlich bestimmt. Aus organisatorischen Gründen erfolgte die Quantifizierung der aufgeführten Bakterien nur aus der Digesta von je sechs Tieren, diese wurden randomisiert ausgewählt.

#### **Effekte von MKFS und KOS auf die quantifizierte Zellzahl der Laktobazillen und Enterobakterien**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Real-Time-PCR (qPCR), auf eine zusätzliche Kultivierung wurde verzichtet, da die qPCR eine schnellere und gleichzeitig sichere Methode zur Quantifizierung von Bakterien darstellt.

Die Quantifizierung der Laktobazillen ergab für keinen der untersuchten Darmabschnitte signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen. Die Untersuchung der Enterobakterien aus der Digesta des Magens ergab einen gesicherten Effekt ( $p = 0,019$ ) durch die Faktoren KOS bzw. einen tendenziellen ( $p = 0,052$ ) durch MKFS auf die mittlere Zellzahl dieser Bakteriengruppen. Im Magen lag die Anzahl an Enterobakterien in der Versuchsgruppe mit dem alleinigen Zusatz KOS tendenziell unter derjenigen der Kontrollgruppe bzw.

signifikant unter der Zellzahl der Versuchsgruppe, welche MKFS als alleinigen Zusatz während der Versuchsphase erhielt. Im Jejunum und Kolon wurden ähnliche Verschiebungen deutlich. Im Jejunum wirkte sich der Zusatz MKFS bzw. MKFS und KOS signifikant ( $p = 0,042$  bzw.  $p = 0,049$ ) auf die mittlere Anzahl der Enterobakterien aus, wobei der mittlere Bakteriengehalt im Kolon lediglich durch MKFS beeinflusst wurde ( $p = 0,025$ ). Die Anzahl der Enterobakterien der MKFS-Gruppe befand sich im Jejunum signifikant über derjenigen der anderen Gruppen. Die Tiere der KOS-Gruppe wiesen im Mittel in der Digesta des Kolons die geringste Zellzahl an Enterobakterien auf, sie lag signifikant unter derjenigen der MKFS-Gruppe bzw. tendenziell unter der Zellzahl der Fütterungsvariante KOS und MKFS.

Die Ergebnisse bestätigen zumindest den in der Literatur beschriebenen antibakteriellen Effekt für kurzkettige organische Säuren. *In vitro* konnten durch Bestimmung der Keimzahl und Messung bakterieller Metaboliten mitunter für Milch- und Fumarsäure eine pH-abhängige antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden (Knarreborg et al., 2002; Chaveerach, 2002; Boyen et al., 2008). Bei pH 3 und 4 war es möglich, durch Zusatz der Säuren eine signifikante Reduktion koliformer Keime, von Laktobazillen und *Campylobacter* spp. zu erreichen (Knarreborg, 2002; Chaveerach, 2002). *In vivo* führte die kombinierte Zulage von Ameisen- und Milchsäure zu einem günstigen Verhältnis zwischen Laktobazillen und koliformen Bakterien durch die Reduktion koliformer Bakterien, insbesondere im mittleren Dünndarm (Franco et al., 2005). Allerdings führte die Zulage von Fumarsäure *in vivo*, wie in vorliegender Studie, ebenfalls zu keiner Veränderung der Gesamtanzahl kultivierter Laktobazillen aus der Digesta des Magens, Jejunums, Kolons und Zäkums (Risley et al., 1992). In den eigenen Untersuchungen wurde lediglich die Anzahl der gesamten Enterobakterien bestimmt und keine Differenzierung dieser Bakteriengruppe durchgeführt, so dass an dieser Stelle nicht näher erläutert werden kann, welche Gattung durch KOS reduziert wurde und eine Bewertung hinsichtlich positiver oder negativer Auswirkung für die Ferkel nicht erfolgen kann.

Die hier nachgewiesene Erhöhung der Enterobakterien durch MKFS im GI-Trakt steht im Widerspruch zu den Ergebnissen verschiedener *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen: Die Kombination von Capryl- und Caprinsäure konnte unter Simulierung gastraler Bedingungen *in vitro* beim Erreichen einer sehr hohen Konzentration von 0,35 g MKFS / 100 g Medium (25 mM) bzw. 0,45 g / 100 g frische Digesta eine signifikante (> 10fache) Reduktion koliformer Keime bewirken. Konzentrationen unterhalb dieser Grenze wurden als unwirksam eingestuft (Dierick et al., 2002 a, b). Die Hemmung koliformer Keime und von *Salmonella* Typhimurium konnte auch an einem porzinen permanenten Zellkulturmodells unter Simulierung der im Zäkum vorherrschenden Verhältnisse erfolgreich getestet werden. Allerdings konnten diese Daten *in vivo* nicht reproduziert werden (Messens et al., 2010). *In vivo* konnte aber nach Zulage MK-TG in Kombination mit Lipasen bei Absetzferkeln ebenfalls eine signifikante Reduktion koliformer Keime in der Digesta von Magen und Duodenum erzielt werden (Dierick et al. 2002 b). Die Fütterung der MKFS enthaltenden *Cuphea*-Samen (*C. lanceolata* und *C. ignea*) und Lipase bei Absetzferkeln führte zu einer tendenziellen Reduktion der Gesamtkeimzahl koliformer Keime im proximalen Dünndarm, aber auch zu einer Erhöhung im Magen und distalen Dünndarm (Dierick et al., 2003). Der simultane Zusatz von umschichteter (gecoateter) Buttersäure und Caprylsäure im Futter (3,1 g / kg) abgesetzter Ferkel führte nach der gezielten Infektion mit *Salmonella* Typhimurium ( $7 \times 10^7$  KbE) zu einer geringeren fäkalen Ausscheidung des Erregers bei gleichzeitiger Hemmung der intestinalen Kolonisation (Boyen et al., 2008).

Freie Fettsäuren führen aufgrund ihres ziegenartigen Eigengeruchs häufig zu einer verringerten Futteraufnahme (Odle et al., 1991 a, b; Decupere und Dierick, 2003), insofern konnte die Konzentrationsstufe nicht höher als insgesamt 0,15 % (je 0,75 g / kg Capryl- und Caprinsäure) gewählt werden (Angaben des Herstellers). Die von Dierick et al. (2002 a, b) für Capryl- und Caprinsäure postulierten antibakteriell wirksamen Konzentrationen konnten

insofern bereits im Futter nicht erreicht werden. Die Bestimmung MKFS aus der Digesta verdeutlichte außerdem einen rapide sinkenden Konzentrationsverlauf bereits bei Übergang in das Duodenum. Aus dem Mageninhalt der Tiere der Gruppe MKFS konnten insgesamt 0,41 g / uS bzw. 0,37 g / uS mittelkettige Fettsäuren aus dem Magen der Tiere der Gruppe MKFS und KOS ermittelt werden. Bei den Tieren beider Gruppen lag die Gesamtkonzentration beider Fettsäuren im Anfangsabschnitt des Duodenums (Pars cranialis) unter 0,1 g / kg uS. In der Arbeit von Buchheit (2009) konnte die Umschichtung („Coating“) der Fettsäuren zwar tendenziell die Futteraufnahme erhöhen, es konnte jedoch die rasche Resorption der Fettsäuren nicht verhindern, insofern wurde in vorliegender Arbeit auf ein Coating verzichtet.

*In vitro*-Untersuchungen konnten eine negative Korrelation zwischen einem steigendem pH-Wert und der Wirksamkeit der MKFS aufzeigen, so dass die antibakterielle Wirkung möglicherweise auch *in vivo* abhängig vom Dissoziationsgrad der Fettsäuren ist. Der undissoziierten Form wird generell eine stärkere Wirkung zugesprochen (Hsiao und Siebert, 1999; Sun et al., 2002). Der pH-Wert des umgebenden Milieus kann insofern die Wirksamkeit von MKFS entscheidend beeinflussen (Eklund, 1983; Hsiao und Siebert, 1999; Sun et al., 2002). Bei neutralen pH-Werten liegen MKFS überwiegend in dissoziierter Form vor, erst bei Werten zwischen 3 und 6 kann das Gleichgewicht zugunsten der undissoziierten Form verschoben werden (Bach und Babayan, 1982; Greenberger und Skillmann, 1969; Odle et al., 1997; Dierick et al., 2002 a).

Durch die gleichzeitige Fütterung von KOS sollte, über die Modulation des Dissoziationsgrades der Fettsäuren, trotz der gering zugefügten Menge an MKFS, eine antibakterielle Wirkung ermöglicht werden. Die bereits beschriebenen reduzierten pH-Werte (siehe Punkt 5.3.1) sollten zumindest im vorderen Verdauungstrakt, aufgrund der anzunehmenden Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der undissoziierten Form der Fettsäuren, eine stärkere antibakterielle Wirkung erzeugen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen einer vom Dissoziationsgrad der MKFS abhängigen antibakteriellen Wirksamkeit. Durch den Zusatz organischer Säuren konnte die antibakterielle Wirksamkeit von MKFS nicht verstärkt werden.

#### Effekte auf die Exprimierung von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren

Da durch Kultivierung lediglich der Nachweis koliformer Keime gelingt, aber keine Aussage über eine Pathogenität getroffen werden kann, diente eine Multiplex PCR als qualitativer Nachweis (Screening-Methode) der vorkommenden *E. coli*- Pathogenitätsfaktoren. Diese Methode stellt eine schnelle und sensitive Screeningmethode zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Pathogenitätsfaktoren dar. Der qualitative Nachweis erfolgte im Kolon. Aufgrund der längeren Verweildauer der Digesta in diesem Abschnitt, verglichen mit derjenigen im Dünndarm, war von einer höheren Wahrscheinlichkeit auszugehen, die Pathogenitätsfaktoren nachzuweisen. Die vier am häufigsten detektierten Pathogenitätsfaktoren (est-II (STb), Stx2e (STx), Fas (987p) und fedA (F18ab)) wurden anschließend aus der Digesta des Kolons bzw. est-II und fedA zusätzlich aus dem Magen- und Ileuminhalt quantifiziert. Enterotoxische *E. coli*-Stämme (ETEC) gelten als Hauptverursacher der Kolidiarrhöe bei Absetzferkeln (Bilkei, 1996; Fairbrother et al., 2005; Nagy und Fekete, 2005; Casey und Bosworth, 2009). Häufig nachgewiesene Isolate exprimieren ein oder mehr als fünf verschiedene Adhäsine K88 (F4), K99 (F5), F41, 987P (F6) und F18 (F107/2134P) sowie hitzelabile (LT1 und LT2) und hitzestabile (STa und STb) Enterotoxine (Blanco et al., 1997; Nagy und Fekete, 1999, 2005). Das Enterotoxin STb gilt als das am häufigsten detektierte Enterotoxin bei an Durchfall erkrankten Saug- und Absetzferkeln (Moon et al., 1986; Blanco et al., 1997). Es ist zudem möglich, dass PWD auslösende ETEC-Stämme auch das Shigatoxin (Stx2e (STx)) bilden können und insofern

auch potenziell eine Kolienterotoxämie auslösen können (Nagy und Fekete, 1999). Die am häufigsten isolierten pathogenen *E. coli*-Stämme aus an Ödemkrankheit erkrankten Tieren zeigen die Bildung des Adhäsins F18 und des Shigatoxins (Stx2e) (Imberechts et al., 1992).

Bei der Quantifizierung der est-II-Amplifikate (STb) im Magen und Ileum lagen in beiden Abschnitten lediglich die Ergebnisse von je zwei Tiere der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe MKFS und KOS sowie bei fedA (F18ab) keines der Tiere über der Nachweisgrenze. Die statistische Auswertung erfolgte daher nur für die gemessenen Zellzahlen aus dem Kolon. Kurzkettige organische Säuren hatten auf die mittlere Zellzahl der est-II-, Stx2e- und Fas positiven *E. coli*-Stämme einen signifikanten Einfluss. Gruppenunterschiede konnte vermutlich aufgrund der geringen Probenanzahl nicht signifikant abgesichert werden, wobei die Anzahl der est-II exprimierenden *E. coli*-Stämme bei den Tieren der KOS-Gruppe im Mittel, verglichen mit der Kontrollgruppe und MKFS-Gruppe, tendenziell ( $p = 0,052$ ) reduziert wurde. Die mittlere Fas (987p)-Amplifikatanzahl der Gruppe KOS und MKFS lag unter derjenigen der Kontrollgruppe. Aufgrund der zu geringen Fallzahl für die Ermittlung der Anzahl fedA (F18ab)-positiver *E. coli*-Stämme konnten die Daten nicht statistisch ausgewertet werden.

Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen einerseits eine potenziell hemmende Wirkung organischer Säuren auf pathogene *E. coli*-Stämme, allerdings lassen die geringen Zellzahlen und die Probenanzahl keine statistische signifikante Aussage zu.

Weiterhin ist zu bemerken, dass die klinische Manifestierung einer PWD bzw. ED eine multifaktorielle Genese besitzt (Bilkei et al., 1996; Waldmann und Wendt, 2004). In allen drei durchgeführten Versuchsreihen konnten keine markanten Unterschiede hinsichtlich der gesundheitlichen Parameter und der Durchfallinzidenz zwischen den Gruppen ermittelt werden, so dass alleine der Nachweis dieser Pathogenitätsfaktoren in vorliegender Arbeit keinen Rückschluss auf die Entstehung dieser Krankheitsbilder zu lassen.

Im Gegensatz dazu konnte anhand eines Infektionsversuches mit pathogenen *E. coli*-Keimen bestätigt werden, dass der gleichzeitige Einsatz kurzkettiger organischer Säuren (Propionsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Apfelsäure, Zitronensäure, Fumarsäure) ETEC-bedingte Durchfälle erfolgreich kontrollieren kann. Verglichen mit der Kontrollgruppe konnte die Anzahl der Neuerkrankungen in einem Bestand signifikant gesenkt und auch eine Milderung des Schweregrads der Erkrankung erreicht werden (Tsiloyannis et al., 2001).

#### Einfluss von MKFS und KOS auf die analysierten bakteriellen Metaboliten

Zur Betrachtung der Fermentationsvorgänge wurden zusätzlich die bakteriellen Metaboliten D- und L-Laktat, Ammonium sowie kurzkettige flüchtige Fettsäuren bestimmt, wobei lediglich die Analyse der SCFA signifikante Unterschiede zeigte.

Kurzkettige Fettsäuren entstehen primär im Dickdarm durch die Fermentation unverdauter Kohlenhydrate, dabei entstehen zum größten Teil Essigsäure, Propionsäure sowie Buttersäure (James et al., 2003). Eine bakterielle Nutzung von Aminosäuren erfolgt insbesondere bei geringen Mengen an fermentierbaren Kohlenhydraten, infolgedessen entstehen vermehrt die verzweigten Fettsäuren iso-Butter- und iso-Valeriansäure (Blau et al., 2007; Lallès et al., 2007).

Der Zusatz MKFS beeinflusste in der vorliegenden Arbeit signifikant die bakteriellen Metaboliten in der Digesta des Jejunums, wobei die gemessene Gesamtkonzentration der kurzkettigen Fettsäuren in der Gruppe MKFS deutlich unter derjenigen der Gruppe KOS bzw. tendenziell unter derjenigen der Kontrollgruppe lag. Die Erhöhung der Enterobakterienanzahl der Gruppe MKFS im Jejunum bedeutete insofern nicht gleichermaßen eine gesteigerte bakterielle Stoffwechselaktivität. Im Kolon hingegen bewirke die Fütterung von KOS, im Vergleich zur Gruppe MKFS, eine abgesicherte ( $p = 0,023$ ) Minderung der Gesamtkonzentration SCFA und spiegelt vermutlich die geringere Anzahl an Enterobakterien

dieser Versuchsgruppe wider, wobei die Zusammensetzung der einzelnen SCFA konstant blieb.

### **5.3.3 Einflüsse von MKFS und KOS auf das lokale darmassoziierte Immunsystem im Dünndarm**

Eine intakte Schleimhautoberfläche gilt als wichtige Barriere gegenüber Infektionen, um ihre physiologischen Aufgaben zu erfüllen besteht aber eine gewisse Durchlässigkeit, die als potenzielle Eintrittspforte für pathogene Keime in den Körper bewertet werden kann (Kelly und Coutts, 2000; Bailey et al., 2005; Liebich, 2009; Murphy et al., 2009). Die notwendige Immunantwort im Darm wird maßgeblich durch ein komplexes Interagieren zwischen angeborenen und erworbenen Mechanismen des lokalen Immunsystems kontrolliert (Pabst und Rothkötter, 1999; Kelly und Coutts, 2000; Vega-Lopez et al., 2001; Stokes et al., 2004; Bailey et al., 2005; Murphy et al., 2009).

Die Evaluierung der Effekte der verwendeten Futterzusatzstoffe auf das darmassoziierte Immunsystem erfolgte anhand der Charakterisierung sowie Quantifizierung intraepithelialer Lymphozyten (IEL) mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie.

#### Diskussion der Quantifizierung CD3<sup>+</sup>-IEL mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie

Der immunhistochemische Nachweis CD3<sup>+</sup>-IEL diente in dieser Arbeit teilweise einem Vergleich der Quantifizierung CD3<sup>+</sup>-IEL mithilfe der Durchflusszytometrie. Für die Vergleichbarkeit beider Analysenverfahren wurden während der Sektion immer zwei benachbarte Teilstücke aus dem mittleren Jejunum (ohne Peyersche Platten) entnommen. Untersuchungen bei Schweinen hinsichtlich der Beeinflussung des lokalen darmassoziierten Immunsystems durch MKFS existieren nur in geringer Anzahl. Der Einsatz von MKFS enthaltendem *Cuphea*-Samen (*C. lanceolata* und *C. ignea*) und Lipase in der Fütterung von Absetzferkeln bewirkten in der ersten Woche nach dem Absetzen eine signifikante Steigerung der Zottenlänge im Dünndarm, gepaart mit einer geringeren Kryptentiefe und einem größeren Verhältnis von Villuslänge/Kryptentiefe sowie einer signifikant geringeren Anzahl an IEL im proximalen Dünndarm (Dierick et al., 2003).

Die Ergebnisse der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigten für den Mittelwert aus beiden Blindbestimmungen vergleichbare Ergebnisse. Die Versuchsgruppe MKFS und KOS wies mit rd. 57 CD3<sup>+</sup>-IEL/100 Enterozyten, verglichen mit der Gruppe KOS, eine geringere Anzahl an CD3<sup>+</sup>-IEL auf. Die Auswertung der morphometrischen Analysen ergab ähnliches, wobei die längsten Zotten in Verbindung mit den tiefsten Krypten die Tiere der Gruppe MKFS und KOS aufwiesen, verglichen mit der Kontrollgruppe und Gruppe KOS. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass MKFS einen Einfluss auf darmmorphologische Strukturen und auf die Anzahl an IEL haben können. Weder die Resultate der IEL-Zählungen noch die morphometrischen Vermessungen konnten jedoch statistisch abgesichert werden. Dies lag vermutlich an der unter Punkt 5.3.1 bereits diskutierter zu geringer Probenzahl.

Die mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmte Anzahl der CD3<sup>+</sup>-IEL zeigte ebenfalls keine signifikanten Differenzen zwischen den Fütterungsgruppen, auch wenn es sich abzeichnete, dass die mittlere Anzahl bei den Tieren der KOS-Gruppe (82 %) über derjenigen der Kontrollgruppe (72 %) lag. Der prozentuale Anteil der Gruppe MKFS und KOS lag, verglichen mit der Kontrollgruppe, geringfügig höher bei rd. 78 %. Das Ergebnis beider Zählungen aus den immunhistochemischen Untersuchungen (IHC) sowie die erste Zählung verhalten sich genau gegenteilig dazu, wobei die zweite Blindbestimmung mit den FACS-Daten übereinstimmt. Die Auswertung der immunhistochemisch markierten Gewebeschnitte

erfolgte anhand einer doppelten Blindbestimmung, zur Gewährleistung der Objektivität geschah die vorherige Kodierung der spezifischen Tiernummer durch eine Person, für die die Versuchsdiäten unbekannt waren.

Die Ergebnisse der Isotypenkontrolle des Primärantikörpers PPT3, um die spezifische Bindung des Primärantikörpers zu überprüfen, erlaubten zudem den Ausschluss falsch positiver Ergebnisse. Außerdem wurden, um eine Überlagerung der Zellkerne im Gewebeschnitt zu verhindern, die Schnitte für die immunhistochemische Markierung zuvor auf eine Stärke von 5 µm geschnitten. Jedoch ist dabei zu bedenken, dass die gewonnenen Paraffinblöcke nicht exakt gleichmäßig ausgegossen werden können. Möglicherweise bewirkten ungleiche Schnittstärken aufgrund der Überlagerung der Zellkerne die Ungenauigkeiten der Quantifizierung mittels IHC. Dies stellt sicher einen Nachteil der Methode dar, wobei eventuell eine noch geringere Schnittdicke von 3 µm die mikroskopische Auswertung optimieren könnte.

Die Unterschiede zwischen den beiden Methoden sind möglicherweise auch dadurch zu erklären, dass während der Aufarbeitung der Darmproben zur durchflusszytometrischen Analyse eine relativ hohe Anzahl an Epithelzellen verloren gegangen ist und sich folglich die prozentualen Anteile der IEL-Fraktion im Epithel erhöhen. Verdeutlicht wird dies durch die resultierende Absenkung der Anzahl nach Kalkulierung der IEL-Fraktionen pro 100 Enterozyten (absolute Werte) auf Basis der mittels IHC markierten CD3<sup>+</sup>-IEL. Bei dem Vergleich beider Methoden muss zudem beachtet werden, dass der verwendete monoklonale Antikörper PPT3 bei den FACS-Analysen aus organisatorischen Gründen lediglich bei den Tieren der zweiten und dritten Versuchsreihe eingesetzt werden konnte und sich nicht mit den gesamten Tieren aus der IHC decken. Durch die Etablierung des porzinen monoklonalen Antikörpers PPT3 am Jejunum des Schweines konnte in dieser Arbeit mittels IHC und Durchflusszytometrie (FACS) gezeigt werden, dass der Hauptteil der IEL CD3 exprimiert (siehe Tabelle 39 und 40).

Die Bedeutung der Anzahl IEL als Indikator einer intakten Schleimhaut wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine verringerte Anzahl an IEL könnte in Verbindung mit den längeren Zotten sowie der Verringerung der Kryptentiefe eine verminderte Apoptoserate widerspiegeln und eine Schleimhaut protektive Wirkung durch MKFS anzeigen (Dierick et al., 2003). Eine geringere Anzahl an IEL könnte aber ebenso eine Abschwächung der Schleimhautbarriere bedeuten, da durch den Mangel an Effektorzellen eine wirksame lokale Immunantwort, um den Eintritt pathogener Keime frühzeitig zu verhindern, nicht existiert bzw. nur in geringerem Umfang stattfinden kann (Vega-Lopez et al., 1995; Rothkötter et al., 1999; Gu et al., 2002).

#### Diskussion der Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Analysen

Eine weitere Differenzierung IEL gelang in dieser Arbeit außerdem durch die zusätzlichen Ergebnisse der FACS-Analysen.

Beim adulten Schwein befindet sich der Hauptteil IEL angrenzend an die Basalmembran und ca. 53 % dieser IEL exprimieren die Oberflächenmoleküle CD2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (Bianchi et al., 1992; Vega-Lopez et al., 1995; Rothkötter et al., 1999; Vega-Lopez et al., 2001). Ein geringerer Teil befindet sich auf Höhe des Enterozyten-Zellkerns sowie in apikal gelegenen Bereichen, dabei soll es sich zu ca. 43 % um doppelt negative CD2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen (Rothkötter et al., 1994; Vega-Lopez et al., 1993; 2001) handeln. CD4<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> sowie TcR1+ (γδ)-Zellen konnten nur in geringer Anzahl (ca. 5 %) im Epithel des Schweins nachgewiesen werden (Vega-Lopez et al., 1993; Solano-Aguilar et al., 2001; Scharek et al., 2007). Eine eindeutige Abgrenzung zwischen CD8 positiven γδ-T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) kann durch die Oberflächenmarker CD3 und CD5 erfolgen. NK-Zellen exprimieren im Gegensatz zu CD2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> γδ-T-Zellen weder CD3 noch CD5 (Saalmüller et al., 1994). Beim Schwein können T-Lymphozyten generell anhand ihres T-

Zellrezeptors in  $\alpha\beta$ -T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen untergliedert werden. Die  $\gamma\delta$ -T-Zelllinie wird beim Schwein ferner in drei Subtypen gegliedert (Saalmüller et al., 1987; Yang and Parkhouse, 1996, 2000):  $CD2^+CD4^+CD8^-$   $\gamma\delta$ -T-Zellen (klassische  $\gamma\delta$ -T-Zellen),  $CD2^+CD4^-CD8^{+\alpha}$   $\gamma\delta$ -T-Zellen (klassische  $\gamma\delta$ -T-Zellen) und  $CD2^-CD4^-CD8^-$   $\gamma\delta$ -T-Zellen (nicht klassische  $\gamma\delta$ -T-Zellen). Der nicht klassische  $\gamma\delta$ -T-Subtyp stellt den Hauptteil der T-Zellen im Blut der Schweine dar (Charerntantanakul und Roth, 2007).

In vorliegenden Untersuchungen konnten ebenfalls im Epithel mittels Durchflusszytometrie nicht klassische  $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil der  $CD2^-/\gamma\delta^+$  markierten IEL der KOS-Gruppe lag im Mittel, verglichen mit der Kontrolle und der Gruppe KOS und MKFS, mit nahezu 2 % signifikant ( $p = 0,027$ ) höher. Die Funktion dieser Zellen ist jedoch ungeklärt (Charerntantanakul und Roth, 2007). Die Phänotypisierung anhand der in vorliegender Untersuchung nachgewiesenen Oberflächenmoleküle (Tabelle 42) erlaubt die Aussage, dass die größte IEL-Fraktion den zytotoxischen T-Zellen zugesprochen werden kann. Klassische  $\gamma\delta$ -T-Zellen und natürliche Killerzellen stellen ebenfalls einen großen Teil der IEL dar. Der hier nachgewiesene hohe Anteil an Effektorzellen unterstreicht die wichtige Rolle IEL innerhalb einer lokalen Immunantwort.

#### **5.4 Schlussfolgerung**

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass MKFS die biologische Leistung von Absetzferkeln verbessern können. Die gleichzeitige Gabe von kurzkettigen organischen Säuren führte zu keiner Beeinflussung der antibakteriellen Wirksamkeit der eingesetzten mittelkettigen Fettsäuren. Die Fütterung von kurzkettigen organischen Säuren zeigte allerdings einen hemmenden Einfluss auf die Zellzahl der Enterobakterien und die Anzahl pathogener *E. coli*-Stämme. Die Bedeutung für die Tiergesundheit könnte im Rahmen eines folgenden Infektionsversuches abgeklärt werden. Durch die Etablierung des porzinen monoklonalen Antikörpers PPT3 am Jejunum des Schweines konnte in dieser Arbeit mittels IHC und Durchflusszytometrie (FACS) bestätigt werden, dass der Hauptteil der intraepithelialen Lymphozyten (IEL)  $CD3$  exprimiert und den zytotoxischen T-Zellen zugeordnet werden kann. Der Zusatz von KOS konnte die Anzahl der  $CD3^+$ -IEL andeutungsweise erhöhen. Die Ergebnisse der FACS-Daten zeigen außerdem, dass klassische  $\gamma\delta$ -T-Zellen und natürliche Killerzellen einen großen Teil der IEL im Epithel des Dünndarms stellen.

## 6. Zusammenfassung

### Fabienne Ferrara: **Untersuchungen zum Einsatz von mittelkettigen Fettsäuren und kurzkettigen organischen Säuren in der Fütterung von Absetzferkeln**

Mittelkettige Fettsäuren sind in der Ernährung als schnellverfügbare energieliefernde Substrate, aber auch aufgrund ihrer möglichen Wirkungen auf die intestinale Mikrobiota sowie auf die Darmmorphologie bzw. auf das lokale darmassoziierte Immunsystem insbesondere zur Prophylaxe von Durchfallerkrankungen beim Absetzferkel von Bedeutung. Untersuchungen zeigten eine negative Korrelation zwischen steigenden pH-Werten und einer antibakteriellen Wirksamkeit der mittelkettigen Fettsäuren in Abhängigkeit des Dissoziationsgrades. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollte überprüft werden, ob die zusätzliche Supplementierung organischer Säuren (Fumar- und Milchsäure) eine pH-Wert Absenkung im vorderen Verdauungstrakt verursacht und eine verstärkte Wirkung mittelkettiger Fettsäuren auf die Mikrobiota ermöglicht. Durch die Erhebung der Dünndarmzottenlänge und Kryptentiefe bzw. durch die Quantifizierung intraepithelialer Lymphozyten (IEL) sollten außerdem mögliche Effekte der eingesetzten Fütterungsadditiva auf die Dünndarmschleimhaut und auf das lokale darmassoziierte Immunsystem untersucht werden.

Zu diesem Zwecke wurden insgesamt 96 abgesetzte männlich kastrierte Ferkel (Alter zu Beginn des Versuchs:  $25 \pm 1$  Tag) in drei folgenden konsekutiven Versuchsreihen auf vier Fütterungsgruppen aufgeteilt. Die Kontrollgruppe erhielt ein Ferkelaufzuchtfutter nach Empfehlungen der GfE (2006). Der Versuchsfuttermischung der Gruppe KOS wurde 1,05 % eines Produktes bestehend aus Fumar- und Milchsäure zugesetzt. Das Gesamtprodukt enthielt 71 % KOS (56 % Fumarsäure und 44 % Milchsäure) sowie 29 % Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) als Trägerstoff. Dem Futter der Versuchsgruppe KOS und MKFS wurde zusätzlich 0,3 % eines Produkts, welches Caprylsäure (C:8) und Caprinsäure (C:10) enthielt, beigefügt (je 25 % C:8 bzw. C:10 und 50 %  $\text{SiO}_2$ ). Die Ferkel der Versuchsgruppe MKFS erhielten ebenfalls 0,3 % eines Produkts über das Futter, welches Capryl- und Caprinsäure (je 25 % C:8 bzw. C:10 und 50 %  $\text{SiO}_2$ ).

Die Erhebung der zootechnischen Daten erfolgte wöchentlich. Nach einer vierwöchigen Fütterungsphase wurden, verteilt auf drei Sektionstage, je drei Ferkel pro Gruppe (insgesamt neun Ferkel pro Gruppe), euthanasiert. Den Tieren wurde Digesta aus dem Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Rektum entnommen sowie Gewebeproben aus dem mittleren Jejunum. Die Digestaprobe dienten zur Bestimmung verdauungsphysiologischer Parameter (pH-Wert, praecaecale sowie Gesamtverdaulichkeit der Nährstoffe und Trockensubstanz) sowie zur Quantifizierung der Laktobazillen und Enterobakterien mittels qPCR. Die bakteriellen Metaboliten D- und L-Laktat, Ammonium sowie kurzkettige Fettsäuren wurden zur Betrachtung der Fermentationsvorgänge zusätzlich analysiert. Eine Multiplex PCR diente als qualitativer Nachweis vorkommender *E. coli*- Pathogenitätsfaktoren aus der Digesta des Kolons. Die vier am häufigsten detektierten Pathogenitätsfaktoren (est-II (STb), Stx2e (STx), Fas (987p) und fedA (F18ab)) wurden anschließend via qPCR quantifiziert.

Weiterhin erfolgte anhand der entnommenen Gewebeproben aus dem Jejunum, eine Evaluierung möglicher Effekte durch die eingesetzten Futterzusatzstoffe, auf die Länge der Dünndarmzotten und Kryptentiefe bzw. auf die Anzahl IEL. Die Anzahl der IEL wurde mithilfe der Immunhistochemie und Durchflusszytometrie bestimmt, wobei durch erstere Methode lediglich  $\text{CD3}^+$ -IEL erfasst wurden. Durch letztere Methode erfolgte außerdem eine weitere quantitative Erfassung der IEL anhand der exprimierten Oberflächenmoleküle CD2, CD3, CD5, CD8 $\beta$ , CD16 bzw. über den  $\delta\gamma$ -T-Zellrezeptor.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten lediglich innerhalb der dritten Versuchswoche eine signifikante Beeinflussung der biologischen Leistung der Ferkel durch MKFS in Form einer höheren Lebendmassezunahme. Durch den Zusatz MKFS konnten die pH-Werte im Magen, Jejunum und Ileum signifikant reduziert werden, eine zusätzliche Absenkung der pH-Werte der Digestaprobe durch die Fütterung von kurzkettigen organischen Säuren konnte nicht festgestellt werden. Die Fütterung von KOS zeigte einen statistisch abgesicherten hemmenden Einfluss auf die Zellzahl der Enterobakterien im Magen und Kolon. Die Anzahl potenziell pathogener *E. coli*-Stämme im Kolon konnte des Weiteren tendenziell durch KOS reduziert werden. Der Zusatz MKFS reduzierte, im Vergleich zur Gruppe KOS, signifikant die gemessene Gesamtkonzentration der kurzkettigen Fettsäuren in der Digesta des Jejunums. Im Kolon hingegen bewirke die Fütterung von KOS im Vergleich zur Gruppe MKFS eine abgesicherte Minderung der Gesamtkonzentration der SCFA. Weder die Länge der Dünndarmzotten noch die Kryptentiefe wurden signifikant durch die Zusatzstoffe beeinflusst. Durch die Etablierung des porzinen monoklonalen Antikörpers PPT3 am Jejunum des Schweines konnte in dieser Arbeit mittels IHC und Durchflusszytometrie (FACS) bestätigt werden, dass der Hauptteil der IEL CD3 exprimiert und den zytotoxischen T-Zellen zugeordnet werden können. Die Ergebnisse der FACS-Daten zeigen außerdem, dass klassische  $\gamma\delta$ -T-Zellen und Natürliche Killerzellen ebenfalls einen großen Teil der IEL im Epithel des Dünndarms stellen, wobei durch KOS die Anzahl der CD2<sup>-</sup> /  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-IEL (nicht klassische T-Zellen) signifikant erhöht war.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Auswirkungen MKFS und KOS auf die intestinale Mikrobiota bzw. auf das lokale darmassoziierte Immunsystem bei Absetzferkeln müssen hinsichtlich der Bedeutung für die Tiergesundheit weitergehend geprüft werden.

## 7. Summary

### Fabienne Ferrara: **Medium-chain fatty acids and short chain organic acids as feed additives for weaned piglets**

Medium chain fatty acids (MCFA) constitute a rapidly available energy source for humans and animals, which have been reported to influence the intestinal morphology or local immune system in pigs and to act against potentially pathogenic bacteria. Maintaining the intestinal physiological and microbial balance in weaning piglets is of high importance for the prevention of digestive disorders.

It is generally assumed that the antibacterial effects of MCFA depend on the degree of dissociation of the fatty acids. The pH-value of the surrounding environment is therefore of high importance. The aim of this study was to examine the antibacterial effects of MCFA by feeding the MCFA caprylic and capric acid with the short chain organic acids (KOS) fumaric and lactic acid to piglets, which should reduce the pH in the upper digestive tract. By examining the length of the villi and depth of the crypts of the small intestine, and by quantifying the intraepithelial lymphocytes (IEL), the effects of the implemented feed additives on the mucosa of the small intestine and the local immune system could be studied.

A total of 96 male castrated piglets (weaned at  $25 \pm 1$  days of age) were randomly assigned into four different dietary groups in three consecutive periods. The control group received a commercial starter diet. The treatment groups received the same diet supplemented with either 1.05% of a product containing 71 % KOS (56 % fumaric acid, 44 % lactic acid and 29 % silicon dioxide ( $\text{SiO}_2$ ) as a carrier), or 1.05 % KOS in combination with 0.3 % of an additive with MCFA (KOS+MCFA) containing caprylic acid (C:8) and caproic acid (C:10) (25 % of each acid and 50 % of  $\text{SiO}_2$ ). The piglets of the treatment group MCFA received 0.3 % of the same product with C:8 and C:10 (25 % of each acid and 50 % of  $\text{SiO}_2$ ). The zootechnical data were recorded on a weekly basis. After a four week feeding period, three piglets per group (nine piglets in total) were euthanized and the contents of the stomach, jejunum, ileum, colon and rectum were collected for further analyses. Digestibility parameters were gathered by determining the pH-values, the apparent ileal and total digestibility of crude nutrients, as well as the dry matter. Lactobacilli and enterobacteria log cell counts were determined in the digesta by quantitative real-time PCR. Intestinal *E. coli* virulence factors were differentiated via Multiplex-PCR in the colon and subsequently quantified by real-time PCR. Concentrations of bacterial metabolites (lactate, ammonium and SCFA) were determined along the intestinal tract. To investigate the potential impact of the feed additives on the small intestine morphology and local immune system, tissue samples were taken from the middle of the jejunum for villus length and crypt depth measurements, and to quantify IEL. CD3 positive IEL were determined via immunohistochemistry and flow cytometry, whereas CD2, CD5, CD8 $\beta$ , CD16 and  $\gamma\delta$ -TCR positive IEL were only analysed by flow cytometry.

Zootechnical data were affected in week three of the experiment, during which the daily body weight gain was increased by MCFA. Significantly decreased pH-values were observed in the stomach, the jejunum and the ileum of the piglets fed the diets containing MCFA, whereas the combined feeding with KOS did not enhance the effect. The results of the study indicate a significant reduction of the cell count of enterobacteria in the upper gastrointestinal tract by dietary KOS. In addition, KOS tended to reduce the abundance of *E. coli* virulence genes in the colon. No influence of treatment was detected for lactobacilli counts along the intestinal tract. The bacterial metabolites D-, L-lactate and ammonium were not influenced by treatment in all intestinal sections. Only the total concentration of SCFA in the jejunum was reduced by dietary MCFA as compared to the KOS group, whereas SCFA in colon were reduced by feeding KOS. Neither the villi lengths nor the crypt depths were influenced by the treatment.

The establishment of the antibody PPT3 at the jejunum in pigs confirmed that the majority of IEL expressed the surface marker CD3 and could be classified as cytotoxic T-lymphocytes. However, classic  $\gamma\delta$ -T-cells and Natural Killer Cells represent a large proportion of IEL. The flow cytometric data indicated that KOS increased the quantity of non-classic  $\gamma\delta$ -T-cells in the epithelium in the jejunum.

In summary, the implementation of feeding MCFA and KOS and the resulting impact on the intestinal microbiota and the local immune system should be further investigated in an infection model trial.

## 8. Literaturverzeichnis

Azain, M. J. (1993):

Effects of adding medium-chain triglycerides to sow diets during late gestation and early lactation on litter performance.

J. Anim. Sci. **71**: 3011-3019

Babayan, V. K. (1987):

Medium chain triglycerides and structured lipids.

Lipids **22**: 417-420

Bach, A. C. and Babayan, V. K. (1982):

Medium-chain triglycerides: an update.

Am. J. Clin. Nutr. **36**: 950-962

Bailey, M., Haverson, K., Inman, C., Harris, C., Jones, P., Corfield, G., Miller, B., Stokes, C. (2005):

The development of the mucosal immune system pre-and post-weaning: balancing regulatory and effector function.

Proc. Nutr. Soc. **64**: 451-457

Barman, N. N., Rothkötter, H. J., Bianchi, A. T. J., Pabst R. (1994):

Antigen dependent development of intraepithelial lymphocytes in the small intestine of pigs.

J. Anat. Soc. India **43**: 97-106

Bässler, K. H. (1959):

Stoffwechsel und Stoffwechselwirkung von Propionsäure im Hinblick auf ihre Verwendung als Konservierungsmittel.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. **110**:28-42

Beckett, A. H., Moffat, A. C. (1969):

Correlation of partition coefficients in n-heptane-aqueous with buccal absorption data for a series of amines and acids.

J. Pharm. Pharmacol. **21** (suppl.): 144S

Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Karlsson, S. M., Steingrímsson, O., Thormar, H. (1998):

In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides.

Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 2290-2294

Bergsson, G., Steingrímsson, O., Thormar, H. (2002):

Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*.

Int. J. Antimicrob. Agents **20**: 258-262

Bianchi, A. T. J., Zwart, R. J., Jeurissen, S. H. M. and Moonen-Leusen, H. W. M. (1992):

Development of the B-and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach.

Vet. Immunol. Immunopathol. **33**:201-221

Bilkei, G. (1996):

Ferkelverluste nach dem Absetzen. Ursachen und Bekämpfung.

Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart

- Blanco, M., Blanco J., Gonzales E. (1997):  
Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes.  
J. Clin. Microbiol. **35**: 2958-2963
- Blank, R., Mosenthin, R. and Sauer, W. C. (1998):  
Gastrointestinal response of early-weaned pigs to supplementation of wheat-soyabean meal diets with fumaric acid and sodium bicarbonate.  
J. Anim. Feed Sci. **7**: 185-189
- Blaut, M., Clavel, T. (2007):  
Metabolic Diversity of the Intestinal Microbiota: Implications for Health and Disease.  
J. Nutr. **137**: 755S-755S
- Bligny, D., Blat, S., Chauvin, A., Guerin, S., Malbert, C-H. (2005):  
Reduced mechanosensitivity of duodenal vagal afferent neurons after an acute switch from milk-based to plant-based diets in anaesthetized pigs.  
J. Physiol. Pharmacol. **56** (suppl 3): 89-100
- Bloch, R. (1974):  
Intestinal absorption of medium-chain fatty acids.  
Z. Ernährungswiss. **13**: 42-49
- Böck, O. (1989):  
Romeis Mikroskopische Technik.  
Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 17. Auflage,
- Borum, P. R. (1992):  
Medium-chain triglycerides in formula for preterm neonates: implications for hepatic and extrahepatic metabolism.  
J. Pediatr. **120**: S139-S145
- Bosworth, B. T., Casey, T. A. (1997):  
Identification of toxin and pilus genes in porcine *Escherichia coli* using polymerase chain reaction (PCR) with multiple primer pairs.  
97<sup>th</sup> general meeting of the American Society for Microbiology, May 4-8 1997,  
Miami Beach, Florida, Abstract B509:116
- Boudry, G., Péron, V., Huërou- Luron, I., Lallès, J. P, Sève, B. (2004):  
Weaning Induces Both Transient and Long- Lasting Modifications of Absorptive, and Barrier Properties of Piglet Intestine.  
J. Nutr. **134**: 2256-2262
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Vanparys, A., Volf, J., Mahu, M., Van Immerseel, F., Rychlik, I., Dewulf, J., Ducatelle, R., Pasmans, F. (2008):  
Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs.  
Vet. Microbiol. **132**: 319-327

Brooks, P. H., Tsourgiannis, C. A. (2003):

Factors affecting the voluntary feed intake of the weaned pig.

In: Pluske J. R., Le Dividich J., Verstegen M. W., A. (Eds.), weaning the pig: concepts and consequences, pp. 81-109,

Wageningen Academic Publisher, Niederlande

Bruininx, E. M., van der Peet- Schwering, C. M., Schrama, J. W., Vereijken, P. F., Vesseur, P. C., den Hartog, L. A., Beynen, A. C. (2001):

Individually measured feed intake characteristic and growth performance of group- housed weanling pigs: effects of sex, initial body weight distribution within groups.

J. Anim. Sci. **79**: 301-308

Buchheit, S. (2009):

Untersuchungen zum Einsatz von mittelkettigen Fettsäuren in der Fütterung von Absatzferkeln.

Dissertation aus dem Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Canas-Rodriguez, A., Smith, H. W. (1966):

The identification of the antimicrobial factors of the stomach contents of sucking rabbits.

Biochem. J. **100**: 79-82

Canibe, N, Steien, S. H., Overland, M. and Jensen, B. B. (2001):

Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations.

J. Anim. Sci. **79**: 2123-2133

Canibe, N., Hojberg, S., Hojsgard, S. and Jensen, B. B. (2005):

Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs.

J. Anim. Sci. **83**: 1287-1302

Carniellei, V. P., Sulkers, E. J., moretti, C., Wattimena, J. L. D., van Goudoever, J. B., Degenhardt, H. J., Zacchello, F. & Sauer, P. J. J. (1994):

Conversion of octanoic acid into long-chain saturated fatty acids in premature infants fed a formula containing medium-chain triglycerides.

Metabolism **43**: 1287-1292

Carvajal, O., Nakayama, M., Kishi, T., Sato, M., Ikeda, I., Sugano, M. And Imaizumi, K. (2000):

Effect of medium-chain fatty acid positional distribution in dietary triacylglycerol on lymphatic lipid transport and chylomicron composition in rats.

Lipids **35**: 1345-1351

Casey, T. A., Herring, C., Schneider, R. (1998):

Expression of Heat-Stable Enterotoxin STb by Adherent *Escherichia coli* Is Not Sufficient To Cause Severe Diarrhea in Neonatal Pigs.

Infect. Immun. **66**: 1270-1272

Casey, T. A., Bosworth, B. T. (2009):

Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine.

J. Vet. Diagn. Invest. **21**: 25-30

Cera, K. R., Mahan, D. C., Cross, R. F., Reinhart, G. A., Whitmoyer, R. E. (1988):

Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine.

J. Anim. Sci. **66**: 574-584

Charerntantanakul, W., Roth, J. A. (2007):

Biology of porcine T lymphocytes.

Anim. Health Res. Rev. **7** (1/2): 81-92

Chaveerach, P., Keuzenkamp, D. A., Urlings, A. A. P., Lipman, L. J. A., van Knapen, F. (2002):

In Vitro Study on the Effect of Organic Acids on *Campylobacter jejuni/coli* Populations in Mixtures of Water and Feed.

Poultry Sci. **81**: 621-628

Clemens, E. T., Stevens, C. E. und Southworth, M. (1975):

Sites of organic acid production and pattern of digesta movement in the gastrointestinal tract of swine.

J. Nutr. **105**: 759-768

Cox, A., Rawlinson, L. A., Baird, A., Bzik, V., Brayden, D. (2008):

In vitro interactions between the oral absorption promoter, sodium caprate (C (10)) and S. Typhimurium in rat intestinal mucosae.

Pharm. Res. **25**: 114-122

Daniel, M., Whisker, E., Rave, G. and Feldheim, W. (1997):

Fermentation in human subjects of nonstarch polysaccharides in mixed diets, but not in a barley fiber concentrate, could be predicted by in vitro fermentation using human fecal inocula.

J. Nutr. **127**: 1981-1988

De Busser, E. V., Dewulf, J., Nollet, N., Houf, K., Schwarzer, K., De Sadeleer, L., De Zutter, L. and Maes, D. (2009):

Effect of Organic Acids in Drinking Water During the Last 2 weeks Prior to Slaughter on Salmonella shedding by Slaughter Pigs and Contamination of Carcasses.

Zoonoses Publ. Health **56**: 129-136

Decuypere, J. A., Dierick, N. A. (2003):

The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to in-feed antibiotics in piglets: concept, possibilities and limitations. An overview.

Nutr. Res. Rev. **16**: 193-209

- Denyer, M. S., Wileman, T. E., Stirling, C. M., Zuber, B., Takamatsu, H. H. (2006):  
Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells.  
Vet. Immunol. Immunopathol. **110**: 279-92
- Deprez, P., Deroose, P., Van den Hende, C., Muylle, E., Oyaert, W. (1987):  
Liquid versus dry feeding in weaned piglets: The influence on small intestinal morphology.  
J. Vet. Med. Biol., **34**: 254-259
- Dierick, N. A., Vervaeke, I., Decuypere, J. A., Henderickx, H. K. (1986):  
Influence of the gut flora and of some growth-promoting feed additives on nitrogen metabolism in pigs. I. Studies in vitro.  
Livest. Prod. Sci. **14**: 161-176
- Dierick, N. A., Decuypere, J. A., Molly, K., van Beek, E., Vanderbeke, E. (2002a):  
The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition I. In vitro screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets.  
Livest. Prod. Sci. **75**: 129-142
- Dierick, N. A., Decuypere, J. A., Molly, K., van Beek, E., Vanderbeke, E. (2002b):  
The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing medium chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to nutritional antibiotics in piglet nutrition. II. In vivo release of MCFAs in gastric cannulated and slaughtered piglets by endogenous and exogenous lipases; effects on the luminal gut flora and growth performance  
Livest. Prod. Sci. **76**: 1-16
- Dierick, N. A., Decuypere, J. A., Degeyter, I. (2003):  
The combined use of whole Cuphea seeds containing medium chain fatty acids and an exogenous lipase in piglet nutrition.  
Arch. Tierernähr. **57**: 49-63
- Docic, M., Bilkei, G. (2003):  
FREQUENCY OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM PIGS SUFFERING FROM DIFFERENT MANIFESTATIONS OF "POSTWEANING COLI COMPLEX" (PWCC) IN AGRICULTURAL HUNGARY / ROMANIA / SERBIA.  
Acta Vet. (Beograd) **53**. (1): 3-10
- Dove, C. R. (1993):  
The effect of adding copper and various fat sources to the diets of weanling swine on growth performance and serum fatty acid profiles.  
J. Anim. Sci. **71**: 2187-2192
- Edmonds, M. S., Izquiero, D. A. and Baker, H. (1985):  
Feed additive studies with newly weaned pigs: efficacy of supplement copper, antibiotic and organic acids.  
J. Anim. Sci. **60**: 462-469

- Eklund, T. (1983):  
The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels.  
*J. Appl. Bacteriol.* **54**: 383-389
- Fairbrother, J. M. (1999):  
Identification, nomenclature, and diagnosis of pathogenic *Escherichia coli* In: Proceedings of the Animal Meeting of the Western Canadian Association of Swine Practitioners, pp. 21-31  
Saskatoon, Canada
- Fairbrother, J. M., Nadeau, É. nd Gyles, C. L. (2005):  
*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies.  
*Anim. Health Res. Rev.* **6** (1): 17-39
- Falkowski, J. F. und Aherne, F. X. (1984):  
Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig nutrition.  
*J. Anim. Sci.* **58**: 935-938
- Fieser und Fieser (1972):  
Organische Chemie.  
Verlag Chemie, Weinheim
- Franco, L. D., Fondevila, M., Lobera, M. B., Castrillo, C. (2005):  
Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility.  
*J. Anim. Physiol. Nutr.* **89**: 88-93
- Freese, E., Sheu, C. W., Galliers, E. (1973):  
Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives.  
*Nature* **241**: 321-325
- Fuller, R., Barrow, P. A., Brooker, B. E. (1978):  
Bacteria Associated with the Gastric Epithelium of Neonatal pigs.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **35** (3): 582-591
- Gabert, V. M. und Sauer, W. C. (1995):  
The effect of fumaric acid and sodium fumarate supplementation to diets for weanling pigs on amino acid digestibility and volatile fatty acid concentration in ileal digesta.  
*J. Anim. Feed. Sci.* **53**: 243-254
- Galluser, M., Czernichow, B., Dreyfus, H., Gosse, F., Guerold, B., Kachelhoffer, J., Doffoel, M., Raul, F. (1993):  
Comparison of different lipid substrates on intestinal adaptation in the rat.  
*Gut* **34**: 1069-1074
- Geary, T. M., Brooks, P. H., Beal, J. D., Campbell, A. (1999):  
Effect on weaner pig performance and diet microbiology of feeding a liquid diet acidified to pH 4 with either lactic acid or through fermentation with *Pedicoccus acidilacti*.  
*J. Sci. Food Agric.* **79**: 633-640

- Giesting, D. W. and Easter, R. A. (1985):  
Response of Starter Pigs to Supplementation of Corn-Soyabean Meal Diets with Organic Acids.  
J. Anim. Sci. **60**: 1288-1294
- Giesting, D. W. and Easter, R. A. (1991):  
Effect of protein source and fumaric acid supplementation on apparent ileal digestibility of nutrients by young pigs.  
J. Anim. Sci. **69**: 2497-2503
- Giesting, D. W., Roos, M. A. and Easter, R. A. (1995):  
Evaluation of the effect of fumaric acid and sodium bicarbonate addition on performance of starter pigs fed diets of different types.  
J. Anim. Sci. **69**: 2489-2496
- Göbel, S. (2003):  
Multiplex-Polymerase-Ketten-Reaktion (MPCR) zum Nachweis ausgewählter Virulenzfaktoren schweinepathogener *Echerichia coli* –Einsatz bei Ferkeln mit *Bacillus cereus var. toyoi* Zulage.  
Dissertation aus dem Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
- Godlewski, M. M., Slupecka, M., Woliński, J., Skrzypek, T., Skrzypek, H., Motyl T., Zabielski, R. (2005):  
Into the unknown – the death pathways in the neonatal gut epithelium.  
J. Physiol. Pharmacol. **56** (suppl.3): 71-87
- Graham, S. A., Hirsinger, F., Röbbelen, G. (1981):  
Fatty acids of *Cuphea (Lythraceae)* seed lipids and their systematic significance.  
Am. J. Bot. **68**: 908-917
- Greenberger, N. J., Franks, J. J., Isselbacher, K. J. (1965):  
Metabolism of 1c14 octanoic and 1c14 palmitic acid by rat intestinal slices.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **120**: 468-472
- Greenberger, N. J. und Skillmann, T. G. (1969):  
Medium-chain triglyderides. Physiologic considerations and clinical implications.  
N. Eng. J. Med. **280**: 1045
- Guillot, E., Vaugelade, P., Lemarchal, P., Rerat, A. (1993):  
Intestinal absorption and liver uptake of medium-chain fatty acids in non-anaesthetized pigs.  
Br. J. Nutr. **69**: 431-442
- Guillot, E., Lemarchal, P., Dhorne, T. (1994):  
Intestinal absorption of medium chain fatty acids: *in vivo* studies in pigs devoid of exocrine pancreatic secretion.  
Br. J. Nutr. **72**: 545-553
- Gu, X., Li, D., She, R. (2002):  
Effect of weaning on small intestinal structure and function in the piglet  
Arch. Anim. Nutr. **56**: 275-286

- Hampson, D. J. (1986):  
Alterations in piglet small intestinal structure at weaning.  
*Res. Vet. Sci.* **40** (1): 32-40
- Hedemann, M. S., Højsgaard, S., Jensen, B. B (2003):  
Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning.  
*J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **87**: 32-41
- Heird, W. C., Jensen, C. L. and Gomez, M. (1992):  
Practical aspects of achieving positive energy balance in low birth weight infants.  
*J. Pediatr.* **120**: S120-S128
- Heo, K. N., Lin, X., Han, I. K., Odle, J. (2002):  
Medium-chain fatty acids but not L-carnitine accelerate the kinetics of <sup>14</sup>C triacylglycerol utilization by colostrum-deprived newborn pigs.  
*J. Nutr.* **132**: 1989-1994
- Hill, J. E., Seipp, R. P., Betts, M., Hawkins, L., Van Kessel, A. G., Crosby, W. L., Hemmingsen, S. M. (2002):  
Extensive Profiling of a Complex Microbial Community by High-Throughput Sequencing.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3055-3066
- Hilmarsson, H., Thomar, H., Thrainsson, J., Gunnarsson, (2006):  
Effect of glycerol monocaprin on broiler chickens: an attempt at reducing intestinal campylobacter infection.  
*Poultry Sci.* **85**: 588-592
- Hopwood, D. E., Hampson, D. J. (2003):  
Interactions between the intestinal microflora, diet and Diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period.  
In: Pluske J. R., Le Dividich J., Verstegen M. W., A. (Eds.), weaning the pig: concepts and consequences, pp.199-212,  
Wageningen Academic Publisher, Niederlande
- Hornickel, N. (2009):  
Investigations on the innate immunity of the esophagus epithelium of domesticated mammals.  
Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover
- Hoshimoto, A., Suzuki, Y, Katsuno T., Nakajima, H. and Saito, Y. (2002):  
Caprylic acid and medium-chain triglycerides inhibit IL-8 gene transcription in Caco-2 cells: comparison with the potent histone deacetylase inhibitor trichostatin A.  
*Br. J. Pharmacol.* **136**: 280-286
- Hsiao, C. P., Siebert, K. J. (1999):  
Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria.  
*Int. J. Food Microbiol.* **47**: 189-201
- Hunter, D. R. and Segel, I. H. (1973):  
Effect of Weak Acids on Amino Transport by *Penicillium chrysogenum*: Evidence for a Proton or Charge Gradient as the Driving Force.  
*J. Bacteriol.* **113**: 1184-1192

- Ikeda, Y., Okamura-Ikeda, K., Tanaka, K. (1985):  
Purification and characterization of short-chain, medium-chain, and long-chain acyl-CoA dehydrogenases from rat liver mitochondria. Isolation of the holo- and apoenzymes and conversion of the apoenzyme to the holoenzyme.  
*J. Biol. Chem.* **260**: 1311-1325
- Imberechts, H., De Greve, H., Schlicker, C. (1992):  
The pathogenesis of edema disease in pigs.  
*Vet. Microbiol.* **31**: 221-233
- Isaacs, C. E., Litov, R. E., Thormar, H. (1995):  
Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk.  
*J. Nutr. Biochem.* **6**: 362-366
- James, S. L., Muir, J. G., Curtis, S. L., Gibson, P. R. (2003):  
Dietary fibre: a roughage guide.  
*Intern. Med. J.* **33**: 291-296
- Jensen, B. B. (1998):  
The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in the young pigs.  
*J. Anim. Feed Sci.* **7**: 45-64
- Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., Truant, J. P. (1972):  
Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents.  
*Antimicrob. Agents. Chemother.* **2**: 23-28
- Kamphues, J. (1988):  
Untersuchungen zu Verdauungsvorgängen bei Absetzferkeln in Abhängigkeit von Futtermenge und Zubereitung sowie von Futterzusätzen.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Habil-Schr.
- Kanai, K., Kondo, E. (1979):  
Antibacterial and cytotoxic aspects of long-chain fatty acids as cell surface events: selected topics.  
*Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **32**: 135-174
- Kelly, D., Coutts, A. D. (2000):  
Early nutrition and the development of immune function in the neonate.  
*Proc. Nutr. Soc.* **59** (2): 177-85
- King, M. R., Kelly, D., Morel, P. C. H. and Pluske, J. R. (2003):  
Aspects of intestinal immunity in the pig around weaning.  
In: Pluske J. R., Le Dividich J., Verstegen M. W., A. (Eds.), weaning the pig: concepts and consequences, pp. 219-257,  
Wageningen Academic Publisher, Niederlande
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1975):  
Zum Einsatz von Zitronensäure in der Ferkelaufzucht.  
*Züchtungskunde* **47**: 329-335

- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1976):  
Zum Einsatz von Fumarsäure in der Ferkelaufzucht.  
Züchtungskunde **48**: 402-406
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1978a):  
Fumarsäure als Futteradditiv in der Ferkelaufzucht.  
Züchtungskunde **50**: 17-25
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1978b):  
Nährstoff und Energieverdaulichkeit bei Fumarsäure-Zulage.  
Z. Tierphysiol. Tierernährg. Futtermittelk. **41**: 71-76
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1980):  
Verdaulichkeit und Bilanz von Protein, Energie und einigen Mineralstoffen bei Fumarzulagen an Ferkel.  
Z. Tierphysiol. Tierernährg. Futtermittelk. **44**: 239-246
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1987a):  
Use of formats in the feeding of piglets. 1<sup>st</sup> Communication: Calcium formate.  
Züchtungskunde **50**: 17-25
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1987b):  
Einsatz von Formiaten in der Ferkelfütterung. 2. Mitteilung: Natriumformiat.  
Landwirtschaftl. Forschung **40**: 287-294
- Kirchgessner, M. und Roth, F. X. (1988):  
Ergotrope Effekte durch organische Säuren in der Ferkelaufzucht und Schweinemast.  
Übers. Tierernährung. **16**: 93-108
- Kirchgessner, M., Roth, F. X., Schwarz, F. J., Stangl, G. I. (2008):  
Tierernährung. Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis.  
DLG Verlag, 12. Auflage
- Klär, I. (2008):  
Einfluss der Verfütterung des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415 im frühen postnatalen Stadium auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Mikrobiota bei Ferkeln.  
Dissertation aus dem Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
- Knarreborg, A., Miquel, N., Granli, T., Jensen, B. B. (2002):  
Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets.  
Anim. Feed Sci. Technol. **99**: 131-140
- Kono, H., Fujii, H., Asakawa, M., Maki, A., Amemiya, H., Hirai, Y., Matsuda, M., Yamamoto, M. (2004):  
Medium-chain triglycerides enhance secretory IgA expression in rat intestine after administration of endotoxin.  
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **286**: G1081-1089

- Konstantinov, S. R., Awati, A. A., Williams, B. A., Miller, B. G., Jones, P., Stokes, C. R., Akkermans, A. D. L., Smidt, H. and de Vos, W. M. (2006):  
Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities.  
*Environ. Microbiol.* **8** (7): 1191-1199
- Labarthe, F., Gellinas, R., Des Rosiers, C. H. (2008):  
Medium-chain Fatty Acids as Metabolic Therapy in Cardiac Disease.  
*Cardiovasc. Drug. Ther.* **22**: 97-106
- Lallès, J. P., Boudry, G., Favier, C., Le Floch, N., Luron, I., Montagne, L., Oswald, I., Pié, S., Piel, C., Sève, B. (2004):  
Gut function and dysfunction in young pigs.  
*Anim. Res.* **53**: 301-316
- Lallès, J. P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C. R. (2007):  
Nutritional management of gut health in pigs around weaning.  
*Proc. Nutr. Soc.* **66**: 260-268
- Le Dividich, J., Sève, B. (2000):  
Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet.  
*Domest. Anim. Endocrinol.* **19**: 63-74
- Lehninger, A. L., Nelson D. L., Cox, M. M. (1994):  
Prinzipien der Biochemie.  
Spektrum Verlag
- Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona R. H., Boye, M., Møller, K. (2002):  
Culture-Independent Analysis of Gut Bacteria: The Pig Gastrointestinal Tract Microbiota Revisited.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 673-690
- Leśniewska, V., Pierzynowski, S. G., Johansen, H. N., Jensen, M. S., Jensen, B. B. (1998):  
Weaning of pigs: duodenal myoelectrical activity during the change from sow's milk to solid feed.  
*J. Anim. Feed Sci.* **7**: 267-270
- Li, D. F., Nelssen, J. L., Reddy, P.G., Blecha F., Hancock, J. D., Allee, G. L., Goodband, R. D., Klemm, R. D. (1990):  
Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig.  
*J. Anim. Sci.* **68**: 1790-1799
- Li, D. F., Nelssen, J. L., Reddy, P. G., Blecha F., Klemm, R. D., Giesting, D. W., Hancock, J. D., Allee, G. L., Goodband, R. D. (1991a):  
Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs.  
*J. Anim. Sci.* **69**: 3299-3307

Li, D. F., Nelssen, J. L., Reddy, P. G., Blecha F., Klemm, R. D., Goodband, R. D. (1991b):  
Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in  
early-weaned pigs.  
*J. Anim. Sci.* **69**: 4062-4069

Libertini, L. J., Smith, S. (1978):  
Purification and properties of a thioesterase from lactating rat mammary gland which  
modifies the product specificity of fatty acid synthetase.  
*J. Biol. Chem.* **253**: 1393-1401

Liebich, H. G. (2009):  
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Beruf.  
Schattauer Verlag, Stuttgart New York, 5. Auflage

Linde, A., Ross, C. R., Davis, E. G., Dib, L., Blecha, F. and Melgarejo, T. (2008):  
Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine.  
*J. Vet. Intern. Med.* **22**: 247-265

Lueck, E. (1980):  
Antimicrobial Food Additives.  
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

Lundquist, C., Baranov, V., Hammarström, S., Athlin, L., Hammarström, M. L. (1995):  
Intra-epithelial lymphocytes. Evidence for regional specialization and extrathymic T cell  
maturation in the human gut epithelium.  
*Int. Immunol.* **7**:1473-1487

Malinen, E. Kassinen, A., Rinttilä, T., Palva, A. (2003):  
Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot  
hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal  
bacteria.  
*Microbiol.* **149**: 269-277

Manners, M. J. (1976):  
The development of digestive function in the pig.  
*Proc. Nutr. Soc.* **35**: 49-55

Marion, J., Biernat, M., Thomas, F., Savary, G., Breton, Y., Zabielsky, R., Hueïrou- Luron, I.,  
Dividich, J. (2002):  
Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level  
of energy.  
*Reprod. Nutr. Dev.* **42**: 339-354

Marten, B., Pfeuffer, M. and Schrezenmeir, J. (2006):  
Medium-chain triglycerides (special issue: technological and health aspects of bioactive  
components in milk).  
*Int. Dairy J.* **16**: 1374-1382

- Messen, W., Goris, J., Dierick, N., Herman, L., Heyndrickx, M. (2010):  
Inhibition of *Salmonella typhimurium* by medium-chain fatty acids in an in vitro simulation of the porcine cecum.  
Vet. Microbiol. 24: 73-80
- Miller, H. M. und Slade, R. D. (2003):  
Digestive physiology of the weaned pig.  
In: Pluske J. R., Le Dividich J., Verstegen M. W., A. (Eds.), weaning the pig: concepts and consequences, pp.117-139,  
Wageningen Academic Publisher, Niederlande
- Montagne, L., Piel, C., M. S. and Lallès, J. P. (2004):  
Effect of Diet on Mucin Kinetics and Composition: Nutrition and Health Implications.  
Nutr. Rev. 62: 105-114
- Montagne, L., Boudry, G., Favier, C., Le Huërou- Luron, I., Lallès, J. P. (2007):  
Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning.  
Br. J. Nutr. 97: 45-57
- Moon, H. W., Schneider, R. A., Moseley, S. L. (1986):  
Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine.  
Am. J. Vet. Res. 47: 210-212
- Moseley, S. L., Hardy, J. W., Huq, J. L. (1983):  
Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*.  
Infect. Immun. 39: 1167-1174
- Mroz, Z., Jongbloed, A. W., Partanen, K. H., Vreman, K., Kemme, P. A. and Kogut, J. (2000):  
The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on dietary buffering capacity, apparent digestibility, retention of nutrients, and manure characteristics in swine.  
J. Anim. Sci. 78: 2622-2632
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M.: (2009):  
Janeway Immunologie  
Spektrum Akademischer Verlag, 7. Auflage: 432-442
- Nabuurs, M. J. A. (1995):  
Microbiological, structural and functional changes of the small intestine of the pigs at weaning.  
Pig News Info 16: 93N-97N
- Nagy, B., Fekete, P. (1999):  
Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals.  
Vet. Res. 30: 259-284

- Nagy, B., Fekete, P. (2005):  
Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in veterinary medicine.  
Int. J. Med. Microbiol. **295**: 443-454
- Nandy, S., Gangopadhyay, S. and Ghosh, S. (2005):  
Production of medium chain glycerides from coconut and palm kernel fatty acid distillates by lipase-catalyzed reactions.  
Enzyme Microb. Technol. **36**: 725-72
- Naumann, C. und Bassler, C. (2004):  
Die chemische Untersuchung von Futtermitteln 3. Aufl., 5. Ergänzungslieferung 2004.  
VDLUFA-Verlag, Darmstadt
- Newcomb, M. D., Harmon, D. L., Nelssen, J. L., Thulin, A. J., Allee, G. L. (1991):  
Effect of energy source fed to sows during late gestation on neonatal blood metabolite homeostasis, energy stores and composition.  
J. Anim. Sci. **69**: 230-236
- Odle, J., Benevenga, N. J., Crenshaw, T. D. (1989):  
Utilization of medium-chain triglycerides by neonatal piglets II: Effects of even- and odd-chain triglycerides consumption over the first 2 days of life on blood metabolites and urinary nitrogen excretion.  
J. Anim. Sci. **67**: 3340-3351
- Odle, J., Benevenga, N. J., Crenshaw, T. D. (1991 a):  
Utilization of medium-chain triglycerides by neonatal piglets: chain length of even- and odd-carbon fatty acids and apparent digestion/absorption and hepatic metabolism.  
J. Nutr. **121**: 605-614
- Odle, J., Benevenga, N. J., Crenshaw, T. D. (1991 b):  
Postnatal age and the metabolism of medium- and long- chain fatty acids by isolated hepatocytes from small-for-gestational-age and appropriate-for-gestational-age piglets.  
J. Anim. Nutr. **121**: 615-621
- Odle, J., Lin, X., Wieland, T. M. and Kempen, T. A. T. G. V. (1994):  
Emulsification and fatty acid length affect kinetics of <sup>14</sup>C-medium-chain triacylglycerol utilization by neonatal piglets.  
J. Nutr. **124**: 84-93
- Odle, J. (1997):  
New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model.  
J. Nutr. **127**: 1061-1067
- O'Neil, D. A., Porter, E. M., Elewaut, D., Anderson, G. M., Eckmann, L., Ganz, T., and Kagnoff, M. F. (1999):  
Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium.  
J. Immunol. **163**: 6718-6724

- Ooyama, K., Wu, J., Nosaka, N., Aoyama, T., Kasai, M. (2007)  
Combined Intervention of Medium-chain Triacylglycerol Diet and Exercise Reduces Body Fat Mass and Enhances Energie Expenditure in Rats.  
*J. Nutr. Sci. Vit.* **54**: 136-141
- Ostling, C. E., Lindgren, S. E. (1993):  
Inhibition of enterobacteria and Listeria growth by lactic, acetic and formic acids.  
*J. Appl. Bacteriol.* **75**: 18-24
- Overland, M., Granli, T., Kjos, N. P., Fjetland, O., Steien, S. H., Stokstad, M. (2000):  
Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs.  
*J. Anim. Sci.* **78**: 1875-1884
- Pabst, R. (1987):  
The anatomical basis for the immune function of the gut.  
*Anat. Embryol.* **176**: 135-144
- Pabst, R., Geist, M., Rothkötter, H. J. und Fritz, F. J. (1988):  
Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs.  
*Immunol.* **64**: 539-544
- Pabst, R. und Rothkötter, H. J. (1999):  
Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets.  
*Vet. Immunol. Immunopathol* **72**: 167-173
- Pacha, J. (2000):  
Development of Intestinal Transport Function in Mammals.  
*Physiol. Rev.* **80** (4): 1633-1667
- Partanen, K. H., Mroz, Z. (1999):  
Organic acids for performance enhancement in pig diets.  
*Nutrition Research Reviews* **12**: 117-145
- Partridge, G. G., Fisher, J., Gregory, H., Prior, S. G. (1992):  
Automated wet feeding of weaner pigs versus conventional dry feeding: effect on growth rate and food consumption.  
*Anim. Prod.* **54**: 484 (Abstr.)
- Pescovitz, M. D., Book, B. K., Aasted, B., Dominguez, J., Ezquerro, A., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Sver, L., Nielsen, J., Arn, S., Sachs, D. H., Lunney, J. K., Boyd, P. C., Walker, J., Lee, R., Davis, W., Barbosa, I. R., Zuckermann, F., Saalmüller, A. (1998):  
Summary of workshop findings for antibodies reacting with porcine T-cells and activation antigens: results from the Second International Swine CD Workshop.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **190**: 251-260

- Petschow, B., Batema, R., Talbott, R., Ford, L. (1998):  
Impact of medium-chain monoglycerides on intestinal colonisation by *Vibrio cholerae* or enterotoxigenic *Escherichia coli*.  
*J. Med. Microbiol.* **47**: 383-389
- Pierce, K. M., Sweeney, T., Brophy, P. O., Callan, J. J., Fitzpatrick, E., McCarthy, P. and O'Doherty, J. V. (2006):  
The effect of lactose and inulin on the intestinal morphology, selected microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the gastro-intestinal tract of weanling pig.  
*J. Anim. Sci.* **82**: 311-318
- Playoust, M. R. und Isselbacher, K. J. (1964):  
Studies on the intestinal absorption and intramucosal lipolysis of a medium-chain triglyceride.  
*J. Clin. Nutr.* **52**: 878-885
- Pluske, J. R., J., H. D., H., W. I. (1997):  
Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review.  
*Livest. Prod. Sci.* **51**: 215-236
- Pollmann, D. S., Danielson, D. M., Wren, W. B., Peo, E. R., Shahani, Jr. and K. M. (1980):  
Influence of *Lactobacillus Acidophilus Inoculum* on Gnotobiotic and Conventional Pigs.  
*J. Anim. Sci.* **51**: 629-637
- Puchal, A. A., and Buddington, R. K. (1992):  
Postnatal development of monosaccharide transport in pig intestine.  
*Am. J. Physiol.* **262** (Gastrointest. Liver Physiol. 25): G895-G902
- Radcliff, F. S., Zhang, Z., Kornegay, E. T. (1998):  
The effects of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn-soyabean meal-based diet for weanling piglets.  
*J. Anim. Sci.* **76**: 1880-1886
- Radecki, SV., Juhl, M. R. und Miller, E. R. (1988):  
Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrition balance.  
*J. Anim. Sci.* **66**: 2598-2605
- Ramirez, M., Amate, L., Gil, A. (2001):  
Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources.  
*Early Human. Dev.* **65** (suppl.): S95-S101
- Rampf, H. und Sammer, L. (2004):  
Organische Chemie. Grundwissen.  
Mentor Verlag, München
- Rasmussen, B. B., Holmback, U. C., Volpi, E., Morio-Liondore, B., Paddon-Jones, D. and Wolfe, R. R. (2002):  
Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle.  
*J. Clin. Invest.* **110**: 1687-1693

- Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L. & Palva, A. (2004):  
Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR.  
J. Appl. Microbiol. **97** (6): 1166-1177
- Risley, C. R., Kornegay, ET., Lindemann M. D. & Eigel W. N. (1992):  
Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs.  
J. Anim. Sci. **70**: 196-206
- Roth, F. X. und Kirchgessner, M.(1989a):  
Bedeutung von pH-Wert und Pufferkapazität des Futters für die Ferkelfütterung. 1. Mitteilung: pH-Wert und Pufferkapazität von Futtermischungen bei Einsatz von organischen Säuren.  
Landwirtschaftl. Forschung **42**: 157-167
- Roth, F. X. und Kirchgessner, M.(1989b):  
Bedeutung von pH-Wert und Pufferkapazität des Futters für die Ferkelfütterung. 3. Mitteilung: Effekt einer Erhöhung der Pufferkapazität des Futters durch Natrium- und Kaliumbicarbonat- Zusatz auf Wachstum und Futtermittelnutzung  
Landwirtschaftl. Forschung **42**: 176-182
- Roth, F. X., Kirchgessner, M., Eidelsburger, U. (1993):  
Zur nutritiven Wirksamkeit von Milchsäure in der Ferkelaufzucht.  
Agribiol. Res. **46**: 229-239
- Rothkötter, H. J., Ulbrich, H., Pabst, R. (1991):  
The Postnatal Development of Gut Lamina Propria Lymphocytes: Number, Proliferation, and T and B Cell Subsets in Conventional and Germ- Free Pigs.  
Ped. Res. **29**: 237-242
- Rothkötter, H. J., Kirchhoff, T., Pabst, R. (1994):  
Lymphoid and nonlymphoid cells in the epithelium and *Lamina propria* of the intestinal mucosa in pigs.  
Gut **35**: 1582-1589
- Rothkötter, H. J., Möllhof, S. und Pabst, R. (1999):  
The Influence of Age and Breeding Conditions on the Number and Proliferation of Intraepithelial Lymphocytes in Pigs.  
Scand. J. Immunol. **50**: 31-38
- Saalmüller, A., Reddehase, M. J., Bühring, H. J., Jonjic, S. and Koszinowski, U. H. (1987):  
Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes.  
Eur. J. Immunol. **17**: 1297-1301
- Saalmüller, A., Hirt, W., Maurer, S. und Weiland, E. (1994):  
Discrimination between two subsets of porcine CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen,  
Immunol. **81**: 578-583

Sakata, T., Kojima, T., Fujieda, M., Miyakozawa, M., Takahashi, M., Ushida, K. (1999):  
Probiotic preparations dose-dependently increase net production rates of organic acids and decrease that of ammonia by pig cecal bacteria in batch culture.  
Dig. Dis. Sci. **44**: 1485-1493

Sangild, P. T., Fowden, A. L., Trahair, J. F. (2000):  
How does foetal gastrointestinal tract develop in preparation for enteral nutrition after birth?  
Livest. Prod. Sci. **66**: 141-150

Sarda, P., Lepage, G., Roy, C. C., Chessex, P. (1987):  
Storage of medium-chain triglycerides in adipose tissue of orally fed infants.  
Am. J. Clin. Nutr. **45**: 399-405

Scharek, L., Altherr, B. J., Tölke, C., Schmidt, M. F. (2007):  
Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the intestinal immunity of piglets.  
Vet. Immunol. Immunopathol. **120** (3-4): 136-47

Schelhorn, M. (1951):  
Wirksamkeit und Wirkungsbereich chemischer Konservierungsmittel für Lebensmittel.  
Z. Lebensm. Unters. Forsch. **92**: 256-266

Schnabel, E., Schneider, R., Schubert, Ch. (1982):  
Untersuchungen zum pH-Wert im vorderen Trakt beim Absetzferkel.  
Arch. Tierernährg. **32**: 631-635

Selsted, M. E. und Oulette, A. J. (2005):  
Mammalian defensins in the antimicrobial immune response.  
Nat. Immunol. **6**: 551-557

Sheig, R. und Klatskin, G. (1968):  
Hepatic metabolism of 1-14 C octanoic and 1-14 C palmitic acids.  
J. Anim. Oil. Chem. Soc. **45**: 31-33

Sheu, C. W., Salomon, D., Simmons, J. L., Sreevalsan, T. and Freese, E. (1975):  
Inhibitory effects of lipophilic acids and related compounds on bacteria and mammalian cells.  
Antimicrob. Agents and Chemother. **7**: 349-363

Shirkey, T. W., Siggers, R. H., Goldade, B. G., Marshall, J. K., Drew, M. D., Laarveld, B.,  
Van Kessel, A. G. (2006):  
Effects of the Commensal bacteria on intestinal morphology and expression of  
proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig.  
Exp. Biol. Med (Maywood) **23** (8): 1333-45

Sidossis, L. S., Stuart, C. A., Shulman, G. I., Lopaschuk, G. D., Wolfe, R. R. (1996):  
Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the  
mitochondria.  
J. Clin. Invest. **98**: 2244-2250

Siljander-Rasi, H., Alaviuhkola, T., Suomi, K. (1998):  
Carbadox, formic acid and potato fibre as feed additives for growing pigs.  
J. Anim. Feed Sci. **7**: 205-209

- Sinkovics, G. Y., Juhász, B. (1974):  
DEVELOPMENT OF THE INTESTINAL FLORA IN SUCKLING PIGS.  
*Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* **24** (3): 375-381
- Smith, H. W., Jones, J. E. T. (1963):  
OBSERVATIONS ON THE ALIMENTARY TRACT AND ITS BACTERIAL FLORA IN  
HEALTHY AND DISEASED PIGS.  
*J. Path. Bact.* **86**: 387-412)
- Solano-Aguilar, G. I., Vengroski, K. G., Beshah, E., Douglass, L. W., Lunney, J. K. (2001):  
Characterization of lymphocyte subsets from mucosal tissue in neonatal swine.  
*Dev. Comp. Immunol.* **25**: 245-263
- Spreeuwenberg, M. A. M., Verdonk, J. M. A. J., Gaskins, H. R., Verstegen, M. W. A. (2001):  
Small Intestine Epithelial Barrier Function Is Compromised in Pigs with Low Feed Intake at  
Weaning.  
*J. Nutr.* **131**: 1520-1527
- Sprong, R. C., Hulstein, M. F., Van der Meer, R. (2001):  
Bactericidal activities of milk lipids.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1298-1301
- Stokes, C. R., Bailey, M., Haverson, K., Harris, C., Jones, P., Inman, C., Pie, S., Oswald, I. P.,  
Williams, B. A., Akkermans, A. D. L., Sowa, E., Rothkötter, H. J., Miller B. G. (2004):  
Postnatal development of the intestinal immune system in piglets: implications for the process  
of the weaning.  
*Anim. Res.* **53**: 325-334
- Sun, C. Q., O'Connor, C. J., Robertson, A. M. (2002):  
The antimicrobial properties of milkfat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase.  
*Chem. Biol. Interact.* **140**: 185-198
- Takase, S. und, Goda, T. (1990):  
Effects of medium-chain triglycerides on brush border membrane-bound enzyme activity in  
rat small intestine.  
*J. Nutr.* **120**: 969-976
- Tanaka, S., Saitoh, O., Tabata, K., Matsuse, R., Kojima, K., Sugi, K., Nakagawa, K.,  
Kayazawa, M., Teranishi, T., Uchida, K., Hirata, I. and Katsu, K. (2001):  
Medium-chain fatty acids stimulate interleukin-8 production in Caco-2 cells with different  
mechanisms from long-chain fatty acids.  
*J. Gastroenterol. Hepatol.* **16**: 748-754
- Tang, M., Laarveld, B., Van Kessel, A. G., Hamilton, D. L., Estrada, A. and Patience, J. F.  
(1999):  
Effect of segregated early weaning on postweaning small intestinal development in pigs.  
*J. Anim. Sci.* **77**: 3191-3200

- Taylor, W. H. (1959):  
Studies on gastric proteolysis. 1. The proteolytic activity of human gastric juice and pig and calf gastric mucosal extracts below pH 5.  
Biochem. J. **71**: 73-83
- Thacker, P. A. and Bowland, J. P. (1980):  
Influence of graded levels of dietary propionic acid on performance and carcass traits of swine fed diets supplemented with soyabean meal or canola meal.  
Can. J. Anim. Sci. **60**: 971-978
- Traul, K. A., Driedger, A., Ingle, D. L., Nakashi, D. (2000):  
Review of the toxicologic properties of medium- chain triglycerides.  
Food. Chem. Toxicol. **38**: 79-98
- Turner, N., Hariharan, K., Tiding, J., Frangioudakis, G., Beale, S. M., Wright, L. E., Zeng, X. Y., Leslie, S. J., Li, J. Y., Kraegen, E. W., Cooney, G. J., Ye, J. M. (2009):  
Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species dependent: potent tissue-specific effects of medium-chain fatty acids.  
Diabetes **58**: 2547-2554
- Tsiloyiannis, V. K., Kyriakis, S. C., Vlemmas, J., Sarris, K. (2001):  
The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning Diarrhöea.  
Res Vet Sci. **70**: 287-293
- Tsuchido, T., Hiraoka, T., Takano, M., Shibasaki, I. (1985):  
Involvement of autolysin in cellular lysis of *Bacillus subtilis* induced by short- and medium-chain fatty acids.  
J. Bacteriol. **162**: 42-46
- Vahjen, W., Taras, S., Simon, O. (2007):  
Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 on cell numbers of total *Enterococcus* spp., *E. faecium* and *E. faecalis* in the intestine of piglets.  
Curr. Issues Inest. Microbiol. **8** (1): 1-7
- Valdivieso, V. (1972):  
Absorption of medium-chain triglycerides in animals with pancreatic atrophy.  
Am. J. Dig. Dis **17**: 129-36
- Van Dijk, A. J., Niewold, T. A., Margry, R. J. C. F., Van Den Hoven, S. G. C., Nabuurs, M. J. A., Stockhofe-Zurwieden, N., Beynen, A. C. (2001):  
Small intestinal morphology in weaned piglets fed a diet containing spray-dried porcine plasma.  
Res. Vet. Sci. **73**: 12-22
- Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. (2006):  
The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy.  
Avian Pathol. **35** (3): 182-188

- Van Kempen, T. A. and Odle, J. (1993):  
Medium-chain fatty acid oxidation in colostrum-deprived newborn piglets: stimulative effect of L-carnitine supplementation.  
*J. Nutr.* **123**: 1531-1537
- Vega-Lopez, M. A, Bailey, M., Stevens, K. and Stokes, C. R. (1993):  
Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **37**: 49-60
- Vega-Lopez, M. A., Bailey, M, Telemo, E., Stokes, C. R. (1995):  
Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **44**: 319-327
- Vega-Lopez, M. A., Arenas-Contreras, G., Bailey, M., Gonzales-Pozos, S., Stokes, C. R., Ortega, M. G. and Mondragon-Flores (2001):  
Development of Intraepithelial Cells in the Porcine Small Intestine.  
*Develop. Immunol.* **8**: 147-158
- Visek, W. J. (1972):  
Effects of urea hydrolysis on cell life-span and metabolism.  
*Fed. Proc.* **31**: 1178-1193
- Waldmann, K. H. und Wendt, M. (2004):  
Lehrbuch der Schweinekrankheiten  
Parey Verlag, Stuttgart, 4. Auflage
- Walsh, M. C., Sholly, D. M., Hinson, R. B., Saddoris, K. L., Sutton, A. L., Radcliff, J. S., Odgarrd, R., Murphy, J. and Richert, B. T. (2007):  
Effects of water and diet acidification with and without antibiotics on weanling pig growth and microbial shedding.  
*J. Anim. Sci.* **85**: 1799-1808
- Wang, J., Wu, X., Simonavicius, N., Tian, H., Ling, L. (2006):  
Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84.  
*J. Biol. Chem.* **281**: 34457-34464
- Williams, I. H. (2003):  
Growth of the weaned pig.  
In: Pluske J. R., Le Dividich J., Verstegen M. W., A. (Eds.), weaning the pig: concepts and consequences, pp. 17-31
- Witter, R. C., Rook, J. A. F. (1970):  
The influence of the amount and nature of dietary fat on milk fat composition in the sow.  
*Br. J Nutr.* **24**: 749-760
- Wojtczak, L. and Schonfeld, O. (1993):  
Effect of fatty acids on energy coupling process in mitochondria.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1183**: 41-57

- Woolford, M. K. (1975):  
Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1-C12) as potential silage additives.  
J. Sci. Food Agric. **26**: 219-228
- Xu, R. J., Mellor, D. J., Tungthanathanich, P., Birtles, M. J., Reynolds, G.W., Simpson, H. V. (1992):  
Growth and morphological changes in the small and the large intestine in piglets during the first three days after birth.  
J. Dev. Physiol. **18**: 161-172
- Yang, H. and Parkhouse, R. M. (1996):  
Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues.  
Immunol. **89**:45-52
- Yang, H. and Parkhouse, R. M. (2000):  
Characterization of the porcine gammadelta T-cell receptor structure and cellular distribution by monoclonal antibody PPT27.  
Immunol. **99**: 504-509
- Young, F. V. K. (1983):  
Palm kernel and coconut oils: analytical characteristics, process technology and uses.  
J. Am. Oil Chem. Soc. **60**: 374-379
- Zabielski, R., Godlewski, M. M., Guilloteau, P. (2008):  
CONTROL OF DEVELOPMENT OF GASTROINTESTINAL SYSTEM IN NEONATES:  
J. Physiol. Pharmacol. **59** (Suppl 1): 35-54
- Zhang, H., Malo, C., Buddington, R. K. (1997):  
Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn pigs.  
J. Nutr. **127**: 418-426
- Zhu, C., Harel, J., Jaques, M., Desautels, C., Donnenberg, M. S., Boudry, M. And Fairbrother, J. M. (1994):  
Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea.  
Infect. Immun. **62**: 4153-4159
- Zuckermann, F. A. and Husmann, R. J. (1996):  
Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells.  
Immunol. **87**: 500-512

## 9. Anhang

**Tabelle 43:** Bewertungsschema des Gesundheitszustands aller Versuchstiere (Buchheit 2009)

Bewertungsparameter	Kriterien	Scoring	
Konsistenz der Fäces	flüssige Fäces, Diarrhöe	1	
	Mischung aus größtem Anteil flüssiger Faeces	2	
	geformte Faeces, aber sehr weich	3	
	geformte und trockene Faeces, aber nicht hart	4	
	geformte, trockene, harte Faeces	5	
Körperhaltung	aufrecht, belastet alle 4 Gliedmaße gleichmäßig	1	
	Unphysiologisch (mit Beschreibung)	2	
Verhalten	apathisch	1	
	matt	2	
	ruhig und aufmerksam	3	
	übererregt	4	
	Excitationen	5	
Ernährungszustand	sehr gut (adipös)	1	
	gut	2	
	mäßig	3	
	schlecht	4	
	sehr schlecht (kachektisch)	5	
Entwicklungszustand	Kümmerer	1	
	Alter und Rasse entsprechend	2	
	für Alter und Rasse überentwickelt	3	
Pflegezustand	Haare: Glatt, anliegend, mattglänzend, unversehrt, geschlossen Haut: glatt, leicht glänzend, blassrosa, ohne Auflagerungen und Effloreszenzen	1	
	Haare: glatt, anliegend, stumpf, ggr. versehrt (Scheuerstellen), ggr. Borstenausfall, ggr. Verfärbung der Borsten Haut: ggr. rau, stumpf, blassrosa, ggr. Auflagerungen bzw. Effloreszenzen	2	
	Haare: struppig, stumpf, mgr. bis hgr. versehrt, großflächiger Ausfall oder übermäßig lange Borsten oder starke Verfärbungen der Borsten Haut: rau, stumpf, starke Farbabweichungen, starke Auflagerungen bzw. Effloreszenzen	3	
	Allgemeinbefinden	ungestört	1
		geringgradig gestört	2
mittelgradig gestört		3	
hochgradig gestört		4	

**Tabelle 44:** Auswertung des Gesundheitszustandes der Ferkel der verschiedenen Fütterungsgruppen für jede Versuchswoche anhand des festgelegten Bonitierungsschlüssels (Mittelwert und Standardabweichung)

	<b>-KOS</b>		<b>+KOS</b>		<b>P-Wert</b>		
	-MKFS (n=24)	+MKFS (n=22)	-MKFS (n=24)	+MKFS (n=24)	KOS	MKFS	KOS x MKFS
<b>Konsistenz der Fäces</b>							
1. Woche	3,92 ± 1,06	3,73 ± 0,83	4,00 ± 0,72	3,67 ± 0,64	0,946	0,118	0,667
2. Woche	3,67 ± 0,48	3,86 ± 0,35	3,79 ± 0,42	3,83 ± 0,38	0,569	0,151	0,350
3. Woche	4,00 ± 0,42	4,00 ± 0,44	3,75 ± 0,44	3,92 ± 0,50	0,068	0,361	0,361
4. Woche	3,83 ± 0,38	3,91 ± 0,29	3,92 ± 0,28	3,75 ± 0,44	0,600	0,529	0,093
<b>Körperhaltung</b>							
1. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
2. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
3. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
4. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
<b>Verhalten</b>							
1. Woche	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	-	-	-
2. Woche	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	-	-	-
3. Woche	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	-	-	-
4. Woche	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	-	-	-
<b>Ernährungszustand</b>							
1. Woche	1,96 ± 0,20	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	0,318	0,318	0,318
2. Woche	2,04 ± 0,20	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	0,318	0,318	0,318

**Tabelle 44:** Fortsetzung

3. Woche	2,04 ± 0,24	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	0,318	0,318	0,318
4. Woche	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	-	-	-
<b>Entwicklungszustand</b>							
1. Woche	1,96 ± 0,20	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	0,318	0,318	0,318
2. Woche	2,04 ± 0,20	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	-	-	-
3. Woche	2,04 ± 0,24	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	0,318	0,318	0,318
4. Woche	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	-	-	-
<b>Pflegezustand</b>							
1. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
2. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
3. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
4. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
<b>Allgemeinbefinden</b>							
1. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
2. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
3. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
4. Woche	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-

KOS = kurzkettige organische Säuren (Fumar- und Milchsäure); MKFS = mittelkettige Fettsäuren (Capryl- und Caprinsäure); *P* = Überschreitungswahrscheinlichkeit; n = Anzahl der gültigen Fälle

**Tabelle 45:** Für die qPCR verwendete Referenzstämme zur Bestimmung der Laktobazillen

Kalibrierreihe	Stamm	Zellen /g Kot
Lacto I	DSM 7378 <i>Weissella hellenica</i>	2,00E+09
Lacto I	DSM 20196 <i>Weissella confusa</i>	2,00E+09
Lacto I	DSM 20045 <i>Lactobacillus brevis</i>	2,00E+09
Lacto I	DSM 20100 <i>Lactobacillus bifidus</i>	2,00E+09
Lacto I	DSM 20174 <i>Lactobacillus plantarium</i>	2,00E+09
Lacto II	DSM 20021 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2,00E+09
Lacto II	DSM 20052 <i>Lactobacillus fermentum</i>	2,00E+09
Lacto II	DSM 5837 <i>Lactobacillus vaginalis</i>	1,52E+09
Lacto II	DSM 13345 <i>Lactobacillus mucosae</i>	2,00E+09
Lacto II	DSM 20602 <i>Lactobacillus animalis</i>	7,85E+08
Lacto III	DSM 20555 <i>Lactobacillus salivarius</i>	2,00E+09
Lacto III	DSM 20016 <i>Lactobacillus reuteri</i>	2,00E+09
Lacto III	DSM 20057 <i>Lactobacillus buchneri</i>	1,86E+09
Lacto III	DSM 20509 <i>Lactobacillus agilis</i>	2,00E+09
Lacto III	DSM 15833 <i>Lactobacillus equi</i>	2,00E+09
Lacto IV	DSM 20074 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2,00E+09
Lacto IV	DSM 4864 <i>Lactobacillus oris</i>	2,00E+09
Lacto IV	DSM 20452 <i>Lactobacillus murinus</i>	2,00E+09
Lacto IV	DSM 20082 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	2,00E+09
Lacto IV	DSM 20243 <i>Lactobacillus gasseri</i>	2,00E+09
Lacto V	DSM 6035 <i>Lactobacillus panis</i>	2,00E+09
Lacto V	DSM 20079 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,34E+09
Lacto V	DSM 10532 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	2,00E+09
Lacto V	DSM 10533 <i>Lactobacillus johnsonii</i>	2,00E+09
Lacto V	DSM 20531 <i>Lactobacillus amylovorus</i>	2,00E+09
Lacto VI	DSM 20011 <i>Lactobacillus casei</i>	1,86E+09
Lacto VI	DSM 11664 <i>Lactobacillus amylolyticus</i>	7,93E+08
Lacto VI	DSM 5661 <i>Lactobacillus hamsteri</i>	2,00E+09
Lacto VI	DSM 20557 <i>Lactobacillus jensenii</i>	8,20E+08
Lacto VI	DSM 20584 <i>Lactobacillus crispatus</i>	2,00E+09
Lacto VI	DSM 20403 <i>Lactobacillus ruminis</i>	2,00E+09
Lacto VI	DSM 8475 <i>Lactobacillus pontis</i>	1,06E+09
Lacto VII	DSM 20176 <i>Lactobacillus hilgardii</i>	2,00E+09
Lacto VII	DSM 20249 <i>Lactobacillus alimentarius</i>	2,00E+09
Lacto VII	DSM 20184 <i>Lactobacillus farciminis</i>	2,00E+09
Lacto VII	DSM 20505 <i>Lactobacillus sharpeae</i>	2,00E+09

**Tabelle 46:** Für die qPCR verwendeten Referenzstämme zur Bestimmung der Enterobakterien

Kalibrierreihen	Stamm	Zellen /ml
Entero Mix I	DSM <i>Escherichia coli</i> PS 37	1,00E+10
Entero Mix I	DSM <i>Escherichia coli</i> PS 79	1,00E+10
Entero Mix I	DSM <i>Escherichia coli</i> PS 90	1,00E+10
Entero Mix I	DSM <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,00E+10
Entero Mix II	DSM <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i>	1,00E+10
Entero Mix II	DSM <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Livingston</i>	1,00E+10
Entero Mix II	DSM <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Mbandaka</i>	1,00E+10
Entero Mix II	DSM <i>Pantoea agglomerans</i>	1,00E+10
Entero Mix III	DSM <i>Serratia marcescens</i>	1,00E+09
Entero Mix III	DSM <i>Yersinia enterocolitica</i>	1,00E+09
Entero Mix III	DSM <i>Proteus vulgaris</i>	1,00E+09
Entero Mix III	DSM <i>Enterobacter cloacae</i>	1,00E+09

Für die MPCR verwendete Positiv-/Negativkontrollen:

DNA aus: Stammsammlung *E. coli* Nr. 7 (E coli 0138:K81),  
positiv für stx2e, est-Ib, estII, fedA

Stammsammlung *E. coli* Nr. PS79 (E. coli 0147:K89:K88),  
positiv für fae, est-Ib, elt-Ia

Stammsammlung *E. coli* Nr. PS90 (E. coli CS2011),  
positiv für fas, est-Ib, est-II

Stammsammlung *E. coli* Nr. PS37 (E. coli 09:K35:K99),  
positiv für fan, est-Ib, (est-II, fedA)

*E. coli* DSM Stamm 4779

## Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurde bereits auf folgenden Tagungen präsentiert:

### **65. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie**

*Göttingen 15.-17. März 2011*

Ferrara, F., Pieper, R., Vahjen, W., Zentek, J. (2011):

Influence of short chain and medium fatty acids on the gastrointestinal microbial ecology of weaned piglets.

Proc. Soc. Nutr. Physiol. **20**:104

### **6. Doktorandensymposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin**

*Berlin 1. Juli 2011*

Ferrara, F., Pieper, R., Vahjen, W., Zentek, J. (2011):

Einfluss von kurzkettigen organischen Säuren sowie mittelkettigen Fettsäuren auf die intestinale mikrobielle Besiedlung bei Absetzferkeln.

6. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Sciences“

Teile des Literaturkapitels wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Zentek, J., Buchheit-Renko, S., Ferrara, F., Vahjen, W., Van Kessel, A. G. and Pieper, R. (2011):

Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets.

Anim. Health Res. Rev. **12 (1)**: 83-93

Zentek, J., Buchheit, S., Ferrara, F., Pieper, R., Männer, K., Vahjen, W. (2011):

Mittelkettige Fettsäuren in der Fütterung von Ferkeln.

Klauentierpraxis, die Zeitschrift der Österreichischen Buiatrischen Gesellschaft

**19.** Jahrgang: 91-93

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Jürgen Zentek**, der mir die interessante Thematik vertrauensvoll überlassen hat und mir die notwendige Freiheit zur Bearbeitung meiner Fragestellungen ermöglichte. Für die Bereitstellung eines Stipendiums mit Hilfe der Firma Vitamex möchte ich mich außerdem bei ihm bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Wilfried Meyer** für die Aufnahme im Kreise „seiner Doktoranden“ bedanken. Den Abschluss der Arbeit hat er einerseits durch seine fachliche Unterstützung, andererseits durch den stets fürsorglichen Beistand vorangetrieben („wir gehen da einfach pragmatisch vor...“).

Bei Herrn **Prof. Dr. Klaus Männer** möchte ich mich bedanken für die unglaubliche Hilfsbereitschaft bei der Organisation meiner Versuchszeit, für den selbstverständlichen Abholdienst meiner Ferkel und der Rettung meines Versuchsfutters.

Frau **Prof. Dr. Plendl** danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor. Für die Hilfe bei der Planung und Durchführung der histologischen Arbeiten bedanke ich mich insbesondere bei Frau **Karin Briest** und Frau **Barbara Drewes**.

Dem Land Berlin danke ich für die finanzielle Unterstützung durch das **Else-Neumann-Stipendium**.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Wilfried Vahjen**. Durch seine unermüdliche („du störst doch nie“) und kompetente Unterstützung hat er maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Dank seiner Hilfe habe ich selbst den Gefallen an statistischer Auswertung gefunden.

Für die notwendige und stets konstruktive (auch am Wochenende) Hilfestellung während meiner Doktorandenzeit möchte ich mich bei **Robert Pieper** bedanken. Für den aktiven Einsatz sowie für die fröhlichen Einlagen während der „Großkampftage“ danke ich ihm besonders.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung. Alle namentlich zu nennen würde an dieser Stelle den Rahmen sprengen, doch habt ihr alle einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, Danke! **Rainer Jokiel** danke ich insbesondere für die technische Unterstützung und die vielen Süßigkeiten, die so manchen Tag gerettet haben. Frau **Manuela Sarnow** danke ich für die stets freundliche Hilfe und die tägliche Morgenpost für Emil. **Ingo Starke** danke ich für die kompetente Hilfe bei der Bearbeitung (und Suche...) meiner PCR-Proben und Erstellung von Graphiken.

Den Tierpflegern **Corinna Schmidt**, **Ines Bebert**, **Sandra Fischer** und **Werner Adler** danke ich für die Versorgung meiner Jungs und den für alle selbstverständlichen Einsatz während der „Großkampftage“.

Den Laborfeen **Anett Kriesten**, **Katharina Topp** und **Maria Eitinger** bin ich unglaublich dankbar für die immerwährende großartige Unterstützung (hier alles aufzuzählen würde bestimmt eine ganze Seite einnehmen...), die leckeren Mittagessen und motivierenden Gespräche. Ihr seid einfach toll!

Bei **Lydia Tedin** und **Petra Huck** möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die Durchführung der durchflusszytometrischen Arbeiten, die während der Sektionstagen doch zu einigen Überstunden führten. Lydia danke ich außerdem für die tolle Bürozeit, die konstruktiven fachlichen- und persönlichen Gespräche werde ich ganz doll vermissen!

**Susan Kröger** danke ich für ihren Einsatz während der Großkampftage sowie der selbstverständlichen Vertretung bei der Betreuung meiner Jungs. Ganz besonders möchte ich mich für das stets offene Ohr bedanken.

**Anneluise Mader** und **Fanny Knorr** danke ich für die aktive Unterstützung und die vielen wertvollen Gespräche die mir besonders in den vergangenen Monaten sehr viel Trost gespendet haben. **Fanny** und **Jorja** danke ich für die gemeinsame Zeit während unserer Hunderunden.

**Jana Germer** danke ich für die geduldige Einarbeitung in die PCR-Methodik und wunderbaren Mädchen-Abende. **Lena Martin** danke ich für den spontanen Einsatz während der „Großkampftage“ und der Übertragung positiver Energie! Bei beiden möchte ich mich für das Verständnis und den geleisteten Beistand während der letzten Monate bedanken!

**Ilen Röhe** danke ich für die unerschöpflichen und motivierenden Worte während des Zieleinlaufs...

**Linda Oelschläger, Svenja Wabnitz, Emily Northrup, Christine Bächlein, Betty Pothoff, Tanja Bauer, Isabel Hornickel** und **Caroline Maahs** danke ich für die wundervollen Erinnerungen an unserer gemeinsamen Studienzeit und den verständnisvollen Beistand während der letzten Monate. Bei **Caroline** bedanke ich mich zutiefst für den aufmunternden Zuspruch („alles wird gut“), der aktiven mehrfachen Umzugshilfe (an dieser Stelle einen großen Dank auch an **Martin Plötner**) und der tiefen Freundschaft trotz der Entfernung.

Meinen Freunden **Mandy** und **Basti Carnarius** sowie **Janina Radwainski** und **Matti Dullek** danke ich für die entspannenden Mädels-Runden (mit ein paar halben Gläsern Wein...), den vielen aufbauenden Gesprächen und erholsamen Hunderunden mit **Chaja** und **Nabo**.

**Emilia, Alicia, Leonas, Julius und Niklas** danke ich dafür, dass sie mir immer wieder den Blick für das Wesentliche im Leben schärfen.

Bei meiner Freundin **Hanna Schöpfer** bedanke ich mich von ganzem Herzen für das Bestehen unserer Freundschaft trotz der großen Distanz und die stets ehrlichen Gespräche, die mich immer wieder vorangetrieben haben.

Meiner Freundin **Jenny Offinger** danke ich zutiefst für die lange Freundschaft, in der das Verstehen ohne Worte selbstverständlich geworden ist.

Meiner Freundin **Ami Lang, Joey** und **Emil** danke ich für die unvergessliche Zeit als Vierergespann. **Ami**, ohne deine tatkräftige Unterstützung in jeglicher Hinsicht (egal zu welcher Zeit...) und tröstenden Worte („das kriegen wir schon hin“) hätte ich wohl die letzten Monate nicht überstanden...Danke! Meinem **Emil** danke ich dafür, dass er bei mir ist und er durch seinen ganz besonderen Charme jeden Tag besonders macht.

Meinen Freundinnen aus der Heimat insbesondere **Mirian Menendez** und **Isabel Schweizer** danke ich für die langjährige Freundschaft und die Gewissheit euch immer an meiner Seite zu wissen.

Meinem **Bruder Dario** danke ich für die großartige Unterstützung bei der Organisation meines Umzugs nach Berlin und den hilfreichen Gesprächen bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Der größte Dank aber gilt meinen **Eltern**, die mich mit Ihrer Liebe, Zuversicht und mit ihrem Glauben an mich durch mein Leben getragen haben. Meinem **Papa** danke ich für die gemeinsame Zeit, die viel zu früh beendet wurde. Meiner **Mama** bin ich unendlich dankbar für den bedingungslosen Rückhalt in der bisher schwierigsten Zeit meines Lebens. Deine schützende Hand schenkt mir immer wieder Ruhe und Geborgenheit, ich liebe dich und bin froh, dass es dich gibt.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 23.02.2012

.....  
Fabienne Ferrara