

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

**Untersuchungen zur Wirkung pflanzlicher
Futterzusatzstoffe auf verdauungsphysiologische,
mikrobiologische und immunologische Parameter
bei Absetzferkeln**

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

vorgelegt von
STEFANIE GÄRTNER
Tierärztin
aus Brandenburg/ Havel

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3511

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jurgen Zentek
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Angelika Richter
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

piglets, feed additives, plants, fenugreek, Glycyrrhiza, Escherichia coli,
Salmonella Typhimurium, adhesion, growth analysis, immune system,
immunization, lymphocytes, antibodies, flow cytometry, photometry

Tag der Promotion: 10.10.2011

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: 978-3-86387-041-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

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 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I | INHALTSVERZEICHNIS | |
| II | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | |
| III | SYMBOLVERZEICHNIS | |
| IV | TABELLENVERZEICHNIS | |
| V | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | |
| | | |
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| | | |
| 2. | LITERATUR | 3 |
| 2.1. | Die Absetzphase | 3 |
| 2.1.1. | Die Auswirkungen des Absetzens auf die morphologische und verdauungsphysiologische Entwicklung des Gastrointestinaltraktes | 4 |
| 2.1.2. | Die intestinale Mikrobiota des Schweins und die Auswirkungen des Absetzens auf die Intestinalflora und deren metabolische Aktivität | 5 |
| 2.1.3. | Das Immunsystem des Schweins und die Auswirkungen des Absetzens für die Entwicklung des Immunsystems | 8 |
| 2.1.3.1. | Das Immunsystem des Schweins | 8 |
| 2.1.3.2. | Das darmassoziierte Immunsystem des Schweins | 10 |
| 2.1.4. | Gastrointestinale Erkrankungen nach dem Absetzen | 13 |
| 2.2. | Pflanzliche Futterzusatzstoffe | 13 |
| 2.2.1. | Einsatz pflanzlicher Zusatzstoffe in der Tierernährung | 15 |
| 2.2.1.1. | Einflüsse auf die Leistungsparameter | 15 |
| 2.2.1.2. | Einflüsse auf die intestinale Mikrobiota | 17 |
| 2.2.1.3. | Einflüsse auf das Immunsystem | 23 |
| 2.3. | Ziel der Arbeit | 28 |
| | | |
| 3. | MATERIAL UND METHODEN | 30 |
| 3.1. | <i>In vitro</i>-Untersuchungen | 30 |
| 3.1.1. | Einfluss von Pflanzenextrakten auf die zelluläre Interaktion zwischen einem enteropathogenen <i>E. coli</i> -Stamm und einer IPEC-J2 Zelllinie | 32 |
| 3.1.2. | Bindungskapazität pflanzlicher Substanzen gegenüber einem enteropathogenen <i>E. coli</i> -Stamm | 38 |
| 3.1.3. | Konzentrationseinfluss pflanzlicher Substanzen auf das Wachstumsverhalten eines enteropathogenen <i>E. coli</i> Stamms | 41 |
| 3.2. | Fütterungsversuch | 43 |
| 3.2.1. | Tierexperimentelle Methoden | 43 |
| 3.2.2. | Futtermitteluntersuchung | 46 |
| 3.2.2.1. | Bestimmung der Rohnährstoffe (Weender-Analyse) | 47 |
| 3.2.2.2. | Mineralstoffbestimmung | 48 |
| 3.2.2.3. | Chrom-III-oxid-Bestimmung | 48 |
| 3.2.2.4. | Überprüfung der Mischgenauigkeit | 49 |
| 3.2.3. | Versuchsdurchführung | 50 |
| 3.2.3.1. | Leistungsparameter | 50 |
| 3.2.3.2. | Blutentnahme | 51 |
| 3.2.3.3. | Immunisierung | 51 |
| 3.2.3.4. | Gewinnung von Probenmaterial | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.4. Immunologische Methoden | 53 |
| 3.2.4.1. Differentialblutbild und hämatologische Untersuchungen | 53 |
| 3.2.4.2. Markierung der Immunzellen und Ermittlung des Phänotyps im Durchflusszytometer | 54 |
| 3.2.4.3. Stimulation von peripheren Blutlymphozyten | 58 |
| 3.2.4.4. Messung der Phagozytoseaktivität mononukleärer Zellen aus dem Blut | 61 |
| 3.2.4.5. Bestimmung von Haptoglobin im Serum | 63 |
| 3.2.4.6. Bestimmung der <i>Salmonella</i> -spezifischen Immunglobulin-konzentrationen (IgG, IgM, IgA) im Serum | 64 |
| 3.2.5. Verdauungsphysiologische Methoden | 67 |
| 3.2.5.1. Bestimmung des pH-Werts des Chymus | 67 |
| 3.2.5.2. Bestimmung der Trockensubstanz in der Digesta und im Kot | 67 |
| 3.2.5.3. Bestimmung der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins | 67 |
| 3.2.5.4. Bestimmung der D- und L-Laktatkonzentration in der Digesta | 68 |
| 3.2.5.5. Bestimmung der Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren in der Digesta | 69 |
| 3.3. Statistische Auswertungen | 70 |
| 4. ERGEBNISSE | 71 |
| 4.1. <i>In vitro</i>-Untersuchungen | 71 |
| 4.1.1. Einfluss der Pflanzenextrakte auf die zelluläre Interaktion zwischen eine enteropathogenen <i>E. coli</i> -Stamm und einer IPEC-J2 Zelllinie | 71 |
| 4.1.2. Bindungskapazität pflanzlicher Substanzen gegenüber einem <i>E. coli</i> -Stamm | 72 |
| 4.1.3. Einfluss der Konzentration pflanzlicher Substanzen auf das Wachstumsverhalten eines <i>E. coli</i> Stamms | 73 |
| 4.2. Fütterungsversuch | 75 |
| 4.2.1. Leistungsparameter | 75 |
| 4.2.1.1. Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere während des Versuchs | 75 |
| 4.2.1.2. Lebendmasse und Lebendmassezunahme | 75 |
| 4.2.1.3. Futteraufnahme und Futteraufwand | 75 |
| 4.2.2. Hämatologische und immunologische Parameter | 76 |
| 4.2.2.1. Hämatologie | 76 |
| 4.2.2.2. Phänotypisierung der peripheren Blutleukozyten | 77 |
| 4.2.2.3. Phänotypisierung der intraepithelialen Leukozyten des proximalen Jejunums | 79 |
| 4.2.2.4. Proliferation peripherer Blutlymphozyten | 81 |
| 4.2.2.5. Phagozytoseaktivität peripherer Granulozyten und Monozyten | 82 |
| 4.2.2.6. Konzentration von Haptoglobin im Serum der Ferkel | 83 |
| 4.2.2.7. Konzentration spezifischer Antikörper gegen <i>Salmonella</i> Typhimurium | 83 |
| 4.2.3. Verdauungsphysiologische Parameter | 88 |
| 4.2.3.1. pH-Werte der Digesta | 88 |
| 4.2.3.2. Trockensubstanzgehalt der Digesta | 88 |
| 4.2.3.3. Scheinbare Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins | 89 |
| 4.2.3.4. D- und L-Laktat | 89 |
| 4.2.3.5. Kurzkettige Fettsäuren | 90 |

| | |
|--|------------|
| 5. DISKUSSION | 94 |
| 5.1. Kritik der Methoden | 94 |
| 5.1.1. Aufbereitung der pflanzlichen Testmaterialien | 94 |
| 5.1.2. <i>In vitro</i> -Methoden | 95 |
| 5.1.2.1. IPEC-J2-Zellkulturmodell zur Beurteilung des Einflusses auf die bakterielle Adhäsion | 95 |
| 5.1.2.2. Modell der Beschichtung von Oberflächen mit Pflanzenmaterialien zur Ermittlung der pflanzlichen Bindungskapazität gegenüber dem <i>E. coli</i> -Stamm | 96 |
| 5.1.2.3. Methode zur Bestimmung direkter antimikrobieller Effekte | 97 |
| 5.1.3. Versuchdesign | 97 |
| 5.1.3.1. Probenmaterial und Untersuchungsmethoden | 98 |
| 5.2. Diskussion der Ergebnisse | 100 |
| 5.2.1. Einfluss der pflanzlichen Substanzen auf die Adhäsion eines enteropathogenen <i>E. coli</i> -Stamms an eine IPEC-J2 Zelllinie | 100 |
| 5.2.2. Bindungskapazität pflanzlicher Substanzen gegenüber dem enteropathogenen <i>E. coli</i> -Stamm | 102 |
| 5.2.3. Einfluss verschiedener Konzentrationen der pflanzlichen Substanzen auf das bakterielle Wachstum des <i>E. coli</i> -Stamms | 103 |
| 5.2.4. Hämatologische und immunologische Parameter der Ferkel | 104 |
| 5.2.4.1. Hämatologie und Differenzialblutbild | 104 |
| 5.2.4.2. Phänotypisierung der peripheren Bluteukozyten im Blut der Ferkel | 104 |
| 5.2.4.3. Phänotypisierung der intraepithelialen Leukozyten im proximalen Jejunum der Ferkel | 106 |
| 5.2.4.4. Proliferation peripherer Blutlymphozyten im Blut der Ferkel | 107 |
| 5.2.4.5. Phagozytoseaktivität peripherer Granulozyten und Monozyten im Blut der Ferkel | 108 |
| 5.2.4.6. Konzentration von Haptoglobin im Serum der Ferkel | 109 |
| 5.2.4.7. Konzentration spezifischer Antikörper gegen <i>Salmonella</i> Typhimurium im Serum der Ferkel | 110 |
| 5.2.5. Leistungen und verdauungsphysiologische Parameter der Ferkel | 112 |
| 5.2.5.1. Lebendmasse und Tageszunahmen | 112 |
| 5.2.5.2. Futteraufnahme der Ferkel | 114 |
| 5.2.5.3. Futteraufwand | 114 |
| 5.2.5.4. Scheinbare Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins | 114 |
| 5.2.5.5. pH-Wert in der Digesta der Ferkel | 115 |
| 5.2.5.6. D-/L-Laktat | 116 |
| 5.2.5.7. Kurzkettige Fettsäuren | 116 |
| 5.3. Schlussfolgerung | 117 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 118 |
| 7. SUMMARY | 120 |
| 8. ZITIERTE LITERATUR | 122 |

| | |
|------------------------------------|------------|
| 9. ANHANG | 153 |
| PUBLIKATIONSVERZEICHNIS | 166 |
| DANKSAGUNG | 167 |
| SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG | 168 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| Aqua bidest. | zweifach destilliertes Wasser |
| Aqua dest. | einfach destilliertes Wasser |
| BD | Becton Dickinson |
| BrdU | Bromdesoxyuridin |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CaCl ₂ | Kalziumchlorid |
| Caco-2 | Human colonic adenocarcinoma cells |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CFDA-Se | Carboxyfluorescein-Diazetat-N-Succinimidyl-Ester |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| Con A | Concanavalin A |
| CRP | C-reaktives Protein |
| d.h. | das heißt |
| DL | Deutsche Landrasse |
| D-Glukose | D-Isomer der Glukose |
| D-Laktat | D-Isomer der Milchsäure |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| DT 104 | Phagentyp des <i>Salmonella</i> Typhimurium Stamms (<i>Definite Type</i>) |
| E. | <i>Escherichia</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>) |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| EPEC | Enteropathogener <i>Escherichia coli</i> |
| Fa. | Firma |
| FA | Futteraufnahme |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FAW | Futteraufwand |
| FE | Futtereinwaage |
| FI | Fluoreszeinintensität |
| FITC | Fluoreszeinisothiozyanat |
| FL1 | Fluoreszenz 1, Emissionsmaximum 525nm |
| FL2 | Fluoreszenz 2, Emissionsmaximum 578nm |
| FM | Futtermittel |
| FR | Futterrest |
| FSC | Forward Light Scatter |
| FV | Futterverlust |
| g | Gramm |
| g | Gravitationskraft |
| GALT | Darm assoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>gut associated lymphoid tissue</i>) |

| | |
|---|--|
| HBSS | Hank`s gepufferte Salzlösung (Hank`s Buffered Salt Solution) |
| HCl | Salzsäure |
| HEPES | Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer |
| Hep-2 | Humane Epithelzelllinie 2 |
| H ₂ O | Wasser |
| Hp | Haptoglobin |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>) |
| IEL | Intraepitheliale Lymphozyten |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IPEC-J2 | Intestinal Porcine Epithelial Cell Line-Jejunal |
| ITS | Insulin-Transferrin-Selenit-Salzlösung |
| KBrO ₃ | Kaliumbromat |
| kg | Kilogramm |
| KHCO ₃ | Kaliumhydrogenkarbonat |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| LaGeSo | Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin |
| LB | Lysogenes Nährmedium (<i>Lysogeny broth</i>) |
| L-Laktat | L-Isomer der Milchsäure |
| LPL | Lamina propria Lymphozyt |
| LT | Lebenstag |
| M | Molmasse |
| m | Masse |
| MG | Molekulargewicht |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>) |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| mmol | Millimol |
| MnSO ₄ | Mangansulfat |
| M-Zelle | Microfold Zelle |
| n | Anzahl der gewerteten Fälle |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NH ₃ | Ammoniak |
| NH ₄ Cl | Ammoniumchlorid |
| NH ₄ VO ₃ | Ammoniummetavanadat |
| (NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ | Ammoniumheptamolybdat |
| NK | Negativkontrolle |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| nm | Nanometer |
| OD | Optische Dichte (<i>optical density</i>) |

| | |
|-------|---|
| p | Ergebnis des statistischen Signifikanztests |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PE | Phycoerythrin |
| PHA-M | Phythämagglutinin |
| PK | Positivkontrolle |
| PMT | Photomultiplier Detektor |
| PWM | Pokeweed Mitogen |
| Ra | Rohasche |
| Rfe | Rohfett |
| Rfa | Rohfaser |
| Rp | Rohprotein |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT | Raumtemperatur |
| SCFA | kurzkettige Fettsäuren (<i>short chain fatty acids</i>) |
| SD | Standardabweichung |
| sek | Sekunden |
| spp. | Spezies |
| SSC | Side Scatter |
| sV | scheinbare Verdaulichkeit |
| SWC | Swine Cluster of Differentiation |
| t | Tonne |
| Tab. | Tabelle |
| TCR | T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>) |
| TGF | Transformierender Wachstumsfaktor (<i>Transforming Growth Factor</i>) |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TNF | Tumornekrosefaktor (<i>Tumor Necrosis Factor</i>) |
| TS | Trockensubstanz |
| uS | ursprüngliche Substanz |
| UV | Ultraviolettstrahlung |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| V | Testvolumen in ml |
| v | Probevolumen in ml |
| VIP | vasoaktives intestinales Peptid |
| vmtl. | vermutlich |
| µm | Mikrometer |

SYMBOLVERZEICHNIS

| | |
|----|--|
| % | Prozent |
| & | und |
| ® | Rechtsschutz dieser Marke (registered trademark) |
| ™ | eingetragenes Warenzeichen (Trade mark) |
| ε | Epsilon (Extinktionskoeffizient) |
| α | Alpha |
| β | Beta |
| γ | Gamma |
| δ | Delta |
| ° | Grad |
| °C | Grad Celsius |
| Σ | Summe |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| Tabelle 1: Übersicht zu den verwendeten pflanzlichen Substanzen | 30 |
| Tabelle 2: Zusammensetzung der Fütterungsdiäten | 45 |
| Tabelle 3: Rohnährstoff- und Mineralstoffgehalt in den eingesetzten Futtermischungen | 46 |
| Tabelle 4: Details zur Analyse von FRESTA® F in der Futtermischung über Indikator F-Quinine | 49 |
| Tabelle 5: Details zur Analyse von Bockshornkleesamen in der Futtermischung über Indikator FS-Blue | 49 |
| Tabelle 6: Ergebnisse der Indikatoranalyse der Futtermittelzusatzstoffe | 50 |
| Tabelle 7: Übersicht über die in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Differenzierungsmoleküle von Immunzellen zur Detektion spezifischer Leukozytenpopulationen (modifiziert nach Paßlack, 2010) | 54 |
| Tabelle 8: Vorverdünnungen der primären Antikörper zur Markierung der Leukozyten aus Blut und Darm | 56 |
| Tabelle 9: Sekundärantikörper und deren Markierungsmerkmale | 57 |
| Tabelle 10: Einfluss pflanzlicher Substanzen auf die Fluoreszenz von IPEC-J2-Zellen als Parameter der Adhäsion eines enteropathogenen <i>E. coli</i> -Stamms | 71 |
| Tabelle 11: Optische Dichte (OD) nach acht Stunden Inkubation zur quantitativen Beurteilung der Bindungskapazität der pflanzlichen Substanzen für den <i>E. coli</i> -Stamm | 72 |
| Tabelle 12: Mittlere Lebendmassen und -zunahmen (kg), mittlere tägliche Futterraufnahme (kg/Tier) und mittlerer Futteraufwand der Ferkel nach 28-tägiger Versuchsperiode | 76 |
| Tabelle 13: Hämatologische Parameter und Differentialblutbild | 76 |
| Tabelle 14: Verteilung der Immunzellen im Blut der Ferkel, Angaben in Prozent (%) der durch Oberflächendifferenzierungsmarker detektierten Leukozyten | 78 |
| Tabelle 15: Verteilung der intraepithelialen Leukozyten des proximalen Jejunums der Ferkel, Angaben in Prozent (%) der durch Oberflächendifferenzierungsmarker detektierten Leukozyten | 81 |
| Tabelle 16: Relativer Anteil (%) der proliferierten Lymphozyten im Blut der Ferkel nach Stimulation mit PWM, Con A und PHA-M | 82 |
| Tabelle 17: Mittlere Haptoglobin Serumkonzentration (mg/ml) der Ferkel in den einzelnen Fütterungsgruppen, Mittelwert ± Standardabweichung | 83 |
| Tabelle 18: Nachweis von Antikörper gegen Salmonellen im Serum der Schweine mittels ELISA SALMOTYPE® Pig Screen (LDL) | 84 |
| Tabelle 19: pH-Werte der Digesta in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts der Ferkel | 88 |
| Tabelle 20: Trockensubstanzgehalt (% der ursprünglichen Substanz) der Digesta vom distalen Jejunum, Ileum und Kot | 89 |
| Tabelle 21: Scheinbare Gesamtverdaulichkeit (%) des Rohproteins in den einzelnen Fütterungsgruppen | 89 |

| | |
|--|------------|
| Tabelle 22: Konzentrationen von D- und L-Laktat (mmol/kg (uS)) in der Digesta der jeweiligen Darmabschnitte der Ferkel | 90 |
| Tabelle 23: Relativer Anteil (%) der kurzkettigen Fettsäuren (mmol/kg (uS)) in der Digesta des Dünndarms in den Fütterungsgruppen | 92 |
| Tabelle 24: Relativer Anteil (%) der kurzkettigen Fettsäuren (mmol/kg (uS)) in der Digesta des Dickdarms in den Fütterungsgruppen | 93 |
| Tabelle 25: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien für die <i>In vitro</i> -Untersuchungen | 153 |
| Tabelle 26: Übersicht der verwendeten Zusätze für die Zellkultur und die Zellkulturmedien für die <i>In vitro</i> -Untersuchungen | 153 |
| Tabelle 27: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien für den Fütterungsversuch | 154 |
| Tabelle 28: Übersicht der verwendeten Zusätze für die Zellkultur und die Zellkulturmedien für den Fütterungsversuch | 155 |
| Tabelle 29: Verbrauchsmaterialien | 157 |
| Tabelle 30: Geräte | 159 |
| Tabelle 31: Übersicht der für die Phänotypisierung der Immunzellen verwendeten primären Antikörper | 161 |
| Tabelle 32: Übersicht der für die Phänotypisierung der Immunzellen verwendeten sekundären Antikörper | 162 |
| Tabelle 33: Übersicht der verwendeten Reagenzien des ELISA SALMOTYPE® Pig Screen (Labordiagnostik, Leipzig) | 162 |
| Tabelle 34: Übersicht der verwendeten Reagenzien des ELISA zur Bestimmung der spezifischen Salmonellenantikörper | 162 |
| Tabelle 35: Übersicht der verwendeten Reagenzien des Pig Haptoglobin ELISA (Dunn Labortechnik, Asbach) | 163 |
| Tabelle 36: Verdünnung der Standardansätze zur Bestimmung der Haptoglobinkonzentration im Serum der Schweine | 163 |
| Tabelle 37: Übersicht der verwendeten Reagenzien des Phagotest® | 163 |
| Tabelle 38: Übersicht der für die Lymphozytenproliferation eingesetzten Mitogene | 164 |
| Tabelle 39: Übersicht der für die Lymphozytenproliferation verwendeten primären und sekundären Antikörper | 164 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|----------------------|--|-----------|
| Abbildung 1: | Darstellungsformen der für diese Arbeit benutzten FACS-(Fluorescence Activated Cell Sorting) Auswertung | 32 |
| Abbildung 2: | Schematische Darstellung des <i>In vitro</i> -Modells zum Adhäsionsverhalten von <i>E. coli</i> an IPEC-J2 | 33 |
| Abbildung 3: | Pipettierschema der Negativkontrollen für die Inkubation der Epithelzellen IPEC-J2 mit pflanzlichen Substanzen | 36 |
| Abbildung 4: | Pipettierschema der Positivkontrollen für die Inkubation der Epithelzellen IPEC-J2 mit pflanzlichen Substanzen und <i>E. coli</i> | 36 |
| Abbildung 5: | Darstellung der Epithelzellen IPEC-J2 in einem Streudiagramm zur Ermittlung des relativen Anteils mit <i>E. coli</i> gebundener Epithelzellen | 37 |
| Abbildung 6: | Darstellung der Fluoreszenzintensität ungebundener und mit <i>E. coli</i> gebundener Epithelzellen im Histogramm | 38 |
| Abbildung 7: | Übersicht der Methode zur Ermittlung der Bindungskapazität pflanzlicher Substanzen gegenüber <i>E. coli</i> | 39 |
| Abbildung 8: | Pipettierschema für die Inkubation zur Bindungskapazität pflanzlicher Substanzen gegenüber <i>E. coli</i> | 40 |
| Abbildung 9: | Pipettierschema zur Ermittlung des Konzentrationseinflusses pflanzlicher Substanzen auf das Wachstum von <i>E. coli</i> | 42 |
| Abbildung 10: | Aufbau und zeitlicher Ablauf des Fütterungsversuches | 44 |
| Abbildung 11: | Übersicht über die Versuchsgruppeneinteilung | 45 |
| Abbildung 12: | Schematische Darstellung der Lokalisation zur Gewinnung von Lymphozyten aus dem Darm | 53 |
| Abbildung 13: | Zweiparameterdarstellung im Streudiagramm nach Festlegung einer Region (R1) um die Lymphozyten in Blut (a) und Darm (b) zur Ermittlung spezifischer Zelloberflächenmarker am Beispiel von CD4 und CD8 markierten Lymphozyten | 58 |
| Abbildung 14: | Zweiparameterdarstellung im Streudiagramm am Beispiel Con A stimulierter Lymphozyten | 60 |
| Abbildung 15: | Arbeitsschritte zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität | 61 |
| Abbildung 16: | Darstellung der Ermittlung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten im Histogramm und Streudiagramm | 63 |
| Abbildung 17: | Titrationsschema und Anordnung der Proben zur Bestimmung von Immunglobulinen gegen Salmonellen im Serum der Schweine | 66 |
| Abbildung 18: | Einfluss verschiedener Konzentrationen von FRESTA [®] F (wässriger Extrakt) auf das Wachstum eines enteropathogenen <i>E. coli</i> -Stamms bei 24-stündiger Inkubation | 73 |
| Abbildung 19: | Einfluss verschiedener Konzentrationen von Bockshornkleesamen (wässriger Extrakt) auf das Wachstum eines enteropathogenen <i>E. coli</i> -Stamms bei 24-stündiger Inkubation | 74 |
| Abbildung 20: | Einfluss verschiedener Konzentrationen von Süßholzwurzel (wässriger Extrakt) auf das Wachstum eines enteropathogenen <i>E. coli</i> -Stamms bei 24-stündiger Inkubation | 74 |
| Abbildung 21: | Prozentualer Anteil (%) der phagozytierenden Granulozyten (a) und Monozyten (b) im Blut der Ferkel | 82 |

| | |
|--|------------|
| Abbildung 22: Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten (a) und Monozyten (b) im Blut der Ferkel | 83 |
| Abbildung 23: OD%-Werte von spezifischem IgG im Serum der Ferkel (SALMOTYPE® Pig Screen ELISA) | 85 |
| Abbildung 24: Salmonellen-spezifische IgM-Extinktionswerte im Serum der Ferkel vor Vakzination mit SALMOPORC® | 86 |
| Abbildung 25: Salmonellen-spezifische IgM-Extinktionswerte im Serum der Ferkel nach Vakzination mit SALMOPORC® | 86 |
| Abbildung 26: Salmonellen-spezifische IgG-Extinktionswerte im Serum der Ferkel nach Vakzination mit SALMOPORC® | 87 |
| Abbildung 27: Salmonellen-spezifische IgA-Extinktionswerte im Serum der Ferkel nach Vakzination mit SALMOPORC® | 87 |
| Abbildung 28: Gesamtkonzentration kurzkettiger Fettsäuren in den untersuchten Darmabschnitten | 91 |
| Abbildung 29: Bewertungsschema zur Beurteilung des Gesundheitszustandes der Ferkel | 165 |

1. EINLEITUNG

Die Zeitperiode nach dem Absetzen der Ferkel von der Muttersau stellt eine kritische Lebensphase in der Entwicklung der Jungtiere dar. In den meisten europäischen Ländern erfolgt das Absetzen zwischen dem 21. bis 28. Lebenstag und somit deutlich vor dem Termin der natürlichen Entwöhnung. Nach dem Absetzen sind die Tiere erheblichen Stressfaktoren ausgesetzt, die das Allgemeinbefinden stark beeinträchtigen können. Neben der Trennung von der Mutter müssen sich die Ferkel nicht nur mit neuen sozialen, räumlichen und hygienischen Umweltfaktoren auseinandersetzen sondern auch mit einer Futterumstellung, wodurch es zu erheblichen Veränderungen im Verdauungstrakt kommt (Pluske et al., 1997; Stokes et al., 2004; Lallès et al., 2007). In der ersten Woche nach dem Absetzen wird zudem oft eine reduzierte Nahrungsaufnahme beobachtet. Der Entzug der Muttermilch bedeutet auch einen Verlust an immunologischen Schutzfaktoren, den die Tiere aufgrund ihres noch nicht vollständig ausgereiften Immunsystems nicht sofort kompensieren können (Stokes et al., 2004). In dieser Phase steigt das Risiko für Infektionen. Besonders Durchfallerkrankungen führen während dieser Zeit zu hohen Tierverlusten.

Der in der Vergangenheit mögliche Einsatz von antibiotischen Futterzusatzstoffen wirkte in dieser Phase leistungsfördernd und hatte reduzierende Effekte auf die Prävalenz von Durchfallerkrankungen (Gaskins et al., 2002). Vor dem Hintergrund der zunehmenden Entwicklung von Resistenzen gegenüber Antibiotika (Angulo et al., 2004) und der daraus resultierenden Entscheidung, den Einsatz von Antibiotika seit 2006 als Leistungsförderer in der Tierproduktion zu untersagen (Verordnung (EG) Nr.1831/2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung), bildet die Suche nach Alternativen hinsichtlich einer Reduzierung bzw. Vermeidung der Probleme in der Absetzphase einen Schwerpunkt der Forschung auf dem Gebiet der Tierernährung.

Da der Darm ein komplexes Organ darstellt, in welchem als wichtigste Komponenten die Schleimhautbarriere, die intestinale Mikroflora und das lokale Immunsystem agieren, erfolgten Studien unter den Aspekten, diese zu beeinflussen und das Durchfallgeschehen zu mildern. In den letzten Jahren wurden in diesem Zusammenhang neben Probiotika und Präbiotika auch viele andere Substanzen untersucht: Enzyme, Spurenelemente (insbesondere Zink), organische Säuren, Blutplasmaproteine, Vitamin E, β -Glukane sowie ätherische Öle. Eine Quelle möglicher wirksamer Substanzen stellen die vielfältigen Inhaltsstoffe von Pflanzen dar. Nachdem für die ätherischen Öle eine antimikrobielle Wirksamkeit *in vitro* nachgewiesen werden konnte, stieg das Interesse, auch andere Inhaltsstoffe pflanzlichen Ursprungs zu untersuchen (Hammer et al., 1999; Dorman und Deans, 2000). Hierbei bediente man sich entweder isolierter Wirkstoffe oder komplexer Pflanzenbestandteile.

Neben einer antimikrobiellen Wirkung konnten auch immunmodulierende und metabolische Wirkungen durch die Verabreichung pflanzlicher Substanzen beobachtet werden. Die Wirksamkeit erklärt sich oft in der Kombination der aktiven Pflanzeninhaltsstoffe wie z.B. Flavonoide, Phenole, Saponine, Karotinoide, Fruktooligosaccharide und Oligogalakturonide. Letztere scheinen die Adhäsion verschiedener pathogener und nicht-pathogener Bakterienstämme wie *Escherichia (E.) coli* und *Salmonella (S.) enterica* an humanen und porcinen Epithelzelllinien zu reduzieren (Ofek et al., 1977; Neeser et al., 1986; Naughton et al., 2001; Kastner et al., 2002; Di Martino et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden ein auf einer Pflanzenmischung basierender Futterzusatzstoff (FRESTA® F) und zwei pflanzliche Substanzen (Bockshornkleesamen und Süßholzwurzel) in verschiedenen *in vitro*-Modellen hinsichtlich antiadhäsiver und antimikrobieller Eigenschaften gegenüber einem porcinen enteropathogenen *E. coli*-Stamm geprüft. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen zu einer möglichen Bindung des *E. coli*-Stamms an die Testsubstanzen. Im Anschluss wurden in einem Fütterungsversuch mit Absetzferkeln der pflanzliche Futterzusatzstoff sowie Bockshornkleesamen auf mögliche immunologische und verdauungsphysiologische Effekte geprüft.

2. LITERATUR

2.1. Die Absetzphase

In ihrem natürlichen Habitat erstreckt sich der Prozess des Absetzens der Jungtiere von der Sau auf einen Zeitraum von bis zu vier Monaten. In dieser Zeit werden Ferkel trotz zunehmender Festfutteraufnahme gesäugt (Le Dividich und Sève, 2000; Weary et al., 2008). Die Aufnahme fester Futterbestandteile gewährleistet den Ferkeln bei sinkender Milchproduktion der Sau die Deckung des Energiebedarfs für das Wachstum (Le Dividich und Sève, 2000). Zusätzlich ermöglicht das allmähliche Absetzen das Erlernen sozialer Unabhängigkeit und die schrittweise Adaptation verdauungsphysiologischer Prozesse an feste Futterbestandteile (Weary et al., 2008). Im Vergleich zum natürlichen Absetzen erfolgt das Absetzen bei den landwirtschaftlichen Nutztieren meist mehr oder weniger abrupt durch Trennung von Ferkel und Muttersau mit dem Verlust der Möglichkeit der Milchaufnahme. Dies begründet sich in wirtschaftlichen Aspekten der konventionellen Tierproduktion. In dem Kapitel II des Anhangs der Richtlinie 2008/120/EG über Mindestanforderungen für den Schutz von Schweinen wird eine reguläre Mindestsäugezeit von 28 Tagen bestimmt. Nur unter speziell geregelten Voraussetzungen dürfen die Ferkel früher abgesetzt werden.

Das Absetzen ist für die Tiere mit psychischem Stress verbunden, der durch den Verlust der Mutter, Trennung von Geschwistern, Transport und neue soziale Kontakte verursacht wird (Weary et al., 2008). Dazu kommt die Umstellung von Flüssignahrung auf feste Futterbestandteile, die meistens mit einer reduzierten Nährstoffaufnahme verbunden ist (Pluske et al., 1997; Le Dividich und Sève, 2000; Weary et al., 2008). Diese Stimuli führen zu einer erhöhten neuroendokrinen Aktivität, welche einerseits psychische Ursachen hat, andererseits ernährungs- und umweltbedingt begründet ist. Als Reaktion auf diese Stressreize zeigen abgesetzte Ferkel eine transiente Erhöhung des Serum- und Harnkortisols (Funderburke und Seerley, 1990; Ekkel et al., 1995; McCracken et al., 1995; Carroll et al., 1998; Hay, 2001), der aber innerhalb kurzer Zeit wieder die Ausgangswerte erreicht (Ekkel et al., 1995; Hay, 2001). Veränderungen der Umgebungstemperatur können ebenfalls Stress induzieren und führen zu einer vermehrten Ausschüttung von Kortisol im Blut (Funderburke und Seerley, 1990).

Zusätzlich stellt die Futterumstellung einen nachhaltigen Faktor sowohl für den Stoffwechsel als auch für die morphologischen, enzymatischen und immunologischen Bedingungen im Verdauungstrakt der Tiere dar (McCracken et al., 1995; Carroll et al., 1998; Le Dividich und Sève, 2000; Hay, 2001). Stressbedingte Ursachen können die initiale Futteraufnahme verzögern (Ekkel et al., 1995). Nur 50% der Tiere beginnen innerhalb der ersten zehn Stunden mit der Futteraufnahme (Bruininx et al., 2002). Ferkel nehmen innerhalb der ersten Tage nach dem Absetzen nur 60-70% der benötigten Energie auf (Le Dividich und Sève, 2000). Es kann bis zu 14 Tage dauern, bis die Tiere das Niveau der täglichen Energieaufnahme, das sie vor dem Absetzen hatten, wieder erreichen (Le Dividich und Sève, 2000).

Durch die verminderte Futteraufnahme und die damit einhergehende energetische Unterversorgung zeigen viele Ferkel in den ersten Tagen eine Wachstumsverzögerung. Der biologische Mechanismus der absetzbedingten Wachstumsdepression ist vielfältig. Neben

einer katabolen Stoffwechsellage spielen neuroendokrine Faktoren eine wichtige Rolle (Straus, 1994). Daraus ergeben sich Konsequenzen für die Entwicklung und den Gesundheitszustand des Ferkels (Carroll et al., 1998; Le Dividich und Sève, 2000). Die Absetzphase geht einher mit gravierenden morphologischen und funktionellen Veränderungen im Darm, wodurch die Tiere in dieser Zeit eine erhöhte Anfälligkeit für Durchfallerkrankungen zeigen (Pluske et al., 1997). Störungen im Verdauungstrakt ergeben sich nicht nur aus Veränderungen der oberflächlichen Darmarchitektur und daraus resultierender Funktionen, sie sind auch bedingt durch Adaptionsprozesse der intestinalen Mikroflora und des darmassoziierten Immunsystems (Lallès et al., 2007). Durch die Umstellung auf feste Futterbestandteile und das Angebot neuer Energiequellen kommt es zu einem vorübergehenden Ungleichgewicht der Intestinalflora sowie einer Aktivierung lokaler Immunzellen (McCracken et al., 1999; Lallès et al., 2007). Neben einer aktivierten zellulären Immunantwort zeigen sich im Dünndarm in den ersten zwei Tagen nach dem Absetzen erhöhte Konzentrationen an IL-1 β , IL-6 und TNF- α , die einen Einfluss auf die Barrierefunktion, Permeabilität, Enzymaktivitäten und Transportprozesse im Darm haben (McCracken et al., 1999; Pie et al., 2004). Der Verlust der protektivwirkenden Muttermilch und das noch unadaptierte Immunsystem des Ferkels machen die Tiere in diesem Alter besonders anfällig für Infektionen.

2.1.1. Die Auswirkungen des Absetzens auf die morphologische und verdaunungsphysiologische Entwicklung des Gastrointestinaltrakts

Besonders der Dünndarm unterliegt im Zuge des Absetzens großen Veränderungen, die sich sowohl morphologisch als auch mikrobiologisch und verdaunungsphysiologisch darstellen (Pluske et al., 1997; Konstantinov et al., 2004; Lallès et al., 2007).

Die Enterozyten erfüllen verschiedenste Funktionen wie die Absorption von Nährstoffen und Flüssigkeit, die Sekretion von Verdauungsenzymen, Aufrechterhaltung der Barrierefunktion gegen nutritive und mikrobielle Antigene sowie die Resorption von Wasser und Elektrolyten (Pluske et al., 1997; Lallès et al., 2007). Durch das Absetzen werden dem Darm entscheidende Milchhaltsstoffe entzogen, die die Regulation und Differenzierung des Zellwachstums der Enterozyten sowie deren Funktionen beeinflussen (Pluske et al., 1997). Strukturelle Veränderungen nach dem Absetzen äußern sich in einer Zottenatrophie und Kryptenzellhyperplasie der Enterozyten, die entweder durch eine erhöhte Zellverlustrate oder eine verminderte Zellneubildungsrate bedingt sind (Pluske et al., 1997; Spreeuwenberg et al., 2001). Die Zottenatrophie führt zu einer vorübergehenden Störung von Absorptions- und Digestionsprozessen. Außerdem kommt es in Folge der reduzierten Futteraufnahme zu einer verminderten luminalen Stimulation und einem partiellen Nährstoffmangel, der zu einer verminderten Zellneubildungsrate der Kryptenzellen führt (Pluske et al., 1997; McCracken et al., 1999; Boudry et al., 2004). Die Verkürzung der Zottenlänge kann 24 Stunden nach dem Absetzen bis zu 75% betragen und bis zu einer Woche anhalten (McCracken et al., 1999). Mit zunehmender Aufnahme von festen Futterbestandteilen erfolgen Adaptionsprozesse, die eine vermehrte Proliferationsrate der Kryptenzellen induzieren und sich anatomisch und funktionell von den Zellen vor der Futterumstellung unterscheiden (Kelly et al., 1991; Pluske et al., 1997). Während die Zotten vor dem Absetzen lang und fingerförmig sind, können sie sich nach der Futterumstellung breit und zungenförmig darstellen (Pluske et al., 1997).

Immunologische Reaktionen auf Futterantigene, insbesondere die in Sojabohnen enthaltenen Proteine Glyzinin und β -Konglyzinin, können durch Entstehung lokaler Entzündungsreaktionen ebenfalls zu einer Atrophie der Dünndarmzotten und Hyperplasie der Kryptenzellen führen (Li et al., 1990; Dréau et al., 1994; Dréau et al., 1995; McCracken et al., 1999; Bailey et al., 2005a; Bailey et al., 2005b).

Zahlreiche verdauungsphysiologische Adaptionen erfolgen in der postnatalen Phase (Boudry et al., 2004). Da das Laktoseangebot im Futter nach dem Absetzen wesentlich geringer ist als in der Sauenmilch, kommt es zu einem Abfall der Laktaseaktivität im Dünndarm (Kelly et al., 1991). Die Zottenatrophie bedingt eine zusätzliche Reduktion enzymatischer Aktivitäten. Dadurch kann die Enzymkapazität von Laktase in den ersten Tagen auf bis zu 40% ihrer Ausgangskapazität abfallen (Kelly et al., 1991). Während die Aktivität der Laktase kontinuierlich weiter absinkt, kommt es zu einem allmählichen Anstieg der Enzymaktivität von Saccharase. Die Veränderungen der Enzymaktivitäten von Laktase und Saccharase stehen neben der Futterumstellung auch in einem unmittelbaren Zusammenhang mit den Veränderungen der Enterozyten (Kelly et al., 1991). Laktase findet sich vermehrt in den apikalen Bereichen der Zotten, Saccharase in den basalen Bereichen. Die Zunahme der Kryptentiefe bedingt somit eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von Saccharase (Kelly et al., 1991). Neben einer Zunahme der Saccharaseaktivität wird nach dem Absetzen auch ein deutlicher Anstieg der Enzymaktivitäten von Maltase und Glykoamylase beobachtet, der mit den erhöhten Gehalten verschiedener Kohlenhydratquellen in der Futtermittelration einhergeht (Kelly et al., 1991). Durch die morphologischen Veränderungen der Bürstensaumzellen kann es nach dem Absetzen zu einer verminderten Absorption von D-Xylose, Alanin, Glukose und Elektrolyten kommen (Pluske et al., 1997). Damit wird eine erhöhte Anflutung von Nährstoffen im Ileum begünstigt (Boudry et al., 2004). Durch die geringe Absorptionskapazität des Ileums erfolgt eine vermehrte Sekretion von Flüssigkeit in das Darmlumen, wodurch sich das Risiko einer osmotischen Diarrhoe erhöht (Boudry et al., 2004).

2.1.2. Die intestinale Mikrobiota des Schweins und die Auswirkungen des Absetzens auf die Intestinalflora und deren metabolische Aktivität

Die intestinale Mikroflora charakterisiert sich durch eine hohe Besiedlungsdichte, ihre Komplexität sowie ihre metabolischen Aktivitäten. Während die autochthonen Mikroorganismen symbiotisch alle Habitate des Darms besiedeln, passieren die allochthonen Populationen den Darm, ohne ihn zu besiedeln (Pluske et al., 2002; Konstantinov et al., 2004). Eine erfolgreiche Besiedlung hat dann stattgefunden, wenn in der Population ein konstantes Gleichgewicht zwischen Vermehrung und Elimination herrscht.

Die Kolonisation des Darms steht in einem engen Zusammenhang mit der Entwicklung physiologischer und immunologischer Funktionen (Rothkötter et al., 1999; Hooper et al., 2001). Nährstoffe und ihre physiologischen Effekte spielen eine wichtige Rolle für die Besiedlung und Erhaltung des mikrobiellen intestinalen Gleichgewichts (Pluske et al., 2002; Konstantinov et al., 2004).

Nach der Geburt erfolgt die bakterielle Besiedlung des Darms durch Kontakt mit der Mutter und der Umwelt sowie durch Kolostrumaufnahme.

In den ersten Lebenswochen unterliegt die intestinale Mikroflora entwicklungsbedingten Veränderungen (Inoue et al., 2005). In der ersten Lebenswoche erfolgt eine Besiedlung mit

aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen (Inoue et al., 2005). Laktobazillen konnten initial als vorherrschende Besiedler des Intestinaltraktes identifiziert werden (Bateup et al., 1998; Konstantinov et al., 2004; Pieper et al., 2008). Daneben wurde eine Abnahme anaerober Bakteriangattungen wie *Clostridium perfringens* beobachtet (Inoue et al., 2005). Diese Reduktion wird sowohl auf die Zunahme anderer Bakterienpopulationen als auch auf die Anwesenheit von maternalem Immunglobulin A zurückgeführt (Butler und Brown, 1994; Inoue et al., 2005). In der zweiten Lebenswoche können durch das Wachstum anaerober Mikroorganismen wie *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium spp.* und *Bacteroides spp.* weitere Veränderungen in der Zusammensetzung der Intestinalflora des Ferkels erfolgen (Inoue et al., 2005). Daneben zeigt sich auch ein Anstieg metabolischer Aktivitäten durch erhöhte Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren (Murray et al., 1987).

Kurzkettige Fettsäuren stellen die Hauptendprodukte des mikrobiellen Stoffwechsels dar (Macfarlane and Macfarlane, 2003). Durch die Fermentation von Kohlenhydraten entstehen Azetat, Propionat, Butyrat, Formiat und Valeriat. Als Intermediärprodukte fallen Laktat, Ethanol und Succinat an (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Als Metaboliten der bakteriellen Proteinfermentation entstehen Ammoniak, biogene Amine, Indole und Phenole (Gibson und Roberfroid, 1995). Zusätzlich erfolgt die Synthese von Gasen wie Methan und Kohlendioxid. Während der größte Teil der benötigten Substrate über das Futter bereitgestellt wird, können geringe Mengen auch endogen zur Verfügung gestellt werden. Dazu gehören vor allem Glykoproteine und Derivate von Polysacchariden wie Chondroitinsulfate (Gibson und Roberfroid, 1995). Als Folge eines ausreichenden Nährstoffangebotes können im Zäkum und proximalen Kolon im Vergleich zum distalen Kolon die höchsten Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren nachgewiesen werden (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Neben dem Nährstoffangebot scheinen auch die Transitzeit der Digesta und wirtsspezifische Faktoren die Konzentration der Fettsäuren zu beeinflussen (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Dazu gehören das Alter der Tiere, neuroendokrine Faktoren, die Enzymkapazitäten und Stress. Die durch das Futter angebotenen Kohlenhydratquellen beeinflussen ebenfalls entscheidend die Konzentration und das Profil der synthetisierten Fettsäuren im Darm (Wang und Gibson, 1993; Macfarlane und Macfarlane, 2003). Das Fettsäureprofil wird durch die chemische Komposition und Verfügbarkeit der Kohlenhydrate sowie durch die Interaktionen der vorherrschenden Bakterienpopulationen im Darm bestimmt (Macfarlane und Macfarlane, 2003). *In vitro*-Fermentationsstudien zeigten, dass verschiedene angebotene Kohlenhydratquellen von den Mikroorganismen unterschiedlich schnell fermentiert wurden und sich dabei Unterschiede in den Fettsäureprofilen darstellen lassen konnten (Wang und Gibson, 1993; Macfarlane und Macfarlane, 2003). Während erhöhte Azetatsmengen durch die Fermentation von Xylanen und Pektinen synthetisiert werden, erfolgt ein Anstieg der Propionatkonzentration vermehrt durch die Fermentation von Arabinogalaktanen (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Erhöhte Mengen an Butyrat und Laktat werden durch die Fermentation von Stärke erklärt (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Ein Großteil des von Bakterien synthetisierten Laktats im Zäkum und proximalen Kolon liegt in der Form des L-Enantiomers vor (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Das als Intermediärprodukt gebildete Laktat dient auch als Vorstufe für die Synthese von Butyrat.

Neben fütterungsbedingten Einflüssen wirken sich auch entwicklungsbedingte Veränderungen wie die immunologische Reifung des Darms auf die Zusammensetzung und metabolischen Aktivitäten der intestinalen Mikrobiota aus. In einer Studie konnte bei einer vierwöchigen Säugeperiode am 25. Lebenstag ein weiterer Anstieg anaerober

Bakterienpopulationen wie *Bacteroides spp.* im Dickdarm und in der Fäzes der Tiere beobachtet werden, der nicht auf eine absetzbedingte Futterumstellung zurückgeführt werden konnte (Inoue et al., 2005). Gleichzeitig zeigte sich eine quantitative Senkung koliformer Keime und von *E. coli* (Inoue et al., 2005). Diese Veränderungen wurden mit der immunologischen Reifung des Darms in Zusammenhang gebracht, da in diesem Alter sowohl die Anzahl CD4⁺ T-Zellen als auch die Immunglobulinproduzierender Plasmazellen denen adulter Tiere gleicht und von einer im Vergleich zu neugeborenen Ferkeln fortgeschrittenen Reifung des darmassoziierten Immunsystems ausgegangen werden kann (Butler und Brown, 1994; Bailey et al., 2001). Das darmassoziierte Immunsystem steht in einem engen Zusammenhang mit der intestinalen Mikrobiota. Während immunologische Faktoren die Zusammensetzung der Intestinalflora zu stabilisieren scheinen, haben vor allem laktatbildende Bakterien die Fähigkeit, das Immunsystem zu stimulieren und das Wachstum pathogener Keime zu unterdrücken.

Mikroorganismen können sich sowohl im Darmlumen als auch an der Oberfläche der Darmschleimhaut befinden (Pluske et al., 2002). Eine Besiedlung mit Bakterien stellt einen wichtigen Schutz für das Darmepithel dar, da mögliche Bindungsstellen für pathogene Keime dadurch besetzt werden (Pluske et al., 2002). Pathogene Keime sind aber auch in der Lage, mukolytische und glykosidische Enzyme zu synthetisieren, die es ihnen ermöglichen, in die tieferen Schichten der Darmschleimhaut vorzudringen. Einige pathogene Bakterienstämme haben die Eigenschaft, über Fimbrien an membranständige Rezeptoren der Enterozyten zu binden. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Glykoproteine oder Glykolipide (Pluske et al., 2002).

Nach dem Absetzen treten messbare qualitative und quantitative Veränderungen in der intestinalen Mikrobiota auf, wodurch sich in den ersten Tagen ein mikrobielles Ungleichgewicht einstellen kann (Pluske et al., 2002). Die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota scheint wesentlich komplexer zu werden (Konstantinov et al., 2004). Es kann zu einer transienten quantitativen Reduzierung von Laktobazillen vor allem im Ileum, Zäkum und Kolon kommen (Pieper et al., 2008). Im Verlauf der Absetzperiode erfolgt wieder ein allmählicher Anstieg der Konzentration von Laktobazillen (Janczyk et al., 2010). Ebenfalls konnte sowohl ein Anstieg anderer Bakterienpopulationen wie *Clostridium coccoides*, *Eubacterium rectale* und *Bacteroides spp.* als auch eine Reduzierung der Anzahl an Enterobakterien und Enterokokken im Ileum, Zäkum und Kolon kurz nach dem Absetzen beobachtet werden (Pieper et al., 2008; Janczyk et al., 2010). Allerdings konnten in diesem Zusammenhang starke tierindividuelle Schwankungen für die Gesamtmenge von *Lactobacillus spp.* von bis zu 19% ermittelt werden, die darauf schließen lassen könnten, dass wirtsspezifische Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Veränderungen der intestinalen Mikrobiota nach dem Absetzen zeigen. Ebenfalls zeigten sich für verschiedene Laktobazillusarten qualitative Veränderungen nach dem Absetzen (Janczyk et al., 2007). Während *Lactobacillus (L.) salivarius* kurz nach dem Absetzen als vorherrschende Laktobazillusgattung detektiert wurde, zeigten sich nach fünf bis elf Tagen *L. acidophilus* und *L. sobrius/L. amylovorus* als dominante Gattungen (Leser et al., 2002; Konstantinov et al., 2004; Pieper et al., 2008).

Die quantitativen und qualitativen Veränderungen in der intestinalen Mikrobiota können sowohl durch die Futterumstellung als auch durch die verminderte Futteraufnahme bedingt sein (Konstantinov et al., 2004). Das Angebot anderer Nährstoffquellen könnte in Abhängigkeit ihrer Verfügbarkeit nicht nur zu einem vermehrten bzw. verminderten

Wachstum verschiedener Bakterienpopulationen führen sondern auch zu einer Umstellung im bakteriellen Stoffwechsel (Konstantinov et al., 2004; Pieper et al., 2008). So konnte im Verlauf von bis zu elf Tagen nach dem Absetzen eine Zunahme der Laktatkonzentration im terminalen Dünndarm von Ferkeln ermittelt werden (Pieper et al., 2008; Janczyk et al., 2010). Dagegen kam es zu einer Senkung der Azetat- und Ammoniumkonzentration bis zum fünften Tag nach dem Absetzen (Pieper et al., 2008). Der Anstieg der Laktatkonzentration wird mit einer vermehrten Proliferation von Laktobazillen in Verbindung gebracht (Pieper et al., 2008; Janczyk et al., 2010). Trotz eines quantitativen Abfalls kurz nach dem Absetzen scheinen *Lactobacillus spp.* nach einer Woche als dominante Population den Darm wieder besiedelt zu haben (Konstantinov et al., 2004; Pieper et al., 2008). Eine konstante Etablierung von *Lactobacillus spp.* und anderen laktatbildenden Bakteriengattungen scheint beim Schwein die Aufrechterhaltung physiologischer Verdauungsabläufe zu unterstützen (Vandenbergh, 1993; Niers et al., 2005).

2.1.3. Das Immunsystem des Schweins und die Auswirkungen des Absetzen für die Entwicklung des Immunsystems

Das Immunsystem besteht aus einem komplexen Netzwerk von zellulären und humoralen Faktoren, die sich jeweils ergänzen und wechselseitig regulieren. Die angeborene Immunität ist eine unspezifische Reaktion des Körpers, die erworbene hingegen eine antigenspezifische Reaktion (Renz-Polster und Braun, 2000). Immunzellen lassen sich anhand spezifischer Differenzierungsantigene nach biochemischen und funktionellen Kriterien einteilen. Differenzierungsantigene sind immunphänotypische Merkmale von Zellen, anhand derer die Immunzellen einem Cluster of Differentiation (CD) zugeordnet werden können.

Bei den Oberflächenmolekülen handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine, die zellspezifisch exprimiert werden und neben Rezeptor- und Signalfunktionen auch enzymatische Funktionen aufweisen können. Die Identifizierung der Merkmale erfolgt mittels monoklonaler Antikörper, die entsprechende Differenzierungsantigene erkennen (Piriou-Guzylack and Salmon, 2008). Da die Zellen aufgrund ihrer Funktionalität mehrere verschiedene Oberflächenmarker exprimieren, ist es durch den Einsatz mehrerer monoklonaler Antikörper möglich, Subpopulationen einer Zelllinie zu charakterisieren und Immunreaktionen zu beurteilen (Piriou-Guzylack und Salmon, 2008).

2.1.3.1. Das Immunsystem des Schweins

Im Gegensatz zu anderen Säugetieren gibt es beim Schwein besondere Phänotypen der T-Zellen, die nicht nur in lymphatischen Geweben, sondern auch im peripheren Blutkreislauf nachweisbar sind (Saalmüller und Bryant, 1994; Charerntantanakul und Roth, 2007). Neben den T-Zellen, die einfach-positiv für CD4 oder CD8 Moleküle sind, gibt es beim Schwein T-Zellen, die sowohl beide Moleküle an ihrer Oberfläche exprimieren können als auch T-Zellen, die weder CD4 noch CD8 exprimieren (Saalmüller und Bryant, 1994). Doppelt-positive bzw. -negative T-Zellen sind bei anderen Tierarten sonst nur im Thymus anzutreffen (Saalmüller und Bryant, 1994). Die Verteilung dieser Zellpopulationen korreliert mit dem Alter der Tiere. Der Anteil CD4⁺CD8⁺-T-Zellen ist beim Schwein im Vergleich zu den CD4⁺CD8⁻- oder CD4⁻CD8⁺-T-Zellen relativ hoch (Saalmüller und Bryant, 1994). CD4⁺CD8⁻-T-Zellen stellen naive T-Zellen dar, die nach Antigenkontakt in der Lage sind, CD8- und MHCII (Major

Histocompatibility Complex)-Moleküle zu exprimieren, wobei die Expression von CD8 auf CD4⁺-T-Zellen nur in geringer Dichte zu erfolgen scheint (Saalmüller und Bryant, 1994; Saalmüller et al., 2002; Charerntantanakul und Roth, 2007). Dabei kann die Expression von CD8 in zwei verschiedenen Formen erfolgen, als α -Homodimer oder $\alpha\beta$ -Heterodimer (Saalmüller und Bryant, 1994; Charerntantanakul und Roth, 2007). Während zytolytische T-Zellen CD8 in Form des Heterodimers $\alpha\beta$ exprimieren, erfolgt die Expression von CD8 auf NK-Zellen als Homodimer $\alpha\alpha$ (Yang und Parkhouse, 1997).

CD4⁺CD8^{low}-T-Zellen fungieren als Helfer-Gedächtniszellen (memory t helper cells) (Saalmüller et al., 2002; Charerntantanakul und Roth, 2007). Der relative Anteil der CD4⁺CD8^{low}-T-Zellen steigt mit zunehmendem Alter aufgrund der Ausreifung des Immunsystems und erworbener Immunkompetenzen (Charerntantanakul und Roth, 2007). Während ihr Anteil im Blut sieben Tage alter Ferkel 2% beträgt, erreicht der Anteil bei dreijährigen Tieren bis zu 55% (Saalmüller und Bryant, 1994; Yang und Parkhouse, 1996).

Die Expression von CD8 auf CD4⁻-T-Zellen erfolgt in unterschiedlicher Dichte. Ihr Anteil an peripheren Lymphozyten im Blut beträgt bei jungen Tieren zwischen 7 und 28% und steigt nur wenig mit zunehmendem Alter (Yang und Parkhouse, 1996). Während die Funktion als zytolytische T-Zellen für CD4⁻CD8^{high}-T-Zellen bekannt ist, scheint die Funktion CD4⁻CD8^{low}-T-Zellen noch relativ unbekannt (Saalmüller und Bryant, 1994; Pauly et al., 1996). Zytolytische CD4⁻CD8^{high}-T-Zellen können anhand der Differenzierungsmerkmale CD3, CD5 und CD6 von den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) unterschieden werden, die ebenfalls CD8 exprimieren, für die anderen Merkmale jedoch negativ sind (Charerntantanakul und Roth, 2007). Im Blut ist der Anteil an CD4⁻CD8⁺-T-Zellen beim Schwein doppelt so hoch wie der an CD4⁺CD8⁻-T-Zellen. Im Vergleich dazu verhält es sich bei Mensch und Maus umgekehrt (Charerntantanakul, 2007). CD8 $\alpha\beta$ ⁺-T-Zellen zeigen durch Aktivierung eine erhöhte Expression von CD25 sowie eine Herabregulation von SWC1 (Swine Cluster of Differentiation 1) und CD45RC (Isoform des Differenzierungsantigen CD45) (Ezquerria et al., 2009).

CD4⁻CD8⁻-T-Zellen zeichnen sich durch die Expression von speziellen T-Zellrezeptoren aus und werden aufgrund struktureller Merkmale des Rezeptors als $\gamma\delta$ -T-Zellen definiert (Saalmüller und Bryant, 1994; Hayday, 2000; Käser, 2005). Hierbei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von T-Zellen, die anhand weiterer Differenzierungsantigene genauer untergliedert werden kann. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen bilden den Hauptanteil an T-Zellen bei jungen Schweinen (Charerntantanakul und Roth, 2007). Dieser Anteil nimmt mit steigendem Alter ab. Während diese Zellen bei vier Monate alten Schweinen noch einen relativen Anteil von bis zu 47% der zirkulierenden Blutlymphozyten erreichen, findet man bei zwölf Monate alten Tieren nur noch bis zu 23% (Charerntantanakul und Roth, 2007). Das Verhältnis von $\gamma\delta$ -T-Zellen zu $\alpha\beta$ -T-Zellen beträgt bei jungen Schweinen 2:1. Bei zwölf Monate alten Tieren liegt das Verhältnis dann bei 1:2 (Charerntantanakul und Roth, 2007). Die $\gamma\delta$ -T-Zellen können anhand der Expression von CD2-Molekülen weiter differenziert werden, wobei der Anteil CD2 positiver Zellen im Blut geringer ist als der CD2 negativer (Binns, 1994; Saalmüller und Bryant, 1994; Yang und Parkhouse, 1996; Charerntantanakul und Roth, 2007). CD2⁻ $\gamma\delta$ -T-Zellen werden auch als Null-Zellen bezeichnet (Binns, 1994). Diese Zellpopulation erreicht bei jungen Schweinen einen Anteil von 15-25% der peripheren Blutlymphozyten und von 1-4% in lymphatischen Geweben (Yang und Parkhouse, 1996).

Den porzinen CD2⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen werden neben antigenpräsentierenden Eigenschaften auch eine MHC-unabhängige und eine unspezifische Antigenerkennung über Toll-Like-

Rezeptoren und Scavenger-Rezeptoren zugeschrieben (Takamatsu et al., 2002). Nach Antigenerkennung erfolgt eine Zellproliferation und die Expression von Interferon (IFN)- γ (Olin et al., 2005). Außerdem scheinen sie durch die Expression von CD8 $\alpha\alpha$ ein zytotoxisches Potenzial zu besitzen und dadurch in ihrer Funktion den NK-Zellen ähnlich zu sein (Hayday, 2000; Charemtantanakul und Roth, 2007). Phänotypisch unterschieden sie sich gegenüber NK-Zellen durch die Expression von CD3 und CD5^{low} (Saalmüller et al., 1994).

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen scheinen damit eine wichtige Verknüpfung zwischen angeborener und erworbener Immunität darzustellen. Während beim Mensch und bei der Maus die immunologischen Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellen weitgehend analysiert sind, konnten die genauen Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellen beim Schwein noch nicht vollständig geklärt werden (Charemtantanakul und Roth, 2007).

2.1.3.2. Das darmassoziierte Immunsystem des Schweins

Der Darm muss sich neben seinen verdauungsphysiologischen Aufgaben auch mit einer durch die Nahrung zugeführten Vielzahl nutritiver und mikrobieller Antigene auseinandersetzen. Kritisch ist die Wahrung der Balance zwischen immunologischer Toleranz und immunologischer Abwehr (Stokes et al., 2004; Wershil und Furuta, 2008; Burkey et al., 2009). Schweine kommen mit einem unausgereiften Immunsystem auf die Welt, welches sich bis zu einem Alter von sieben Wochen weitgehend entwickelt hat (Stokes et al., 2004; Bailey et al., 2005a).

Im Zuge dieser Reifungsphase sind die Ferkel zunächst von spezifischen und unspezifischen immunologischen Faktoren aus der Sauenmilch abhängig (Stokes et al., 2004). Über das Kolostrum erhalten sie wichtige maternale Antikörper wie Immunglobulin G und A, die einen effizienten humoralen Schutz gewährleisten. Daneben werden große Mengen an Antigenen über die Darmschleimhaut resorbiert. Die immunologische Reaktion auf Antigene muss aktiv reguliert werden, um Gewebeschäden zu verhindern (Stokes et al., 2004). Diese Toleranzentwicklung ist gekennzeichnet durch eine fehlende Reaktivität von Immunzellen gegenüber kommensalen Bakterien und Futterkomponenten. Für die Entwicklung einer immunologischen Toleranz im Darm werden verschiedene Mechanismen diskutiert.

Dendritische Zellen, die als antigenpräsentierende Zellen fungieren, sind in der Lage, naive T-Zellen im Darm zu aktivieren und somit eine Immunantwort naiver T-Zellen zu steuern. Durch die Freisetzung von Interleukin-10 und TGF (*Transforming Growth Factor*)- β wird eine Differenzierung dieser Zellen zu regulatorischen T-Zellen induziert (Bailey et al., 2005a). Regulatorische T-Zellen können durch Expression spezifischer Zytokine die Immunreaktionen in Abhängigkeit der erwünschten physiologischen Effekte sowohl stimulieren als auch dämpfen oder unterdrücken. Hinsichtlich der Toleranzentwicklung erfolgt demnach durch regulatorische T-Zellen eine Dämpfung der Immunantwort (Bailey et al., 2005a; Brandtzaeg, 2009).

Dendritische Zellen sind über einen weiteren Mechanismus in der Lage, immunologische Toleranz zu erzeugen (Bailey et al., 2005a). Die Signale aufgenommener Antigene werden von den Zellen so verarbeitet, dass durch die Art der Präsentation des Antigens die Immunantwort naiver T-Zellen gedämpft wird (Bailey et al., 2005a).

Das darmassoziierte Immunsystem stellt somit ein komplexes und bisher noch nicht vollständig verstandenes System dar, welches von physikalischen, physiologischen und immunologischen Faktoren beeinflusst wird (Johnson und Kudsk, 1999; Acheson und

Luccioli, 2004). Dazu gehören die Epithel-, Becher- und Panethzellen der Schleimhaut, die kommensale Intestinalflora sowie verschiedene antimikrobiell wirksame Peptide, die von diesen Zellen freigesetzt werden (Kondon et al., 1995; Matsuo et al., 1997; Johnson und Kudsk, 1999; Lugea et al., 2000; Ouelette und Bevins, 2001; Cummings et al., 2004). Störungen in der Aufrechterhaltung der Darmschleimhautbarriere resultieren in einer Translokation von Bakterien über das Darmepithel (Cummings et al., 2004). Um eine anschließende Ausbreitung über Lymph- und Blutgefäße zu verhindern, besitzt der Darm ein hochentwickeltes eigenes Immunsystem, welches sich aus dem Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe (*mucosal associated lymphoid tissue*, MALT) und dem Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) zusammensetzt (Cummings et al., 2004).

Das lymphatische Gewebe organisiert sich beim Schwein in solitär vorkommenden Lymphfollikeln und Peyerschen Platten (Rothkötter, 2009). Peyersche Platten sind oft assoziiert mit M (*microfold*)-Zellen, über die eine Aufnahme und Weiterleitung luminaler Antigene erfolgt (Acheson und Luccioli, 2004; Cummings et al., 2004; Wershil und Furuta, 2008; Rothkötter, 2009). Über M-Zellen werden hauptsächlich Fremdproteine transportiert, daneben können M-Zellen auch bakterielle Antigene aufnehmen und weiterleiten (Rothkötter, 2009). Die Erkennung der Antigene kann sowohl über unspezifische Rezeptoren als auch MHCII-vermittelt erfolgen (Acheson und Luccioli, 2004; Cummings et al., 2004; Wershil und Furuta, 2008). Darüber hinaus sind M-Zellen in der Lage, proinflammatorische Zytokine und Chemokine freizusetzen und somit die Immunantwort zu beeinflussen (Wershil und Furuta, 2008). Man vermutet, dass M-Zellen eher bakterielle Antigene der kommensalen Intestinalflora binden und die Bindung pathogener Antigene eher durch dendritische Zellen erfolgt (Macpherson und Uhr, 2004; Rothkötter, 2009).

In Ergänzung zu den organisierten lymphatischen Strukturen im Darm spielen die in der *Lamina propria* und *Lamina epithelialis* lokalisierten Lymphozyten eine bedeutende Rolle im Rahmen Schleimhaut-assoziiierter Immunmechanismen (Pabst und Rothkötter, 1999; Rothkötter, 2009). Intraepitheliale Lymphozyten (IEL) migrieren nach der Geburt in das Darmepithel und verändern sich altersabhängig in ihrem Phänotyp (Acheson und Luccioli, 2004; Rothkötter, 2009). Während am fünften Lebenstag 80% der Lymphozyten im Darmepithel CD2⁺, 20% CD8⁺ und 7% CD4⁺ sind, zeigen neun Monate alte Tiere nur noch eine geringe Zellzahl CD2⁺-T-Zellen (Pabst und Rothkötter, 1999). Während sich im Blut eine altersbedingte Zunahme CD8⁺ T-Zellen zeigt, scheint diese Zellpopulation im Darm mit zunehmendem Alter zu sinken (Pabst und Rothkötter, 1999; Charentantanakul und Roth, 2007). Während es sich bei den CD4⁺CD8⁻ und CD4⁺CD8⁺-T-Zellen meistens um αβ-T-Zellen handelt, stellen die CD4⁺CD8⁺-T-Zellen oft γδ-T-Zellen dar (Charentantanakul und Roth, 2007; Burkey et al., 2009).

In immunologischen Studien konnte beobachtet werden, dass es in Abhängigkeit der vorhandenen T-Zellrezeptoren auf den Zellen zu qualitativ unterschiedlichen Immunantworten kommt (Tamura et al., 2003; Acheson und Luccioli, 2004). Intraepitheliale T-Zellen, die über eine MHCI- und MHCII-abhängige Antigenpräsentation aktiviert werden, sind meistens durch die Expression des αβ-T-Zellrezeptors charakterisiert. Die γδ-T-Zellen und αβ-T-Zellen, die CD8α exprimieren, reagieren meistens MHC-unabhängig auf Antigene und zeigen dabei zytolytische Eigenschaften (Hayday et al., 2001; Burkey et al., 2009). Es wird daher angenommen, dass es diesen Zellpopulationen möglich ist, direkt mit Pathogenen zu reagieren (Williams, 1998; Born et al., 1999; Acheson und Luccioli, 2004). Demnach

scheinen diese Zellen eine wichtige Rolle im Rahmen angeborener Immunmechanismen zu spielen.

Daneben gibt es auch CD4⁻CD8⁻ T-Zellen, die wahrscheinlich sowohl naive T-Zellen als auch Null-Zellen darstellen (Johnson und Kudsk, 1999; Acheson und Luccioli, 2004). Eine besondere Eigenschaft der intraepithelialen T-Zellen liegt in der Expression des CD8 $\alpha\alpha$ Homodimers (Cheroutre, 2004; Wershil und Furuta, 2008; Burkey et al., 2009).

Der Anteil intraepithelialer Lymphozyten steigt nach der Geburt relativ schnell an und erreicht bereits nach zwei Monaten die Werte adulter Schweine (Rothkötter et al., 1999). So befinden sich im Jejunum 20-30 Lymphozyten bezogen auf 100 Enterozyten (Rothkötter, 2009). Intraepitheliale Lymphozyten sind über der Basalmembran angrenzend an den Epithelzellen lokalisiert (Acheson und Luccioli, 2004; Wershil und Furuta, 2008).

Die *Lamina propria* kann funktionell in zwei Regionen geteilt werden, in die *Lamina propria* der Villi und die der Krypten (Rothkötter, 2009). Während im Bereich der Krypten B-Zellen, Plasmazellen und Vorläuferzellen von Plasmazellen beherbergt sind, findet man im Bereich der Villi CD2⁺CD4⁺-T-Zellen (Rothkötter et al., 1994; Haverson et al., 1999; Pabst und Rothkötter, 1999; Rothkötter, 2009). Während die Mehrzahl der T-Zellen am fünften Lebensstag lediglich CD2 exprimiert, verändert sich der Phänotyp bis zum zwölften Lebensstag durch eine zusätzliche Expression von CD4 und CD8 (Pabst und Rothkötter, 1999). Die in der *Lamina propria* lokalisierten CD4⁺-T-Zellen charakterisieren sich weiterhin durch die Expression von CD45RC und die Freisetzung von IFN- γ , IL-4 und IL-10 und werden daher als Helfer-T-Zellen bezeichnet (Pabst und Rothkötter, 1999; Acheson und Luccioli, 2004; Wershil und Furuta, 2008). Während CD4⁺-T-Zellen als Helfer-T-Zellen agieren, zeigen die CD8⁺-T-Zellen zytotoxische Funktionen (Acheson und Luccioli, 2004). Über die Freisetzung von IL-12 durch Makrophagen, dendritische Zellen und Epithelzellen werden zusätzlich NK-Zellen in der Schleimhaut aktiviert (Acheson und Luccioli, 2004).

Dendritische Zellen befinden sich sowohl in der *Lamina propria* als auch in der *Lamina epithelialis* (Bailey, 2009; Rothkötter, 2009; Summerfield und McCullough, 2009). Die phänotypische Bestimmung dendritischer Zellen erweist sich beim Schwein als schwierig, da sie in Abhängigkeit ihrer Lokalisation verschiedene Oberflächenmoleküle exprimieren und diese teilweise mit anderen Zelltypen kreuzreagieren (Bailey, 2009; Summerfield und McCullough, 2009). Dendritische Zellen, die aus der Schleimhaut von Schweinen isoliert wurden, zeigten sich für das Oberflächenmolekül CD16 positiv und waren in der Lage, eine starke T-Zell-Antwort zu induzieren (Haverson et al., 2000; Bailey, 2009). Daneben konnten aber auch die Oberflächenmoleküle SWC3, CD45, MHCII, CD11 und CD172 nachgewiesen werden (Haverson et al., 2000; Stokes und Bailey, 2000; Bailey, 2009).

Immunologische Toleranz ist ein entscheidender funktioneller Aspekt im Darm, insbesondere hinsichtlich der Verträglichkeit von Futterproteinen. In Abhängigkeit des Angebotes von Futterkomponenten ändern sich sowohl morphologische als auch immunologische Gegebenheiten des Darmepithels (Stokes et al., 2004). Die mit dem Absetzen verbundene Futterumstellung wird von deutlichen Veränderungen im lokalen Immunsystem des Darms begleitet. Als Zeichen einer aktivierten Immunantwort konnten nach dem Absetzen erhöhte Antikörperkonzentrationen gegen bestimmte Futterproteine wie Glyzinin und β -Konglyzinin aus der Sojabohne beobachtet werden (Li et al., 1990; Dréau et al., 1994; Dréau et al., 1995; Lallès et al., 2007). Im Zuge der Auseinandersetzung mit nutritiven Antigenen konnte ein Anstieg IgG-produzierender Zellen und von CD4⁺-T-Zellen in der *Lamina propria* des Duodenums beobachtet werden (Dréau et al., 1995). Ebenfalls wurden im Epithel des

Duodenums sowohl erhöhte Zellzahlen eosinophiler Granulozyten als auch erhöhte Zellzahlen an B- und T-Zellen ermittelt (Dréau et al., 1994; Dréau et al., 1995). Neben lokalen Immunreaktionen konnten auch systemische Reaktionen auf Sojaproteine beobachtet werden. Diese äußerten sich in erhöhten Immunglobulin M- und G₁-Konzentrationen im Serum der abgesetzten Ferkel (Li et al., 1990; Dréau et al., 1994).

Nach dem Absetzen sind Veränderungen im Zytokinmuster des Darms durch regionale Unterschiede charakterisiert und konnten durch eine schnell eintretende erhöhte Genexpression von IL (Interleukin)-1 β , IL-6 und TNF (Tumor Necrosis Factor)- α nachgewiesen werden (Pié et al., 2004). Während die Konzentrationen von IL-1 β und IL-6 in den ersten Tagen nach dem Absetzen allmählich wieder absinken und Ausgangswerte erreichen, scheint die Konzentration von TNF- α vor allem im Ileum und Kolon weiterhin erhöht zu sein. Die Gewebekonzentration des anti-inflammatorischen Zytokins und Wachstumsfaktors TGF- β 1 in den Epithelzellen des Duodenums und Jejunums zeigt im Bereich der Villi nach dem Absetzen einen transienten Abfall, während im Bereich der Krypten ein Anstieg beobachtet wurde (Mei und Xu, 2005). Ebenfalls steigt die Anzahl TGF- β 1 exprimierender Leukozyten in den Bürstensaumzellen. Daneben wurde nach dem Absetzen auch ein Abfall der Laktoferrin-Genexpression im Duodenum beobachtet (Wang et al., 2006).

Da die Futterumstellung nach dem Absetzen zu einer transienten bakteriellen Imbalance im Darm führen kann, begünstigt der vorübergehende Verlust protektiver bakterieller Schutzmechanismen der darmeigenen Mikroflora entzündliche Prozesse im Darm (Bailey et al., 2005b). Die mikrobielle Imbalance führt neben der Futterumstellung zu lokalen und systemischen Reaktionen des Immunsystems der Ferkel.

2.1.4. Gastrointestinale Erkrankungen nach dem Absetzen

Die gastrointestinalen Erkrankungen gehen bei Ferkeln mit Durchfall einher und führen zu gravierenden Störungen im Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt. Dabei liegen die pathophysiologischen Ursachen entweder in einer gesteigerten Sekretion oder einer verminderten Rückresorption von Flüssigkeit (Pluske et al., 2002).

Verschiedene Erreger wie u.a. *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens* sowie Rota- und Coronaviren können diese Durchfälle bedingen. Aber auch Futterkomponenten wie schlecht verdauliche Kohlenhydrate können als osmotisch wirksame Substanzen zu Durchfallerkrankungen führen.

Da es sich bei den Ursachen und der Pathogenese sowie der Beteiligung verschiedener Komponenten der Durchfallerkrankungen bei den Ferkeln in der Absetzperiode um komplexe und teilweise multifaktorielle Mechanismen handelt, sei an dieser Stelle auf Übersichtsarbeiten verwiesen, die sich ausführlich mit dieser Thematik beschäftigten (Pluske et al., 2002; Montagne et al., 2004; Fairbrother et al., 2005; Lallès et al., 2007).

2.2. Pflanzliche Futterzusatzstoffe

Bei pflanzlichen Zusatzstoffen handelt es sich um eine Gruppe unterschiedlicher Substanzen von Kräutern und Gewürzen sowie Samen, Wurzeln und Blättern. Der Einsatz von Pflanzen und Gewürzen findet aufgrund verschiedener postulierter Wirkungen in der Humanmedizin

schon länger Verwendung (Raskin et al., 2002; Block und Mead, 2003; Geller und Studee, 2005; Westendarp, 2006; Ruth und Jonathan, 2007; Schmidt et al., 2008; Cassileth et al., 2009; Head und Kelly, 2009) und wird auch in der Tiermedizin und Tierernährung zunehmend praktiziert. Bei dem Einsatz zu therapeutischen Zwecken unterliegen diese Substanzen den Vorschriften des Arzneimittelgesetzes. Futtermittelzusatzstoffe gelten nicht als Arzneimittel, demnach darf ihre primäre Anwendung nicht hinsichtlich einer therapeutischen Wirkung erfolgen. Die Verwendung von pflanzlichen Stoffen als Zusatzstoffe in der Tierernährung darf deshalb nur zu den in der Verordnung (EG) Nr.1831/2003 festgelegten Zwecken erfolgen. Vor dem Inkrafttreten der Verordnung (EG) Nr.1831/2003 galten ätherische Öle und Pflanzenextrakte sowie Kräuter futtermittelrechtlich als natürlich vorkommende Substanzen und wurden im Bereich der Zusatzstoffe den „Aroma- und appetitanregenden Stoffen“ zugeordnet (Richtlinie 70/524/EWG). Oft wurden auch prophylaktische und therapeutische Effekte angeführt, die wissenschaftlich noch nicht belegt waren und für deren Einsatz keine Zulassung bestanden. Mit dem Inkrafttreten der Verordnung (EG) Nr.1831/2003 wurde der Einsatz von Zusatzstoffen in der Tierernährung neu geregelt. Laut Artikel 2 dieser Verordnung werden Futtermittelzusatzstoffe als Stoffe, Mikroorganismen oder Zubereitungen definiert, die dem Futter bewusst zugesetzt werden und zu einer positiven Beeinflussung des Futters, der Tiergesundheit und der Beschaffenheit tierischer Erzeugnisse führen sollen. Pflanzliche Zusatzstoffe zeigen aufgrund ihrer aromatischen und funktionellen Inhaltsstoffe Effekte, die auf verschiedene Arten eine Stabilisierung der Tiergesundheit ermöglichen können, zu einer Reduzierung der Umweltbelastung durch tierische Ausscheidungsprodukte beitragen und die Leistungsfähigkeit der Tiere verbessern können. Diese Effekte scheinen unter dem Aspekt kritischer hygienischer Fütterungs- und Haltungsbedingungen deutlicher in Erscheinung zu treten (Wald, 2004; Windisch et al., 2008).

Für die pflanzlichen Zusatzstoffe werden im Sprachgebrauch Begriffe wie „phytogene Zusätze“, „Botanicals“, „Plants“, „Kräuter“, „Phytobiotika“, „Gewürze“ und gelegentlich auch „ätherische Öle“ synonym verwendet (Raskin et al., 2002; Wald, 2003; Geller und Studee, 2005; Ehrlinger, 2007; Head und Kelly, 2009).

Durch den Einsatz von Pflanz Zubereitungen in der Humanmedizin konnten positive Effekte unter anderem zur Unterstützung und Prophylaxe von Herz-Kreislaufkrankungen (Bordia et al., 1981; Elson et al., 1989; Warshafsky et al., 1993; Park et al., 1995), zur Stimulierung des Immunsystems (Burger et al., 1993), als Infektionsprophylaxe (Di Martino et al., 2006), im Rahmen der Behandlung von Tumorerkrankungen (Elson und Yzu, 1994; Gardin, 2009), zur regulatorischen Unterstützung von Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie (Sharma und Raghuram, 1990; Sprecher et al., 1993), zur therapeutischen Unterstützung psychosomatischer und psychischer Erkrankungen sowie zur Behandlung von Magen- und Darmerkrankungen (Craig, 1999; Pandian et al., 2002) beobachtet werden.

Der Einsatz pflanzlicher Zusatzstoffe in der Tierernährung erfolgt meistens in Form getrockneter, gemahlener oder gerebelter Pflanzenteile, die als pulverisierte Mischung, in Form von wässrigen Extrakten oder ätherischen Ölen sowie auch als chemisch isolierte Fraktionen einzelner Inhaltsstoffe Verwendung finden (Elson et al., 1989; Gößling, 2001; Jugl-Chizzola et al., 2003; Chrastinová et al., 2007; Großpörtl et al., 2007).

Bei den aktiv wirksamen Substanzen handelt es sich um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Flavonoide, Phenole, Saponine und ätherische Öle (Raskin et al., 2002; Wald, 2004; Schmidt et al., 2008). Allerdings scheinen auch pflanzliche Kohlenhydrate wie Fruktose- und

Mannanoligosaccharide nicht nur ernährungsphysiologische Funktionen zu erfüllen (Guggenbichler et al., 1997; El-Abasy et al., 2002; Lee et al., 2006b; Graff et al., 2009). Aufgrund der vielfältigen Zusammensetzung pflanzlicher sekundärer Inhaltsstoffe stellt sich die Erschließung der möglichen Wirkmechanismen als komplexe Anforderung dar. Häufig handelt es sich bei den pflanzlichen Zusatzstoffen um Mischungen verschiedener Pflanzen, deren Wirksamkeit möglicherweise durch die Kombination der aktiv wirkenden Substanzen erreicht wird, welche sich untereinander beeinflussen können (Raskin et al., 2002; Wald, 2004; Schmidt et al., 2008; Windisch et al., 2008). Die postulierte Wirkung begründet sich häufig aus einer Kombination sekundärer Inhaltsstoffe sowie deren relativer Anteile und möglicher synergistischer Effekte. Rückschlüsse zu Wirkungen aktiver Inhaltsstoffe sind selbst innerhalb einer Pflanzenart schwierig, da sich das Verhältnis der Stoffe durch die Anbaubedingungen der Pflanze verändern kann. Schlussfolgerungen zu Wirkmechanismen ergeben sich daher häufig durch die Betrachtung prinzipieller Wirkweisen der einzelnen Inhaltsstoffe (Wald, 2004; Westendarp, 2006). Häufig werden demnach zum Beispiel für gastrointestinale Effekte Bitterstoffe, Gerbstoffe, Schleimstoffe, Saponine, Flavonoide, ätherische Öle, Scharfstoffe und Alkaloide verantwortlich gemacht.

Allerdings sollte beachtet werden, dass die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe neben den positiven Effekten dosisabhängig auch negative und toxische Wirkungen besitzen können (Gizycki v., 1954; Larkin, 1983; Saxe, 1987; Craig, 1999). Während die Einnahme von Süßholzwurzel protektive Wirkungen gegen Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre zeigt, wurden durch exzessive Einnahme auch Todesfälle beschrieben, die durch Hypokaliämie, Hypertonie und Herzversagen verursacht wurden (Nielsen und Perderson, 1984). Etliche Pflanzen weisen erhöhte Gehalte an Alkaloiden auf, durch deren erhöhte Einnahme es zu schweren neurologischen, kardiovaskulären und gastrointestinalen Störungen kommen kann (Chan et al., 1993).

Aufgrund der Eigenschaften der in Pflanzen aktiv wirksamen Substanzen werden für den Einsatz pflanzlicher Futterzusatzstoffe beim Tier folgende Wirkungen angeführt: verbesserte Futterakzeptanz, Optimierung der Nährstoffresorption und Nährstoffverdaulichkeit, reduzierter Futteraufwand, Stabilisierung der intestinalen Eubiose und Reduzierung der Bildung toxischer Stoffwechselprodukte, wodurch sich die Futteraufnahme, Futtermittelverwertung, Tageszunahmen und Lebendmasse der Tiere erhöhen sollen (Wetscherek, 2002; Westendarp, 2006; Windisch et al., 2008). Daneben sollen pflanzliche Zusatzstoffe eine Modulation unspezifischer und spezifischer Immunmechanismen bewirken und sich auf mikrobielle Prozesse im Darm auswirken (Westendarp, 2006; Windisch et al., 2008).

2.2.1. Einsatz pflanzlicher Zusatzstoffe in der Tierernährung

2.2.1.1. Einflüsse auf die Leistungsparameter

Aufgrund der sensorischen Eigenschaften wie Geschmack und Geruch wird durch den Einsatz verschiedener pflanzlicher Zusatzstoffe eine erhöhte Futteraufnahme postuliert (Wetscherek, 2005), die sich positiv auf die Leistungsparameter auswirkt (Wetscherek, 1995; Wetscherek, 1998; Thieme, 2005; Kroismayr et al., 2006; Westendarp, 2006; Windisch et al., 2008). Die meisten vorliegenden Daten basieren auf Untersuchungen mit dem Einsatz komplexer pflanzlicher Mischpräparate, wodurch die Beurteilung der Wirkung von Einzelsubstanzen kaum möglich ist. Selbst durch den Einsatz von Einzelsubstanzen sind aufgrund der verschiedenen aktiv wirksamen Substanzen keine eindeutigen Rückschlüsse

auf mögliche Wirkmechanismen möglich. Da die meisten Studien mit gesunden Tieren experimentell erfolgten, fehlen vergleichende Untersuchungen in Feldversuchen, um eine Wirkung für den praktischen Gebrauch in Betrieben zu postulieren.

In experimentellen Studien zeigte der Zusatz einer 0,0125% Mischung aus Oregano, Anis, Zitronenschale und Fruktooligosacchariden bei Absetzferkeln sowohl eine erhöhte Futteraufnahme als auch erhöhte Zunahmen der Lebendmasse (Kroismayr et al., 2006). Die Autoren führen diesen Effekt auf die Schmackhaftigkeit des Oreganos zurück, wodurch eine erhöhte Futteraufnahme erzielt wurde. Ähnliche Beobachtungen wurden durch die Applikation des Zusatzes einer Mischung aus Oregano, Anis, Zitronenschale und Fruktooligosacchariden bei Aufzuchtältern gemacht (Großpötzl et al., 2007). Durch den Einsatz des Zusatzstoffes erhöhte sich die Krafftutteraufnahme um 15,2%. Die täglichen Zunahmen stiegen damit aber lediglich um 2,3%.

In der Ferkelaufzucht zeigte sich bei dem Einsatz einer Pflanzenmischung (FRESTA® F, Fa. Delacon) in einer Dosierung von 0,2% über drei Wochen und 0,02% über weitere vier Wochen sowohl eine Verbesserung der Futterverwertung um 7% als auch der Tageszunahmen um 4% (Wetscherek, 2005). Dieser Effekt zeigte sich besonders deutlich in der ersten Aufzuchtwoche, danach waren die Effekte nur noch gering ausgeprägt. In einer anderen Studie konnten die Tageszunahmen bei Absetzferkeln durch die Verabreichung von 0,2% der pflanzlichen Mischung aus *Andrographis paniculata*, *Boerhaavia diffusa* und *Eclipta alba* über drei Wochen und 0,1% über vier weitere Wochen tendenziell gesteigert werden (Wetscherek et al., 2005).

Bei Legehennen führte die Zulage von 0,25% eines Gelbwurzpulvers, Bestandteil des gelben Ingwers (*Curcuma longa*), zu einem verbesserten Futterverzehr (Wenk, 2005). Durch die Verabreichung von 0,05% Anissaat konnten bei Versuchen mit Broilern die Körpermassezunahmen signifikant verbessert werden (El-Deek et al., 2002). Die Wirkung wurde hier auf das im Anis enthaltene ätherische Öl Anethol zurückgeführt, welches süß schmeckt und unter anderem auch die Sekretion von Gallensaft und Verdauungsenzymen fördern soll (Westendarp, 2006).

Die Studien zeigen, dass durch den Einsatz verschiedenster pflanzlicher Futterzusätze tendenzielle leistungsfördernde Effekte bei gesunden Tieren unter optimalen Haltungsbedingungen erzielt werden können. Die Effekte scheinen dabei durch mehrere Faktoren, insbesondere die Konzentration und das Spektrum wirksamer Inhaltsstoffe beeinflusst zu werden. Daneben spielen scheinbar auch tierindividuelle Faktoren wie die Integrität des Verdauungstrakts und das Alter eine Rolle, wodurch sich unterschiedliche Studienergebnisse trotz des Einsatzes gleicher pflanzlicher Futterzusätze erklären lassen könnten. Das Futter stellt aufgrund verfügbarer Nährstoffquellen ebenfalls einen beeinflussenden Faktor dar. So zeigte die Verabreichung von 1,8% *Echinacea purpurea* (L) MOENCH in der Aufzucht von Legehennen keine Effekte auf die Lebendmasse und Futterverwertung. Auch bei einer Dosierung von 4,8% während der Legephase konnten keine Einflüsse auf das Eigewicht und die Legeleistung ermittelt werden (Böhmer, 2005; Chrastinová et al., 2007; Oswald und Wetscherek, 2007). In einem Versuch mit Broilern erzielten die Tiere bei einer Zulage von 2,4% *Echinacea purpurea* keine verbesserten Leistungsparameter im Vergleich zur Kontrollgruppe (Böhmer, 2005). Eine 1,8%ige *Echinacea*-Zubereitung in einem Mischfutter zeigte keinen Effekt auf die Futteraufnahme von laktierenden Sauen, das Geburtsgewicht der Ferkel sowie Tageszunahmen, Futteraufnahme und Futterverwertung bei Absetzferkeln (Böhmer, 2005). Ebenfalls konnten in einer Studie

mit Absetzferkeln keine Einflüsse auf Wachstum und Futteraufnahme durch den Zusatz verschiedener Konzentrationen einer Pflanzenmischung (Inulin, ätherische Öle) beobachtet werden (Muhl und Liebert, 2007). Der Einsatz von 0,025% eines Oreganoextraktes und eines Salbeiextraktes zeigten keinen Einfluss auf die Lebendmasseentwicklung, die Tageszunahmen und Futterverwertung von Kaninchen (Chrastinová et al., 2007). In einem Versuch mit einem 0,2%igen Oreganoextrakt zeigten sich sogar negative Effekte auf die Wachstumsleistung und den Futteraufwand bei Ferkeln (Oswald und Wetscherek, 2007). Ferkel, welche von Sauen stammten, deren Futter ebenfalls mit 0,2% Oreganoextrakt supplementiert war, zeigten ein um 7% geringeres Absetzgewicht als die Ferkel der Kontrollgruppe. Durch die Zulage des Oreganoextraktes zeigten sich in der Aufzuchtphase eine reduzierte Futteraufnahme um 3% sowie ein erhöhter Futteraufwand um 4%. Im Vergleich zu anderen Studien scheint der negative Effekt durch die Dosierung des Extraktes verursacht worden zu sein.

Auch in vielen anderen Studien konnte bei dem Einsatz von pflanzlichen Futterzusatzstoffen hinsichtlich der Futteraufnahme ein Einfluss der eingesetzten Dosis beobachtet werden. Die Versuchsdaten zeigen, dass eine erhöhte Futteraufnahme oft nur bis zu einer bestimmten Konzentration des Zusatzstoffes erfolgt. Je nach geschmacklicher Eigenschaft scheint es einen Schwellenwert zu geben, nach dessen Überschreitung eine Reduzierung der Futteraufnahme eintritt (Wetscherek, 2002; Wenk, 2005; Windisch et al., 2008). Die Zusammensetzung und der Gehalt an aktiv wirksamen Substanzen in den Mischungen dürften dafür von entscheidender Bedeutung sein (Yang et al., 2009). Des Weiteren wird vermutet, dass die Erhöhung der biliären Sekretion und enzymatischer Verdauungskapazitäten durch bestimmte Pflanzenzusätze ein schneller eintretendes Sättigungsgefühl induziert wird (Thieme, 2005).

Versuche mit chinesischem Medizinalrhabarber (*Rhei radix*) führten bei Ferkeln und Broilern ab einer Konzentration von 0,5% zu einer reduzierten Futteraufnahme (Wenk, 2005). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der Verabreichung von 1% eines Gelbwurzpulvers, Bestandteil des gelben Ingwers (*Curcuma longa*), bei Legehennen gemacht werden (Wenk, 2005). Da der Gehalt aktiver Substanzen in Pflanz Zubereitungen stark variieren kann, ist die quantitative Definition eines Schwellenwertes schwierig. Für die Erstellung von Richtwerten zur Dosierung pflanzlicher Zusatzstoffe in der Tierernährung sind weitere Studien unter genau definierten Bedingungen notwendig.

Insgesamt ist ein Vergleich der Fütterungsstudien hinsichtlich der Bewertung der Leistungsparameter durch den Einsatz pflanzlicher Futterzusätze kritisch zu betrachten, insbesondere da die Studiendesigns in der Regel nicht vergleichbar waren.

2.2.1.2. Einflüsse auf die intestinale Mikrobiota

Es wird vermutet, dass die Einflüsse pflanzlicher Zusatzstoffe auf die Intestinalflora unter anderem das Resultat präbiotischer Effekte unverdaulicher pflanzlicher Oligo- und Polysaccharide (Mannane, Galaktomannane, Fruktooligosaccharide) sind, die eine Stimulation des Wachstums und der Stoffwechselaktivität bestimmter Darmkeime induzieren (Mitsuoka et al., 1987; Langlands et al., 2000; Cummings und Macfarlane, 2002; Guo et al., 2004; Castillo et al., 2006). Die durch die Fermentation entstehenden Metaboliten dienen als Substrat für den Energiestoffwechsel der Epithelzellen im Darm (Wang und Gibson, 1993). Bei den in Pflanzen enthaltenen Polysacchariden handelt es sich neben den Zellwandbestandteilen (Zellulose, Hemizellulose) um Stärke, Nicht-Stärke-Polysaccharide

wie Pektine und verschiedene Oligosaccharide. Daneben finden sich auch Schleimstoffe, die meistens heterogene Kohlenhydratgemische darstellen. Sie bilden hochvisköse, hydrokolloidale Lösungen (Srichamroen et al., 2009). Neben einer puffernden und lokal reizmildernden Wirkung wird durch Schleimstoffe möglicherweise auch die Resorptionsleistung im Darm reduziert (Jugl-Chizzola et al., 2003; Westendarp, 2006; Ehrlinger, 2007; Srichamroen et al., 2009). Dies könnte unter Umständen zu einer Leistungsminderung bei Nutztieren führen.

Verschiedene pflanzliche Polysaccharid- und Oligosaccharidfraktionen zeigten *in vitro* positive Einflüsse auf das Wachstum von Bifidobakterien und Laktobazillen (Wang und Gibson, 1993; Cummings und Macfarlane, 2002). Dieser Effekt wird durch eine für die Bifidobakterien und Laktobazillen bessere Verfügbarkeit der angebotenen Kohlenhydratfraktionen begründet, wodurch das Wachstum dieser Bakteriengattungen gefördert wird. Daneben konnten wachstumshemmende Effekte für *E. coli*, *Clostridium perfringens* und *Salmonella enterica* Typhimurium beobachtet werden (Wang und Gibson, 1993; Naughton et al., 2001). *In vitro* konnte bei 2,5%igen wässrigen Lösungen von Mannose und Fruktooligosacchariden eine signifikante Reduktion der mit einer Gewebesuspension des proximalen Jejunums assoziierten Anzahl von *E. coli* ermittelt werden. Im distalen Ileum konnte eine quantitative Reduktion der Salmonellenzahl durch den Zusatz von Mannose beobachtet werden. Die Wachstumshemmung durch Zusatz von Oligosacchariden war bei *E. coli* stärker ausgeprägt als bei *Salmonella enterica* spp. (Naughton et al., 2001). Eine Konzentrationszunahme von Bifidobakterien und Laktobazillen am Epithel humaner Kolonzellen konnte bei der täglichen Verabreichung von 15g einer Inulin/Oligofruktose-Mischung an Probanden beobachtet werden, während sich die Anzahl an Bacteroides, Clostridien und Enterobakterien nicht veränderte (Langlands et al., 2000; Cummings und Macfarlane, 2002). Die tägliche Verabreichung von 8g eines Fruktooligosaccharidpulvers führte bei Menschen ebenfalls zu einer Erhöhung der Populationen an Bifidobakterien und Laktobazillen, die nach Beendigung der Applikation allerdings innerhalb kurzer Zeit zu den Ausgangswerten zurückkehrte (Mitsuoka et al., 1987). Dies lässt vermuten, dass eine nachhaltige Veränderung der Mikrobiota demnach von einer dauerhaften Zufuhr der Kohlenhydrate abhängig sein könnte. Die Fermentation der Oligosaccharide scheint zumindest beim Menschen bevorzugt durch Laktobazillen und Bifidobakterien zu erfolgen.

Allerdings zeigen sich auch beim Tier wachstumsfördernde Effekte auf Laktobazillen und Bifidobakterien sowie auf deren metabolische Aktivitäten durch den Einsatz pflanzlicher Oligosaccharide. Eine 4%ige Galaktooligosaccharidmischung führte in einem Fütterungsversuch mit abgesetzten Ferkeln zu einem Anstieg der Konzentrationen von *Bifidobacterium* spp. und *Lactobacillus* spp. im proximalen Kolon (Tzortzis et al., 2005). Gleichzeitig erhöhte sich auch die Azetatkonzentration im Kolon der Tiere, während die Konzentrationen von Propionat und Butyrat unbeeinflusst blieben. Die Verabreichung einer 1,6%igen Inulinzubereitung zeigte ebenfalls wachstumsfördernde Effekte auf die Populationen von *Bifidobacterium* spp. und *Lactobacillus* spp. im distalen Kolon sowie auf *Bacteroides* spp. im proximalen Kolon von Schweinen (Tzortzis et al., 2005). Gleichzeitig konnte auch hier ein Anstieg der Azetat- und Butyratkonzentrationen im distalen Kolon beobachtet werden. Da Azetat und Butyrat Endprodukte der mikrobiellen Fermentation darstellen, wird die erhöhte Konzentration dieser Substrate auf die Verfügbarkeit der Oligosaccharide für die Mikrobiota im Dickdarm zurückgeführt. Erhöhte

Azetatkonzentrationen scheinen demnach aus einer erhöhten Zellzahl laktatbildender Bakterien zu resultieren. Der Einsatz von Inulin konnte auch in anderen Studien zu positiven Effekten auf die Zusammensetzung und metabolische Aktivität der intestinalen Mikrobiota führen, dabei scheinen schon geringe Konzentrationen von Inulin wirksame Effekte im Darm erzielen zu können. Eine 0,4%ige Inulinapplikation zeigte zwar keine wachstumsfördernden Effekte auf Laktobazillen und Bifidobakterien in Jejunum und Ileum von Ferkeln, führte aber zu einer Erhöhung der Gesamtzahl an Aerobiern und Enterokokken (Mair et al., 2010). Im Kolon konnte dagegen neben einem Anstieg der Gesamtzahl gramnegativer Bakterien und Enterokokken auch ein signifikanter Anstieg der Laktobazillen nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigte sich im Kolon eine erhöhte Laktatkonzentration (Mair et al., 2010). Die Erhöhung der Laktatkonzentration wurde auch in dieser Studie auf eine erhöhte metabolische Aktivität durch Zunahme der bakteriellen Zellzahl zurückgeführt. Ähnliche Beobachtungen zur Zusammensetzung und metabolischen Aktivität der Intestinalflora durch den Einsatz verschiedener Oligosaccharide konnten auch beim Geflügel bestätigt werden (Rehman et al., 2008; Yang et al., 2008).

Ein weiterer Effekt pflanzlicher Oligo- und Polysaccharide auf die Intestinalflora zeigte sich in reduzierten intestinalen pH-Werten, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet wurden (Mitsuoka et al., 1987; Wang und Gibson, 1993; Gibson und Roberfroid, 1995; Cummings und Macfarlane, 2002; Rehman et al., 2008; Mair et al., 2010). Dabei konnte im Vergleich zu anderen im Darm vorkommenden Bakteriengattungen durch die Fermentation von Oligosacchariden ein deutlicher pH-Wertabfall in Assoziation mit Laktobazillen und Bifidobakterien beobachtet werden (Wang und Gibson, 1993). Der niedrige pH-Wert hängt wahrscheinlich mit der Konzentration fermentierter Fettsäuren und Laktat zusammen. Zusätzlich scheint sich ein niedriger pH-Wert nicht negativ auf das Wachstum von Bifidobakterien und Laktobazillen auszuwirken. Während bei niedrigen pH-Werten das Wachstum dieser Bakteriengattungen unbeeinflusst blieb, konnten wachstumshemmende Effekte für *E. coli* und Clostridien beobachtet werden (Wang und Gibson, 1993). Demnach scheinen pflanzliche Oligosaccharide das Wachstum von Bifidobakterien und Laktobazillen zu fördern und gleichzeitig das Wachstum pathogener Keime zu erschweren bzw. zu verhindern. Eine mögliche Erklärung könnte in der für die Bakterien unterschiedlichen Verfügbarkeit fermentierbarer Oligosaccharide liegen, wodurch ein selektives Wachstum einzelner Bakterienarten möglich wird. Dies wurde durch verschiedene *in vitro*-Studien bestätigt (Mitsuoka et al., 1987; Wang und Gibson, 1993). Bisher konnte dieser Zusammenhang aber nur in wenigen Fütterungsstudien nachgewiesen werden (Rehman et al., 2008; Mair et al., 2010). Dies liegt möglicherweise aber auch daran, dass in etlichen Untersuchungen keine Messung des pH-Wertes erfolgte.

Neben den präbiotisch wirksamen pflanzlichen Oligosacchariden zeigen auch andere pflanzliche Substanzen Einflüsse auf verschiedene intestinale Bakterienarten. Direkte antimikrobielle Wirkungen konnten bei *in vitro*-Studien nachgewiesen werden (Hammer et al., 1999; Dorman und Deans, 2000; Burt und Reinders, 2003; Burt, 2004; Peñalver et al., 2005; Si et al., 2006). Diese Effekte beruhen hauptsächlich auf dem in Pflanzen vorkommenden Anteil ätherischer Öle. Aufgrund hydrophober Eigenschaften können ätherische Öle durch die Zellwand von Bakterien dringen und über osmotische Veränderungen zum Zelltod führen. Die benötigten Konzentrationen von pflanzlichen Extrakten in vorliegenden Studien zur Ermittlung minimaler Hemmstoffkonzentrationen

zeigten teilweise deutliche Überschreitungen der für die Fütterung von Tieren tolerierbaren Dosis (Burt, 2004; Wald, 2004; Peñalver et al., 2005).

In den *in vitro*-Studien zeigte sich auch, dass gramnegative Keime wesentlich empfindlicher als grampositive Bakterien auf ätherische Öle und Pflanzenextrakte reagieren (Hammer et al., 1999; Dorman und Deans, 2000; Si et al., 2006; Watt et al., 2007). Das Wirkspektrum pflanzlicher Stoffe schließt darm-pathogene Bakterienstämme wie *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. ein (Burt und Reinders, 2003; Si et al., 2006; Watt et al., 2007). Besonders hohe antimikrobielle Wirkungen konnten *in vitro* für die ätherischen Öle von Oregano, Thymian, Zitronengras, Koriander, Pfefferminz und Beifuss beobachtet werden (Hammer et al., 1999; Wald, 2004; Peñalver et al., 2005). Die antimikrobielle Wirkung ätherischer Öle scheint vom Gehalt phenolischer Verbindungen abhängig zu sein (Peñalver et al., 2005). Der Einsatz von 0,1% eines Phenolextraktes aus chinesischem Tee zeigte *in vitro* signifikante wachstumshemmende Effekte auf *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* und *Bacteroides* spp. (Lee et al., 2006).

In einer weiteren *in vitro*-Studie konnte eine antimikrobielle Wirkung von isolierten *Quillaja saponaria*-Saponinen auf *Escherichia coli* nachgewiesen werden (Sen et al., 1998). Dabei zeigten sich neben einer konzentrationsabhängigen Hemmung des bakteriellen Wachstums auch unterschiedliche biologisch starke Aktivitäten der Saponine. Während verschiedene kommerzielle *Quillaja saponaria*-Saponine das Wachstum eines *E. coli*-Stamms bei Konzentrationen zwischen 0,25% und 1,0% hemmten, erreichte das *Yucca shidigera*-Saponin eine Wachstumshemmung bei 0,25%. Demzufolge scheinen neben den ätherischen Ölen auch Saponine als Wirksubstanzen infrage zu kommen.

Bisher gibt es keine eindeutigen Ergebnisse zu möglichen antimikrobiellen Effekten im Verdauungstrakt. Der Einsatz einer wässrigen 0,15%igen und 0,3%igen Pflanzen-Extrakt-Mischung bestehend aus 5% Carvacrol, 3% Zimtaldehyd und 2% Capsicum-Oleoresin führte zu einer Erhöhung der Azetatkonzentration im Zäkum und Kolon von Absetzferkeln (Manzanilla et al., 2004). Gleichzeitig zeigte sich eine Zunahme des Verhältnisses von Laktobazillen zu Enterobakterien. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Studien durch den Einsatz von Mischungen verschiedener ätherischer Öle gemacht (Castillo et al., 2006; Manzanilla et al., 2009). Die Reduktion der Enterobakterien könnte sich durch eine direkte antimikrobielle Wirkung der ätherischen Öle auf selektive Zellpopulationen erklären lassen. Allerdings kamen in der Studie Konzentrationen zum Einsatz, die in ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit weit unter denen vorausgegangener *in vitro*-Studien lagen (Dorman und Deans, 2000). Möglicherweise scheinen demnach auch andere Faktoren wie Futterproteine, der pH-Wert oder die Anwesenheit bestimmter Fettsäuren die beobachteten Effekte beeinflusst zu haben.

Neben antimikrobiellen Effekten und der Beeinflussung der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota und deren Metaboliten scheinen pflanzliche Zusatzstoffe auch die Adhäsion von Bakterien, welche einen initialen Schritt in der Pathogenese von gastrointestinalen Erkrankungen darstellt, zu beeinflussen. Dabei erwiesen sich *in vitro* verschiedene Kohlenhydrate, insbesondere saure Polysaccharide wie Oligogalakturonide hinsichtlich einer Blockierung der Adhäsion von pathogenen und nichtpathogenen grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen an verschiedenen humanen, murinen und porzinen Epithelzelllinien sowie humanen Erythrozyten als wirksam (Ofek et al., 1977; Neeser et al., 1986; Guggenbichler et al., 1997; Belogortseva et al., 2000; Naughton et al.,

2001; Lee et al., 2004; Di Martino et al., 2006; Lee et al., 2006a; Lee et al., 2006b; Shoaf et al., 2006; Beil und Kilian, 2007; Lee et al., 2009; Ganai et al., 2010).

Da etliche Bakterienstämme bei der Adhäsion spezifische Bindungsaffinitäten gegenüber verschiedenen Oligosaccharidfraktionen an terminalen Domänen mukosständiger Rezeptoren auf den Wirtszellen zeigen, vermutet man eine Interaktion der Bakterien mit pflanzlichen Oligosacchariden, die der einer Rezeptorbindung ähnlich scheint (Ofek et al., 1977; Neeser et al., 1986; Sharon, 1987; Ofek und Sharon, 1990). In einer *in vitro*-Studie wurden die Effekte verschiedener pflanzlicher Oligosaccharide auf die Adhäsion humaner uropathogener *E. coli*-Stämme untersucht (Guggenbichler et al., 1997). Dabei erfolgte unter anderem die wässrige Extraktion saurer Oligosaccharide aus Karotten, die bei einer Konzentration von 1,4% zu einer vollständigen Blockierung der Bakterienanhaftung an den Epithelzellen führten. Saure Galakturonide von Orangen zeigten bei einer Konzentration von 0,2% eine fast vollständige Blockierung der bakteriellen Adhäsion. Für saure Pektine aus Äpfeln konnte ebenfalls eine vollständige Blockierung erzielt werden. Bei einer Konzentration von 0,005% konnte durch den Zusatz der sauren Oligosaccharide aus Karotten, Orangen und Äpfeln eine Blockierung von 69,3% bis 82,7% erreicht werden. Demnach scheinen saure Galakturonide ein besonders starkes Inhibitionspotenzial auf die Adhäsion von Bakterien zu haben.

Ein starkes Inhibitionspotenzial pflanzlicher saurer Polysaccharide konnte auch in anderen *in vitro*-Studien an unterschiedlichen Bakterienstämmen ermittelt werden. Dabei konnte durch saure Polysaccharide, isoliert aus den Blättern des grünen Tees, *Camellia sinensis*, eine dosisabhängige Blockierung der Adhäsion von *Helicobacter (H.) pylori* an einer humanen Adenokarzinomzelllinie (AGS) des Magens von bis zu 80% und eine Blockierung der Adhäsion von *Staphylococcus (S.) aureus* von 30% und *Propionibacterium (P.) acnes* von 50% an der murinen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 beobachtet werden (Lee et al., 2006a; Lee et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch den Einsatz saurer Polysaccharide aus Blättern des orientalischen Beifuss (*Artemisia capillaris*), der Wurzel des sibirischen Ginsengs (*Panax ginseng*) und der Pelargonienwurzel (*Pelargonium sidoides*) ermittelt (Lee et al., 2004; Lee et al., 2006b; Beil und Kilian, 2007). Während Oligosaccharide des orientalischen Beifuss die Adhäsion von *H. pylori* an der humanen Adenokarzinomzelllinie AGS bei steigender Konzentration um bis zu 89,3% blockierten, zeigte sich bei sibirischem Ginseng ein maximaler Wert von 64,5% (Lee et al., 2004; Lee et al., 2006b). Durch einen Pelargonienwurzelextrakt konnte die Adhäsion von *H. pylori* an humanen Erythrozyten um bis zu 70% gesenkt werden (Beil und Kilian, 2007). Als bioaktive Komponenten der isolierten Saccharidfraktionen wurden in fast allen Studien Galakturonide, Glukurone, Galaktose und Arabinose identifiziert. Zusätzlich scheint der Polymerisationsgrad das Wirkpotenzial der Galakturonide zu beeinflussen. Während für saure Monogalakturonide keine Blockierungswirkung nachgewiesen wurde, zeigte sich in Abhängigkeit des Polymerisationsgrades eine Zunahme der biologischen Aktivität (Guggenbichler et al., 1997). So konnte bei einer Konzentration von 0,005% durch Trigalakturonide eine Blockierung von 92,4% erreicht werden. Für Digalakturonide lag diese bei 67,9%, für Tetra- und Penta-/Hexagalakturonide bei 76,1% bzw. 47,1% (Guggenbichler et al., 1997). Demnach scheinen Polygalakturonide mit niedrigem Polymerisationsgrad die höchste Blockierungskapazität gegenüber pathogenen *E. coli*-Stämmen an Uroepithelzellen zu zeigen. Hinsichtlich einer antiadhäsiven Wirkung saurer Oligosaccharide gegenüber enteropathogenen Keimen erfolgten *in vitro*-Untersuchungen mit Pektinen aus der Orange und *Campylobacter (C.)*

jejuni an einer Caco-2-Zelllinie (Ganan et al., 2010). Dabei zeigte sich, dass das Ausmaß der Adhäsion der Bakterien durch die Pektine unbeeinflusst blieb, allerdings konnte die Invasion konzentrationsabhängig signifikant gesenkt werden. Möglicherweise scheint eine Interaktion pflanzlicher Oligosaccharide auch mit gebundenen Bakterien möglich. Der genaue Mechanismus scheint aber noch unklar.

In vitro-Untersuchungen mit enteropathogenen *E. coli*-Stämmen konnten durch den Einsatz verschiedener Oligosaccharide wie u.a. Inulin [In-S und In-O], Galaktooligosaccharide, Fruktooligosaccharide, Raffinose, Galaktose und Laktulose bei einer Konzentration von 1,6% eine Reduzierung der bakteriellen Adhäsion an humanen Epithelzellen (HEp-2) und humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen (Caco-2) erreichen (Shoaf et al., 2006). Für beide Zelllinien konnte eine Hemmung der Adhäsion durch Galaktooligosaccharide von 40-70% ermittelt werden. Während die Hemmung durch Galaktooligosaccharide im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen am stärksten war, zeigte Galaktose allein keine antiadhäsiven Effekte, was vermuten lässt, dass sowohl die Kettenlänge als auch die chemischen Verknüpfungen der einzelnen Moleküle einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität zeigen. In einem Versuch mit isolierten Oligosacchariden vom Oligomannosidtyp aus verschiedenen Bohnen (*Glycine max* (L.) Merr. und *Phaseolus vulgaris*) wurde die Blockierung der Adhäsion eines enteropathogenen *E. coli*-Stammes an Erythrozyten des Meerschweinchens und an humanen bukkalen Epithelzellen gemessen (Neeser et al., 1986). Dabei zeigten alle Verbindungen eine Reduktion der bakteriellen Adhäsion an den untersuchten Zellen.

Allerdings scheint eine antiadhäsive Wirkung gegenüber enteropathogenen Bakterien nicht nur über pflanzliche Oligosaccharidstrukturen zu erfolgen. In einer Studie zum Adhäsionsverhalten von *Salmonella* Typhimurium an einer Caco-2-Zelllinie mit polyphenolischen Verbindungen (u.a. Quercetin, Catechin und Naringenin) wurde eine dosisabhängige Reduktion der Adhäsion an Caco-2-Zellen um bis zu 65% bei einer Konzentration von 0,03% Naringenin und Phloridzin beobachtet (Parkar et al., 2008). Da es sich bei Polyphenolen um eine Gruppe heterogener Stoffe handelt, werden mehrere Mechanismen zur antiadhäsiven Wirkung von Polyphenolen diskutiert. Anscheinend ist es durch Polyphenole möglich, die Aktinfilamente des Zytoskeletts von Enterozyten zu beeinflussen und somit den transepithelialen elektrischen Widerstand der Zellen zu erhöhen (Wells et al., 1999). Andererseits wird ein Einfluss einiger Polyphenole wie Catechin auf die interzelluläre bakterielle Kommunikation (Quorum sensing) durch Nachahmung bakterieller Signalmoleküle wie N-Acyl-Homoserin-Laktone (AHL) diskutiert, wodurch eine mikrobielle Biofilmbildung verhindert werden könnte (Huber et al., 2003).

Die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche konnten bisher nur in wenigen *in vivo*-Untersuchungen an verschiedenen Epithelzellen bestätigt werden. Der Großteil der Untersuchungen erfolgte im Bereich der Humanmedizin hinsichtlich der Prophylaxe von Durchfallerkrankungen und Infektionen der unteren Harnwege (Heine et al., 1993; Di Martino et al., 2006).

Die tägliche Einnahme von 750ml eines 27%igen Moosbeerensaftkonzentrates (*Vaccinium* (*V.*) *macrocarpon*) führte zu einer Reduktion verschiedener uropathogener *E. coli*-Stämme in humanem Urin (Di Martino et al., 2006). Auch hier beeinflusste die Konzentration die Ausprägung der beobachteten Effekte, da durch die Einnahme einer Verdünnung von 250ml Moosbeerensaft mit 500ml Mineralwasser nur noch eine geringfügige Reduktion der Bakterien im Urin erreicht werden konnte.

Die antiadhäsiven Effekte des Moosbeerenkonzentrates konnten neben den für das Virulenzgen *papC* positiven und negativen *E. coli*-Stämmen sogar für Antibiotika-resistente *E. coli*-Stämme mit verschiedenen resistenten Phänotypen beobachtet werden. Allen Stämmen gemeinsam war aber die Expression des Mannose-empfindlichen Fimbrien-Antigens Typ 1, welches die Adhäsion der Bakterien an die Epithelzellen vermittelt (Sharon, 1987). Die Effekte könnten daher aus einer spezifischen Rezeptor-Liganden-Interferenz der bakteriellen Adhäsionsmechanismen resultieren (Ofek et al., 1977; Ahuja et al., 1998). Aufgrund der in der Moosbeere (*V. macrocarpon*) enthaltenen zahlreichen bioaktiven Substanzen wie Oligosaccharide, Proanthocyanidine und Ascorbinsäure scheint der Mechanismus der antiadhäsiven Effekte gegenüber *E. coli* zumindest beim Menschen noch relativ unklar. Bei Mäusen konnte dagegen *in vivo* eine Reduktion der Adhäsion von *E. coli* durch erhöhte Konzentrationen an Proanthocyanidinen nach Verabreichung von Moosbeeren im Urin nachgewiesen werden (Howell et al., 2001).

Zu Effekten bei Nutztieren insbesondere dem Schwein bezüglich einer Blockierung der Adhäsion von pathogenen Mikroorganismen an Epithelzellen gibt es in der Literatur momentan nur wenige Angaben. Die Verabreichung eines 4%igen Fruktooligosaccharidproduktes senkte signifikant die Anzahl von *E. coli* im Jejunum von Absetzferkeln (Naughton et al., 2001). Allerdings handelte es sich hier um einen nichtpathogenen *E. coli*-Stamm. Ebenfalls zeigte sich eine tendenzielle Reduktion der Anzahl von *Salmonella* Typhimurium im Ileum. Dagegen konnten keine Einflüsse durch den Zusatz eines 4%igen Galaktooligosaccharidproduktes auf die untersuchten Bakterien im Darm beobachtet werden (Naughton et al., 2001). Die unterschiedlichen Einflüsse der Produkte wurden hier sowohl auf die biologische Aktivität als auch auf die Wahl der Konzentration zurückgeführt.

2.2.1.3. Einflüsse auf das Immunsystem

Für viele Pflanzen und deren Extrakte werden immunmodulierende Effekte beschrieben. Als mögliche Wirkmechanismen werden eine Aktivierung von Immunzellen, eine Erhöhung der Phagozytoseaktivität oder auch die Induktion verschiedener Zytokine genannt (Craig, 1999). Diese Effekte begründen sich mit einer gewissen Plausibilität daher, dass aktive Gruppen pflanzlicher Inhaltsstoffe mit Oberflächenrezeptoren von Immunzellen reagieren und von diesen als unspezifisches Antigen erkannt werden können (Percival, 2009).

Verschiedene immunologische Reaktionen konnten durch Einflüsse pflanzlicher Inhaltsstoffe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet werden. Dabei war es möglich, sowohl unspezifische als auch spezifische Reaktionen des Immunsystems zu induzieren. Da *in vitro*-Studien unter standardisierten Bedingungen erfolgen, gestaltet sich eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf *in vivo*-Studien schwierig. Neben tierindividuellen und tierartsspezifischen Faktoren werden die Parameter sowohl durch das Alter der Tiere als auch durch die Haltung und den Gesundheitszustand beeinflusst. Erschwerend kommt hinzu, dass eine Standardisierung für pflanzliche Substanzen hinsichtlich der einzusetzenden Konzentrationen aktiv wirksamer Inhaltsstoffe momentan fehlt.

In einer *in vitro*-Studie konnten durch den Einsatz eines Extraktes aus Blättern der *Acanthospermum* (*A.*) *hispidum*-Pflanze, die zur Familie der Korbblüter gehört, kostimulatorische Effekte auf T-Lymphozyten beim Schwein beobachtet werden (Summerfield und Saalmüller, 1998). Isolierte Bluteukozyten vom Schwein zeigten durch Zusatz des Extraktes und zusätzlicher Stimulation mit Con A und Restimulation mit dem

Pseudorabies-Virus eine erhöhte Proliferationsrate. Daneben konnte auch eine leichte Erhöhung der IL-2-Expression beobachtet werden. Die Phänotypisierung der proliferierten Leukozytenpopulationen zeigte, dass die erhöhte Proliferationsrate durch einen Anstieg der $\gamma\delta$ -T-Zellen mit dem Phänotyp $CD2^+CD4^+CD5^{low}CD8^-$ verursacht wurde. Da zusätzlich keine Erhöhung der antigenpräsentierenden Zellen ermittelt werden konnte, wurde eine direkte Wirkung des Pflanzenextraktes auf die $\gamma\delta$ -T-Zellen vermutet. Möglicherweise scheint eine Interaktion biologisch aktiver Moleküle mit den Zellrezeptoren zu erfolgen. Da chemische Analysen des Pflanzenextraktes verschiedene Kohlenhydrate identifizierten, ging man davon aus, dass die Effekte durch pflanzliche Kohlenhydrate induziert wurden. Pflanzliche Kohlenhydrate konnten auch in anderen *in vitro*-Studien immunmodulierende Effekte induzieren.

Durch den Einsatz zwei methodisch unterschiedlich isolierter Galaktomannanfraktionen des Bockshornkleesamens (*Trigonella foenum-graecum*) konnte die Phagozytoserate von Peritonealmakrophagen der Ratte erhöht werden (Ramesh et al., 2002). Die Galaktomannanfraktionen führten in der gleichen Studie auch zu einer Aktivierung humaner HB4C5-Zellen (humane Lymphomzellen) durch eine Erhöhung der Sekretion von IgM. Dabei konnten neben konzentrationsabhängigen Einflüssen auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Galaktomannanfraktionen beobachtet werden, wobei durch die alkalisch extrahierte Polysaccharidfraktion eine höhere Phagozytoseaktivität beobachtet wurde als durch die wässrig extrahierte. Diese Effekte werden durch die chemisch strukturellen Unterschiede der Galaktomannanmoleküle erklärt, wodurch es zu unterschiedlich stark ausgeprägten biologischen Aktivitäten der Moleküle kommt (Ramesh et al., 2002).

Neben der biologischen Aktivität scheint auch die Dosis der verabreichten Substanzen die immunologischen Effekte zu beeinflussen. Der Einsatz eines wässrigen Bockshornkleesamen-Extraktes (*Trigonella foenum-graecum*) in drei verschiedenen Konzentrationen (0,05%, 0,1%, 0,25%) zeigte dosisabhängige Effekte auf unterschiedliche Immunparameter bei der Maus (Bin-Hafeez et al., 2003). Dabei konnte der höchste Hämagglutinationstiter bei einer Dosierung von 0,1% beobachtet werden, während die Titer bei der Verabreichung von 0,05% und 0,25% des Extraktes annähernd gleich hoch waren. Ebenfalls zeigte sich eine deutlich gesteigerte Phagozytoserate der Peritonealmakrophagen bei 0,1%, während sowohl bei einer Konzentration von 0,05% und 0,25% die Phagozytoseaktivität niedriger war. Eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate der Lymphozyten im Serum konnte bei einer Konzentration von 0,25% ermittelt werden, wobei sich die Proliferationsrate mit steigender Konzentration des Bockshornkleesamenextraktes erhöhte. Dies lässt vermuten, dass die eingesetzte Konzentration der Extrakte nicht nur die immunologischen Effekte einer Zellpopulation zu beeinflussen scheint, sondern auch von einer unterschiedlich stark ausgeprägten Reaktion bzw. Sensibilität der verschiedenen Immunzellpopulationen ausgegangen werden könnte.

Konzentrationsabhängige Effekte auf die Ausprägung immunologischer Parameter konnten auch bei *in vivo*-Studien beobachtet werden. In einem Fütterungsversuch mit Schweinen wurde der Einfluss von 0,05-0,2%igem Zuckerrohrextrakt (*Saccharum (S.) officinarum L.*) hinsichtlich der Wirkung auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und die Phagozytoseaktivität von Monozyten und Neutrophilen untersucht (Lo et al., 2005). Sowohl für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen als auch für die Phagozytoseaktivität der Monozyten und Neutrophilen konnte ein signifikanter Anstieg beobachtet werden. Allerdings zeigten die untersuchten Zellpopulationen unterschiedliche Reaktionen auf die eingesetzten

Konzentrationen. Während die Applikation des Extraktes bei 0,1% lediglich zu einer Erhöhung der Phagozytoseaktivität von Monozyten führte, zeigte sich bei einer Konzentration von 0,15% und 0,2% eine Abnahme der Phagozytoseaktivität von Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Während diese bei einer Konzentration von 0,2% für Monozyten vergleichbar mit der Phagozytoseaktivität in der Kontrollgruppe war, konnte bei den Neutrophilen sogar eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden (Lo et al., 2005). Die dosisabhängigen Effekte auf die Phagozytoseaktivität könnten darin begründet liegen, dass es durch hohe Konzentrationen an Mannanen im Zuckerrohrextrakt zu einer kompetitiven Bindung an Mannan-Rezeptoren kommt, die zu einer Herabregulation der Phagozytose führen könnten (Konopski et al., 1993; Shibata et al., 1997; Lo et al., 2005). Außerdem scheinen auch hier mögliche unterschiedliche Reaktionsmuster der verschiedenen Immunzellpopulationen auf die eingesetzten Dosierungen des Pflanzenpräparates zu bestehen.

Während in experimentellen Tierversuchen eine Konzentration von 0,05% des Zuckerrohrextraktes keine Effekte auf die Phagozytoseaktivität von Monozyten und Neutrophilen zeigte, konnte dagegen bei gleicher Konzentration unter Feldbedingungen eine erhöhte Phagozytoseaktivität beider Zellarten ermittelt werden (Lo et al., 2005).

Die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Funktionen der neutrophilen Granulozyten scheinen einerseits in der hohen Variabilität der Phagozytoseaktivität porziner Neutrophiler begründet zu sein als auch in der Dauer der Verabreichung (Lo et al., 2005). Während die experimentelle Studie sieben Tage dauerte, erfolgten die Feldversuche über vier Wochen. Demnach scheinen pflanzliche Substanzen auch einen zeitabhängigen Einfluss auf immunologische Reaktionen zu haben. Neben der Applikationszeit könnten auch die unterschiedlichen Haltungsbedingungen und der Gesundheitszustand der Tiere die Ergebnisse beeinflusst haben.

Der Einsatz von Zuckerrohrextrakt führte auch in anderen Studien zu immunologischen Effekten. Die Verabreichung von 0,05% Zuckerrohrextrakt führte in einem Infektionsversuch mit Schweinen zu einer Aktivierung zytotoxischer NK-Zellen (Lo et al., 2006). Zusätzlich konnte die Proliferationsrate der Monozyten und die IFN- γ -Expression von T-Zellen gesteigert werden (Lo et al., 2006). Während eine erhöhte NK-Zellaktivität sowohl in der ersten als auch in der zweiten Woche nach experimenteller Infektion mit dem Pseudorabiesvirus ermittelt werden konnte, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Lymphozytenproliferationsrate nur in der ersten Woche, eine erhöhte Phagozytoserate der Monozyten und ein Anstieg der IFN- γ produzierenden T-Zellen erst in der zweiten Woche. Die Autoren nahmen an, dass die Infektion der Tiere zu einer starken zellvermittelten Immunantwort geführt hat, in der aktivierte T-Zellen durch die Freisetzung von IFN- γ zytotoxische NK-Zellen stimuliert haben. Die Verabreichung des Zuckerrohrextraktes zeigte stimulierende Effekte auf das Immunsystem und führte zu weniger ausgeprägten Krankheitssymptomen.

Auch bei Hühnern konnte in Infektionsversuchen ein Einfluss von Zuckerrohrextrakt beobachtet werden (El-Abasy et al., 2002; Hikosaka et al., 2007). Dabei führte die Verabreichung von 0,05% Zuckerrohrextrakt nach intravenöser Infektion mit *Brucella (B.) abortus* und Schaferythrozyten zu einer erhöhten Antikörperbildung (El-Abasy et al., 2002).

Als aktiv wirksame Komponenten des Zuckerrohrextraktes werden neben Kohlenhydraten auch Polyphenole diskutiert (Lo et al., 2006). Zur Ermittlung der Wirkung von Polyphenolen aus Zuckerrohr (*S. officinarum L.*) erfolgten in einem Versuch mit Hühnern vergleichende ex

vivo-Untersuchungen mit Zuckerrohrextrakt und einer daraus isolierten polyphenolreichen Fraktion (PRF) (Hikosaka et al., 2007). Dabei konnten sowohl für den Extrakt als auch für die Fraktion PRF eine erhöhte Phagozytoserate der peripheren Blutleukozyten und erhöhte Antikörpertiter gegen *B. abortus* und Schaferythrozyten nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigten sich erhöhte Zellzahlen Immunglobulinproduzierender Zellen im Jejunum und in der Milz. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass neben den Polyphenolen wahrscheinlich auch Kohlenhydrate einen Einfluss auf immunologische Reaktionen haben und eine Stimulation angeborener zellulärer Immunmechanismen induzieren können.

Immunmodulierende Effekte können auch auf antioxidativen Wirkungen beruhen, wodurch ein Zellschutz zu unterstellen ist. Für Polyphenole und Flavonoide werden antioxidative Fähigkeiten als möglicher Wirkmechanismus diskutiert. Die Verabreichung eines Weintraubensaftes (*Vitis labrusca*) wirkte sich positiv auf die antioxidativen Kapazitäten humaner Lymphozyten aus und führte zu einer Steigerung der Proliferationsrate der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut der Probanden (Percival, 2009). Trester aus Weintrauben (*Vitis rotundifolia*) zeigte aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften auch positive immunologische Effekte im Tier. Bei Hühnern konnte durch den Zusatz eines Weintraubentresters (*Vitis rotundifolia*) die Infektionsrate mit *Eimeria* spp. und *Clostridium perfringens* gesenkt werden. Daneben konnten mildere Krankheitsverläufe bei infizierten Tieren beobachtet werden (McDougald et al., 2008).

In einer humanmedizinischen Doppelblindstudie führte die Einnahme eines Frucht- und Gemüsesaftpulverkonzentrates bestehend aus Acerola-Kirschen, Äpfeln, Moosbeeren, Rüben, Möhren, Kohl, Ananas, Pfirsichen, Orangen, Papaya, Petersilie, Spinat und Tomaten in Form von Kapseln zu einer Erhöhung der $\gamma\delta$ -T-Zellen um bis zu 30% und einer Steigerung der Oxidationskapazität (Freisetzung von Sauerstoffradikalen) der Immunzellen im Blut (Nantz et al., 2006).

Neben pflanzlichen Kohlenhydraten, Polyphenolen und Flavonoiden zeigten auch Saponine und ätherische Öle eine immunmodulierende Wirkung. Besonders hohe Konzentrationen an Saponinen finden sich in der Mohave-Palmlilie (*Yucca schidigera*) und in der Rinde des südamerikanischen Seifenrindenbaums (*Quillaja saponaria*) (Watzl, 2001). Dabei erwiesen sich die aus den Saponinen isolierten Triterpenoide als starke Immunstimulanzien, da sie die Expression verschiedener Zytokine induzieren (Behboudi et al., 1997). Isolierte Triterpenoide von *Quillaja saponaria* Molina induzierten bei *in vitro*-Untersuchungen in Verbindung mit einer Infektion eines Influenza-Virus-Stammes sowohl erhöhte Expressionen von IL-6 und IL-1 α durch murine Peritonealmakrophagen als auch von IL-2, IL-4 und TNF- γ durch murine Milzzellen (Behboudi et al., 1997). Auch in Tierversuchen konnten positive immunmodulierende Effekte isolierter Saponin-Triterpenoide nachgewiesen werden (Chavali et al., 1988; Behboudi et al., 1995; Johansson und Lovgren-Bengtsson, 1999; Boyaka et al., 2001). Diese äußerten sich in einer verstärkten Aktivität zytotoxischer T-Zellen im Blut, erhöhten Antikörperspiegeln nach Impfungen oder Infektionen sowie erhöhten Interleukin-4-Konzentrationen im Blut von Mäusen. Saponine steigerten bei Schweinen nach oraler Applikation eines *Quillaja saponaria*-Extraktes die Konzentrationen der Immunglobuline M, G und A im Serum und führte gleichzeitig zu einer dosisabhängigen erhöhten Konzentration von Haptoglobin und C-reaktivem Protein im Blut (Turner et al., 2002a; Ilesley et al., 2005). Die Ergebnisse zeigen, dass Saponine hauptsächlich die zellvermittelte Immunreaktion modulieren, was möglicherweise durch eine stark antigene Wirkung verursacht werden könnte.

Die Wirkungsweise ätherischer Öle auf humorale und zelluläre Immunmechanismen scheint trotz beobachteter Effekte noch unklar. Man vermutet hier die Unterstützung der Internalisierung von Pathogenen über eine Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose (Serafino et al., 2008). In einer *in vitro*-Studie führte der Einsatz eines 0,008%igen und 0,016%igen Eukalyptusöls mit und ohne Stimulation durch ein bakterielles Lipopolysaccharid zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Phagozytoseaktivität humaner Monozyten aus dem Blut (Serafino et al., 2008). Dabei zeigte sich ohne die zusätzliche Stimulation durch das Lipopolysaccharid die höchste Phagozytoseaktivität bei dem Zusatz von 0,016% Eukalyptusöl. Durch die zusätzliche Stimulation mit dem Lipopolysaccharid konnte die höchste Phagozytoseaktivität bei einer Konzentration von 0,008% ermittelt werden, wohingegen bei 0,016% eine Senkung der Zellaktivität beobachtet wurde. Dagegen wurde die Expression der Zytokine IL-4, IL-6 und TNF- α durch das Eukalyptusöl nicht beeinflusst. Die *in vitro*-Untersuchungen lassen auf eine zellvermittelte unspezifische Reaktion des Immunsystems durch ätherische Öle schließen. Allerdings konnten die durch das Eukalyptusöl ermittelten Effekte durch den Einsatz von Lavendelöl und Teebaumöl nicht nachgewiesen werden. Dies könnte anhand der unterschiedlichen aktiven Komponenten in den jeweiligen Ölen erklärt werden.

In vivo-Studien zum Einfluss ätherischer Öle auf immunologische Parameter führen zu Diskrepanzen hinsichtlich einer Aussage zu den nachgewiesenen Effekten. Absetzferkel zeigten nach der Verabreichung einer 0,03%igen Mischung aus 5% Carvacrol, 3% Zimtaldehyd, 2% Capsicum-Oleoresin neben der Erhöhung zytotoxischer T-Zellen und myeloider Zellen im Blut auch eine Reduktion der Gesamtzellzahl der B-Lymphozyten und $\gamma\delta$ -T-Zellen (Nofrarías et al., 2006). In den intestinalen Lymphknoten wurden ebenfalls reduzierte Zellzahlen an Makrophagen, B-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen ermittelt (Nofrarías et al., 2006). Möglicherweise schienen hier tierindividuelle Faktoren und die mit dem Absetzen einhergehenden physiologischen Veränderungen einen größeren Effekt auf die Ausprägung der gemessenen Parameter zu haben als die eingesetzte Pflanzenmischung. Diese Möglichkeit wurde vom Autor durch die im Vergleich zu anderen Studien relativ niedrig gewählte Konzentration des Carvacrols erklärt. Daneben wurden auch mögliche hemmende Effekte des Capsaicins und Zimtaldehyds diskutiert. Die Verabreichung verschiedener Konzentrationen (0.25%, 0.5%) eines Oreganoöls (*Origanum onites*) zeigte dagegen keine Effekte auf die Konzentration spezifischer Antikörperspiegel im Serum von Hühnern gegen das Newcastle Disease-Virus (Basmacioğlu Malayoğlu et al., 2010).

Während durch die Applikation einer Mischung ätherischer Öle keine Effekte auf spezifische Antikörperspiegel bei Hühnern gemessen werden konnte, stiegen bei Mastschweinen durch die Verabreichung von 1,5% *Echinacea purpurea* in gemahlener Form und als Presssaft (4-6ml/Tier/Tag) die Titer spezifischer Rotlaufantikörper im Serum an (Böhmer, 2005). Die Art der Zubereitung zeigte dabei keine Einflüsse auf Ausprägung der Ergebnisse.

Die Ergebnisse der immunologischen Studien lassen vermuten, dass pflanzliche Stoffe die Fähigkeit haben, unspezifische zelluläre Abwehrmechanismen wie die Phagozytoseaktivität und antioxidative Aktivitäten von Leukozyten zu stimulieren. Diese Effekte wurden für Polyphenole, Flavonoide und Zuckerrohrextrakt beschrieben (Lo et al., 2005; Lo et al., 2006; Nantz et al., 2006; McDougald et al., 2008; Percival, 2009). Eine Stimulation unspezifischer zellulärer Immunreaktionen konnte auch für Fische gezeigt werden (Sahu et al., 2007; Nya und Austin, 2009). Eine wiederholte Stimulation von NK-Zellen konnte beim Schwein durch Zuckerrohrextrakt und für $\gamma\delta$ -T-Zellen beim Mensch durch komplexe Pflanzenmischungen

nachgewiesen werden (Lo et al., 2005; Nantz et al., 2006; Percival, 2009). Ebenfalls zeigten sich Einflüsse auf die Ausbildung spezifischer Antikörper beim Schwein durch *Echinacea purpurea* und beim Huhn durch Zuckerrohrextrakt (El-Abasy et al., 2002; Böhmer, 2005). Allerdings resultieren die Fütterungsstudien oft in kontroversen Ergebnissen. Die Interpretationen zu den beobachteten Effekten werden aufgrund des Einsatzes undefinierter pflanzlicher Mischungen zusätzlich erschwert und lassen oft nur Vermutungen zu.

Schlussfolgernd ergibt sich für den Einsatz pflanzlicher Zusatzstoffe, dass diese aufgrund der vielfältigen Zusammensetzung ein interessantes Potenzial für die Anwendung in der Tierernährung haben. Aufgrund der dargestellten Problematik der oft nicht erfolgten Beschreibung von Wirkmechanismen bestehen allerdings viele Probleme bei der Bewertung der Einsatzmöglichkeiten. Wirkungen können aufgrund der vorliegenden Versuchsdaten nur ausnahmsweise bestimmten Stoffgruppen zugeordnet werden. Außerdem ist die Ausprägung von Effekten auch innerhalb einer Stoffgruppe häufig uneinheitlich. Aufgrund starker Variationen an wirksamen Inhaltsstoffen ist die Standardisierung für die Vergleichbarkeit von verschiedenen Studien und die Beurteilung der Reproduzierbarkeit von großer Bedeutung. Dosisabhängige Wirkungen pflanzlicher Zubereitungen wurden unabhängig in verschiedenen Untersuchungen beobachtet, müssen aber umfassender charakterisiert werden.

2.3. Ziel der Arbeit

Im Zuge des Verbotes antibakterieller Leistungsförderer wird verstärkt nach Möglichkeiten gesucht, die Gesundheitsprobleme von Ferkeln in der Absetzphase zu vermindern und die Tiergesundheit mittels alternativer Strategien zu stabilisieren. Die Effekte pflanzlicher Zubereitungen auf den tierischen Organismus haben in den vergangenen Jahren zu einem vermehrten Interesse am Einsatz pflanzlicher Substanzen in der Tierernährung geführt. Neben grundlegenden Leistungseffekten aus Fütterungsversuchen bleiben auch Fragen zu möglichen Wirkmechanismen zu klären.

Folgende Hypothesen waren Grundlage des eigenen Versuchsvorhabens:

Unter Einsatz einer pflanzlichen Futterzusatzstoffmischung (FRESTA® F, Fa. Delacon, Steyregg, Österreich) kommt es zu einer verminderten Adhäsion von enteropathogenen *E. coli*-Stämmen an das Darmepithel von Ferkeln.

Der Einsatz des pflanzlichen Futterzusatzstoffes führt zu einer Beeinflussung der Nährstoffverdaulichkeit und metabolischer Aktivitäten der Intestinalflora.

Die Applikation des pflanzlichen Futterzusatzstoffes hat Effekte auf das lokale und systemische Immunsystem.

Daher gliederte sich die vorliegende Arbeit in zwei Phasen. In der ersten Phase wurden ein kommerzielles pflanzliches Präparat sowie Bockshornkleesamen und Süßholzwurzel in verschiedenen *in vitro*-Modellen hinsichtlich ihrer Effekte auf einen porzinen enteropathogenen *E. coli*-Stamm getestet. Dazu wurden die Einflüsse des Futterzusatzstoffes und der Präparate auf die Adhäsion des *E. coli*-Stamms an eine epitheliale Darmzelllinie vom Schwein untersucht. Weitere Untersuchungen erfolgten zur Ermittlung einer bakteriellen Bindungsfähigkeit des *E. coli*-Stamms an die pflanzlichen Oberflächen. Ein weiteres *in vitro*-Modell sollte Aufschluss über mögliche

konzentrationsabhängige Effekte auf das Wachstum eines enteropathogenen *E. coli*-Stammes geben.

Abschließend wurden in einem Fütterungsversuch die Effekte des kommerziellen Zusatzstoffes und Bockshornkleesamens auf verdauungsphysiologische Parameter, metabolische Aktivitäten der Intestinalflora sowie Parameter des systemischen und intestinalen Immunsystems bei Absetzferkeln untersucht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. In vitro-Untersuchungen

Die *in vitro*-Untersuchungen erfolgten, um zu klären, ob und inwieweit die eingesetzten Pflanzenpräparate einen Einfluss auf pathogene Mikroorganismen ausüben. Im Rahmen der *in vitro*-Untersuchungen wurden an einer porcinen Epithelzelllinie Infektionsversuche mit *E. coli* durchgeführt, Konzentrationseffekte der Pflanzenpräparate auf das Wachstum eines *E. coli*-Stamms getestet und direkte Wechselwirkungen zwischen einem *E. coli*-Stamm und den Präparaten studiert. Eine Übersicht über die verwendeten Materialien und Reagenzien befindet sich im Anhang in den Tabellen 25-26 und 29-30.

Versuchszelllinie

Die IPEC-J2 Zelllinie (*Intestinal Porcine Epithelial Cells–Jejunal 2*) wurde vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um eine nicht transformierte Epithelzelllinie des Jejunums neugeborener Ferkel (Schierack et al., 2006). Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden für die Studie aufgetaut und zu einem Monolayer angezüchtet. Die Zelllinie wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin unter der Tagebuch-Nummer 1998 auf *Mykoplasma* spp. und *Acholeplasma* spp. negativ getestet.

Bakterienstamm

Der benutzte *E. coli*-Stamm wurde von Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt. Isoliert aus einem Schwein war er in der Multiplex-PCR für das Fimbrienantigen F4 sowie für die Virulenzgene *estIa* (heat-stable enterotoxin ST-IA/ST-P) und *estII* (heat-stable enterotoxin STb) positiv. Für die Untersuchungen erfolgte die Anzucht auf LB-Agar und in LB-Medium.

Pflanzliche Testmaterialien

Die benutzten Pflanzenmaterialien wurden von der Firma DELACON (Steyregg, Österreich) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um getrocknetes und pulverisiertes Pflanzenmaterial. Die in Tabelle 1 aufgeführten pflanzlichen Substanzen wurden für die Untersuchungen im Rahmen der *in vitro*-Studien eingesetzt.

Tabelle 1: Übersicht zu den verwendeten pflanzlichen Substanzen in der *in vitro*- Studie

| Bezeichnung |
|---|
| Bockshornkleesamen-Pulver (<i>Trigonella foenum-graecum</i>) |
| FRESTA® F (Kräuter, ätherische Öle) |
| Süßholzwurzel-Pulver (<i>Glycyrrhiza glabra</i>) |

Als aktiv wirksame Komponenten des Bockshornkleesamenpulvers wurden Galaktomannane (28%) und Apigenin-7-Glukosid (Flavonoid, 0,672%) angegeben (Analyse der Fa. Belan Laboranalytik, Wels, Österreich). Für das Süßholzwurzelpulver wurden als aktive Komponenten Glycyrrhizin (saures Saponin, 1,478%), Glycyrrhetin (Saponin, 0,121%), Liquiritin (Flavonoid, 0,067%) und Liquiritigenin (Flavacin, 0,017%) angegeben (Analyse der Fa. Belan Laboranalytik, Wels, Österreich). Aus allen Pflanzenmaterialien wurden für die Untersuchungen 1%ige wässrige Extrakte hergestellt.

Das jeweilige Ausgangsmaterial wurde zu 1 g abgewogen und mit 99 ml deionisiertem Wasser für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer (IKAMAG® RH, Firma Jahnke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland) vermischt. Anschließend wurde die wässrige Phase bei 1800g für 10 Minuten bei 20°C zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0R, Firma Heraeus, Hanau, Deutschland) und der Überstand durch einen Papierfilter gegossen. Das Filtrat wurde erneut durch ein 0,45 µm Membranfilter (Steriler Spritzen-Vorsatzfilter, Firma VWR International, Darmstadt, Deutschland) in ein steriles Greiner-Röhrchen (CELLSTAR® PP test tubes, Firma Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Durchflusszytometrische Analysen

Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten an dem Gerät BD FACS Calibur der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland).

Die Technik der Durchflusszytometrie ermöglicht die Untersuchung verschiedener Eigenschaften von Zellen oder anderen Teilchen. Bei der Messung werden die Zellen einzeln hintereinander durch eine Flusszelle bzw. Messkammer geschleust und von einem Laserlicht angestrahlt. Durch das Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle entsteht ein durch die Zelleigenschaften verursachtes Streulicht. Die Messung des Streulichtes erfolgt an zwei Stellen: als Vorwärtstreulicht in Richtung des ursprünglichen Strahls (Forward Light Scatter, FSC) und als Seitwärtstreulicht im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl (Sideward Light Scatter, SSC). Das Vorwärtstreulichtsignal hängt vor allem von der Größe einer Zelle ab, das Seitwärtstreulichtsignal hängt neben der Größe auch von der Granularität ab. Diese zwei Parameter ermöglichen die Zelldifferenzierung aufgrund morphologischer Gegebenheiten. Zusätzlich können Antigen-Antikörper-Reaktionen mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper nachgewiesen werden. Dafür müssen die gewünschten Zellmerkmale mit Antikörpern markiert werden. Bei der Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rücksprung kommt es zur Emission von Photonen, der Fluoreszenz, die vom Computer nach Intensität und Farbe getrennt registriert wird. Da der Argonlaser Licht bei einer Wellenlänge von 488 nm abgibt, kann mit Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet werden, deren Absorptionsmaxima in diesem Bereich liegen (z.B. Phycoerythrin, Fluorescein, Propidiumiodid). Die Farbstoffe lassen sich bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen (Absorption), verfügen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren. Diese Eigenschaft ermöglicht die gleichzeitige Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und somit die gleichzeitige Detektion verschiedener Antigene einer Zelle.

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte in dem vorliegenden Versuchsvorhaben mit dem Computerprogramm CellQuest Pro® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA), wobei als Darstellungen das Streudiagramm (Density Plot) und das Histogramm gewählt wurden (Abb. 1). Mithilfe des Streudiagramms können einzelne Zellpopulationen anhand verschiedener Merkmale wie Morphologie aber auch Bindung von Antikörpern oder anderen markierten Zellen differenziert und weiter untersucht werden. Das Histogramm gibt Aufschluss über die Fluoreszenzintensität der einzeln gezählten Zellen.

Das Verfahren der Durchflusszytometrie wurde in dieser Studie für die *in vitro*-Versuche zum Adhäsionsverhalten von *E. coli* an IPEC-J2, für die Phänotypisierung der Immunzellen aus dem peripheren Blut und aus dem Darm, für die Messung der Proliferation der Immunzellen und der Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten aus dem peripherem Blut eingesetzt.

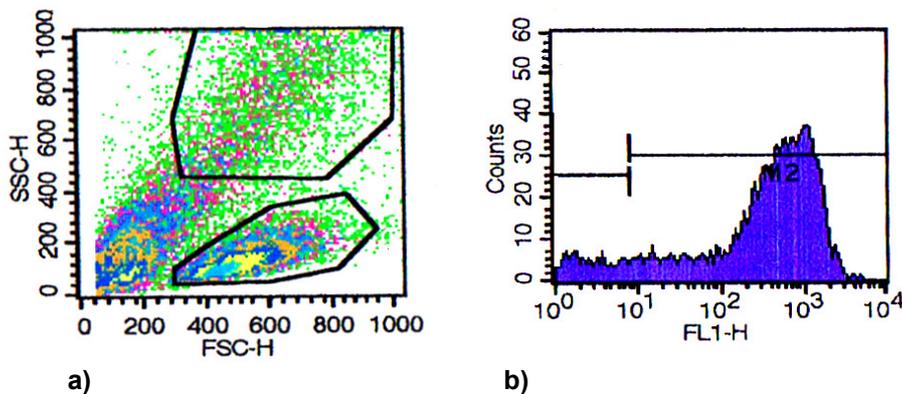


Abbildung 1: Darstellungsformen der für diese Arbeit benutzten FACS-(Fluorescence Activated Cell Sorting) Auswertung

- a) Dargestellt ist die Größe der Zellen (Forward Scatter [FSC-H]) gegenüber der Zellgranularität (Sideward Scatter [SSC-H]) in einem Streudiagramm (Density Plot)
- b) Dargestellt ist die Anzahl der Zellen (y-Achse) mit bestimmter Fluoreszenzintensität (x-Achse) in einem Histogramm

3.1.1. Einfluss von Pflanzenextrakten auf die zelluläre Interaktion zwischen einem enteropathogenen *E. coli*-Stamm und einer IPEC-J2 Zelllinie

In einem *in vitro*-Infektionsmodell wurde der Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Adhäsion eines enteropathogenen *E. coli*-Stamms an eine permanente porcine Darmzelllinie (IPEC-J2) untersucht (Abb. 2).

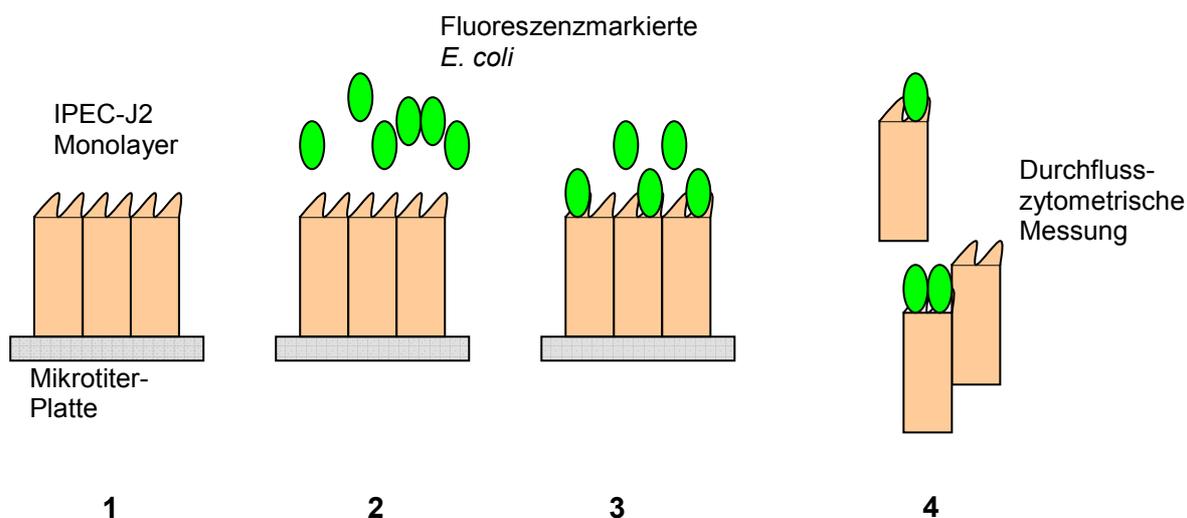


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *in vitro*-Modells zum Adhäsionsverhalten von *E. coli* an IPEC-J2

Dargestellt sind die prinzipiellen Arbeitsschritte:

- 1 Zellmonolayer auf einer Mikrotiterplatte mit bzw. ohne Zusatz von Pflanzenextrakten
- 2 Zugabe fluoreszenzmarkierter *E. coli*
- 3 Inkubation
- 4 Messung des Anteils an die Epithelzellen gebundener *E. coli*

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden nach dem Auftauen in Zellkulturflaschen (CELLSTAR[®] Tissue Culture Flasks, Firma Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) in ein Zellkulturmedium (MegaCell[™] Dulbecco's, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verbracht und bei 37°C in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre für 7 Tage inkubiert. Nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Nährmedium aus den Zellkulturflaschen mit einer sterilen Pipette (Serologische Pipette CELLSTAR[®], Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) abgezogen und der Zellrasen anschließend mit 10 bis 15 ml PBS gespült. Nach Entfernung des PBS erfolgte der Zusatz von 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung, welche durch Schwenken gleichmäßig über den Zellrasen verteilt wurde. Anschließend wurde die Trypsin-EDTA-Lösung wieder abpipettiert und in die nächste Flasche zur Wiederholung des Vorgangs überführt. Die Zellkulturflaschen wurden dann wieder in den Inkubator gestellt und nach fünf bis zehn Minuten die Ablösung der Zellen vom Boden der Flaschen durch leichtes Klopfen und Schütteln überprüft.

Die gelösten Zellen wurden in 5 bis 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 289g , 4°C , für 10 Minuten zentrifugiert.

Für die Zellzählung wurde das Zellsediment in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden $10\ \mu\text{l}$ entnommen und mit $90\ \mu\text{l}$ Trypanblau verdünnt. Zehn μl dieser Verdünnungslösung wurden für die Zellzählung in der modifizierten Neubauer-Zählkammer benutzt. Die Zellzählung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung.

Gezählt wurden 4x16 Einzelquadrate, aus dieser Summe wurde der Mittelwert gebildet (Σ [Zellen]/4).

Zur Berechnung der Zelldichte diente folgende Formel:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Mittelwert der gezählten Zellen} \times 10^4 \times 10 \times 10}{10\text{ml}}$$

10^4 = Kammerfaktor der modifizierten Neubauer-Zählkammer

10 = Ausgangsvolumen der Zellsuspension (10ml)

10 = Verdünnungsstufe in Trypanblaulösung (1:10)

Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Berechnung der benötigten Menge an Zellsuspension für die Versuche bei einer Zelldichte von 1×10^5 /ml. Anschließend wurden die Zellkulturplatten (CELLSTAR® 12 Well Cell Culture Plate sterile, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) mit je 1 ml pro Kavität gefüllt und für 48 Stunden inkubiert. Die restliche Zellsuspension wurde zur Passage der Zellen bei einer Zelldichte von $3-5 \times 10^6$ /Zellkulturflasche weiter verwendet. Dazu wurde das berechnete Volumen an Zellsuspension gleichmäßig auf die berechnete Anzahl der Passageflaschen verteilt und je Flasche 15-30 ml Zellkulturmedium hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre.

Die Anzucht des enteropathogenen *E. coli*-Stamms erfolgte auf LB-Agar bei 37°C für 24 Stunden. Anschließend erfolgte unter sterilen Bedingungen die Überführung von je einer Einzelkolonie in 3 ml LB-Medium und eine weitere Inkubation bei 37°C unter kontinuierlicher Rotation mit 80 Umdrehungen pro Minute für 12 Stunden. Nach der Inkubationszeit erfolgte eine Reinigung der Bakterien vom Medium durch dreimaliges Waschen mit PBS. Dafür wurde die Bakteriensuspension mit 16000g bei 4°C für 2 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 1 ml PBS resuspendiert. Zum Zählen der Zellen wurden 10 μl aus der Zellsuspension entnommen und in 990 μl PBS verdünnt. Zehn μl dieser Verdünnungssuspension wurden tropfenweise in die Thomakammer überführt. Die Zellzählung erfolgte im Mikroskop (Axiostar plus, Firma Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei 400-facher Vergrößerung. In jeweils fünf Quadraten wurden 16 Kammern gezählt. Aus der Summe der gezählten Zellen wurde der Mittelwert berechnet (Σ [Bakterien]/5).

Zur Berechnung der Zelldichte diente folgende Formel:

$$\text{Bakteriendichte} = \frac{\text{Mittelwert der gezählten Bakterien} \times 1000}{\text{ml} \quad 0,0005}$$

0,0005 = Kammerfaktor der Thoma-Zählkammer

1000 = Verdünnungsstufe der Bakteriensuspension (1:1000)

Die Bakteriendichte der Suspension wurde danach durch Zugabe von PBS auf eine Konzentration von 1×10^9 Zellen/ml eingestellt. Anschließend erfolgte die Färbung der Bakterien mit dem intrazellulären Fluoreszenzfarbstoff CFDA-Se (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester, Firma Fluka, Steinheim, Deutschland). Da dieser lichtempfindlich ist, erfolgte die Färbung unter lichtarmen Verhältnissen. Dem Farbstoff,

welcher zu je 10 µl Portionen in einer Konzentration von 100 mM gelagert war, wurden 190 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, HYBRI-MAX®, Firma Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt und die Lösung resuspendiert.

Zu je 200 µl der Bakteriensuspension wurden 2 µl Farbstoff zugefügt und resuspendiert. Das Resuspendieren erfolgte hier mittels Pipette, da ein Verklumpen des Farbstoffes mit den Bakterien vermieden werden sollte. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Bakterien bei 37°C für 2 Stunden. Für die im Durchflusszytometer durchgeführte Kontrolle des Färbeerfolges wurden jenseits 300 µl der Bakteriensuspension als Negativkontrolle nicht mitgefärbt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Bakterien für eine weitere Zellzählung aufbereitet. Dafür erfolgte eine dreimalige Waschung in 1 ml PBS. Nach Zugabe von PBS wurde bei 16000g und 4°C für 2 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellsediment in 1 ml PBS wieder resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension in 990 µl PBS überführt und gemischt. Zehn µl dieser Verdünnungslösung dienten als Grundlage für die Zellzählung in der Thoma-Kammer. Die Zellzählung erfolgte mikroskopisch (Axiostar plus, Firma Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei 400-facher Vergrößerung. In jeweils fünf Quadraten wurden 16 Kammern gezählt. Aus der Summe der gezählten Zellen wurde der Mittelwert berechnet (Σ [Bakterien]/5).

Zur Berechnung der Zelldichte diente folgende Formel:

$$\text{Bakteriendichte} = \frac{\text{Mittelwert der gezählten Bakterien} \times 1000}{\text{ml} \times 0,0005}$$

0,0005 = Kammerfaktor der Thoma- Zählkammer

1000 = Verdünnungsstufe der Bakteriensuspension (1:1000)

Die Bakteriendichte der Suspension wurde anschließend auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml mit PBS eingestellt, wobei die benötigte Menge an Puffer für den Bedarf der zu pipettierenden Kavitäten der Zellkulturplatten beachtet wurde. Die Berechnung erfolgte wie folgt:

1. Berechnung des Volumens von 1×10^6 Zellen/ml in der gezählten Ausgangssuspension in µl/ml
2. Multiplikation der berechneten Menge mit der Bedarfsmenge an PBS (µl)
3. Entnahme des berechneten Volumens aus der Ausgangssuspension (µl) und
4. Vermischen des benötigten Volumens der Bakteriensuspension mit der Bedarfsmenge an PBS

Nach der zweitägigen Inkubation der Epithelzellen im Zellkulturmedium in den Zellkulturplatten zur Ausbildung eines Monolayers wurden je 1 ml der 1%igen Pflanzenlösungen im Doppelansatz sowohl für die Negativ- als auch für die Positivkontrollen hinzupipettiert. Die Pflanzenlösungen wurden zuvor unter sterilen Bedingungen durch einen 0,2 µm Membranfilter filtriert. Zu den Negativproben wurde zusätzlich 1 ml PBS (Abb. 3), zu den Positivproben 1 ml der Bakteriensuspension pipettiert (Abb. 4), was einem Gesamtvolumen von 3 ml je Kavität entsprach. Die Konzentration der Testsubstanzen lag damit bei 0,33%. Als Negativkontrolle diente PBS (Monolayer mit Zellmedium und PBS), als

Positivkontrolle *E. coli* (Monolayer mit Zellmedium und Bakteriensuspension). Die Proben wurden für 90 Minuten bei 37°C inkubiert.

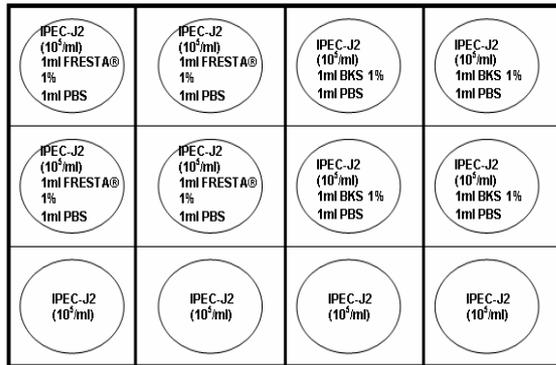


Abbildung 3: Pipettierschema der Negativkontrollen für die Inkubation der Epithelzellen IPEC-J2 mit pflanzlichen Substanzen
(BKS=Bockshornkleesamen, PBS=Pufferlösung)

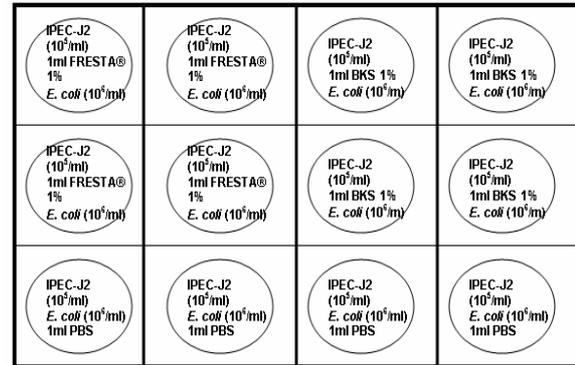


Abbildung 4: Pipettierschema der Positivkontrollen für die Inkubation der Epithelzellen IPEC-J2 mit pflanzlichen Substanzen und *E. coli*
(BKS=Bockshornkleesamen, PBS=Pufferlösung)

Anschließend erfolgte vorsichtig das Lösen des Zellrasens mittels Zellschaber (Firma TPP, Trasadingen, Schweiz) unter Sichtkontrolle und die Überführung des Inhaltes der Kavitäten in FACS-Röhrchen. Nach Zentrifugation bei 289g und 4°C für 10 Minuten wurden der Überstand dekantiert und das Zellsediment mit 200 µl PBS resuspendiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer BD FACS Calibur (Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

Auswertung der Messergebnisse zur Beurteilung der Adhäsion von *E. coli* an IPEC-J2

Bei der durchflusszytometrischen Auswertung mittels der Software CellQuest[®] Pro (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA) wurde der relative Anteil der Epithelzellen bestimmt, die mit fluoreszierenden Bakterien assoziiert waren.

Dafür wurden zuerst die morphologischen Parameter Größe (dargestellt im Forward Scatter, FSC-H) und Granularität (dargestellt im Sideward Scatter, SSC-H) gegeneinander aufgetragen, um anhand der sich ergebenden Punktwolken die Epithelzellen von Zellresten (Debris) zu differenzieren (Abb. 5a). Anschließend wurden die Epithelzellen in einer Region (R1) zusammengefasst und diese Region in einem weiteren Streudiagramm anhand der Parameter Zellgröße (Forward Scatter) und FITC- (Fluorescein/isothiocyanat)-Fluoreszenzstärke (FL1-H) dargestellt (Abb. 5b). Zusätzlich wurden die gezählten Fälle für die FITC-Fluoreszenzstärke in einem Histogramm ermittelt (Abb. 6). Das Histogramm diente als Grundlage zur Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität, das Streudiagramm zur Ermittlung des relativen Anteils der mit *E. coli* assoziierten Epithelzellen. Anhand des Histogramms wurde die Veränderung der Fluoreszenzstärke zwischen den Negativproben und den Positivproben bewertet. Die Fluoreszenzstärke wurde als Maß der adhärenierenden Bakterien an den Epithelzellen betrachtet. Für die Auswertung wurde die relative Fluoreszenzintensität berechnet, welche eine Aussage darüber trifft, um wie viel sich die

Fluoreszenz pro gezählte Zelle nach Zusatz der Bakterien und Testsubstanzen verändert hatte.

Die Berechnung der Fluoreszenzintensität (FI) erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Relative FI} = \frac{\text{FI}_{\text{Positivprobe}} - \text{FI}_{\text{Negativprobe}}}{\text{FI}_{\text{Negativprobe}}}$$

Negativprobe = IPEC-J2 + Nährmedium + pflanzliche Testsubstanz

Positivprobe = IPEC-J2 + Nährmedium + pflanzliche Testsubstanz + *E. coli*

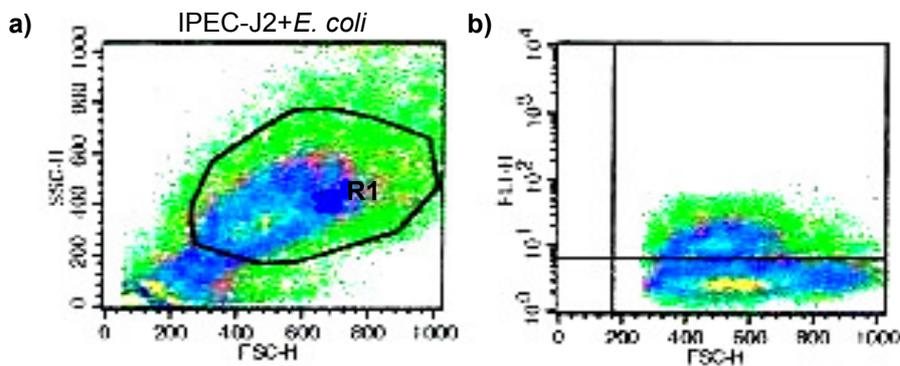


Abbildung 5: Darstellung der Epithelzellen IPEC-J2 in einem Streudiagramm zur Ermittlung des relativen Anteils mit *E. coli* gebundener Epithelzellen

- Morphologische Darstellung der Zellen anhand ihrer Größe (Forward Scatter [FSC-H]) und ihrer Granularität (Sideward Scatter [SSC-H]). Die markierte Punktvolke in R1 umfasst sowohl mit *E. coli* markierte als auch unmarkierte Epithelzellen
- Darstellung der in R1 markierten Zellen zur Differenzierung positiv und negativ gebundener Epithelzellen. Aufgrund des Fluoreszenzfarbstoffs setzen sich die mit *E. coli* gebundenen Zellen von den bakterienfreien (nicht fluoreszierenden) Zellen als Punktvolke auf der FITC-Fluoreszenzstärke (FL1-H)-Achse ab. Die Markierung auf der FITC-Fluoreszenzstärke (FL1-H)-Achse erfolgte erst in der Negativkontrolle, um die Eigenfluoreszenz der Epithelzellen zu berücksichtigen. Anschließend wurde diese Markierung in das Streudiagramm der Positivproben übertragen.

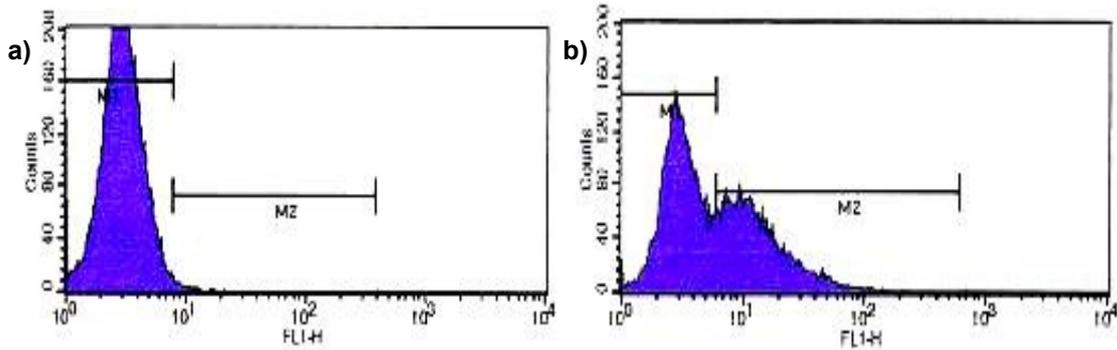


Abbildung 6: Darstellung der Fluoreszenzintensität ungebundener und mit *E. coli* gebundener Epithelzellen im Histogramm

- a) Darstellung der Gesamtfluoreszenzintensität der Zellsuspension vor Zugabe FITC-markierter *E. coli*. Die gemessene Fluoreszenzintensität (M1) wurde als Eigenfluoreszenz der Epithelzellen, des Nährmediums und der Testsubstanzen gewertet (Negativkontrolle).
- b) Darstellung der Gesamtfluoreszenzintensität nach Zugabe und Bindung FITC-markierter *E. coli* in der Zellsuspension. Die Ermittlung der Veränderung der Fluoreszenzintensität erfolgte durch Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität. Hierfür wurde die gemessene Intensität der Eigenfluoreszenz aus der Negativkontrolle (M1) von der Intensität der Gesamtfluoreszenz (M1+M2) nach *E. coli* Zugabe abgezogen, um die tatsächlich nur durch gebundene *E. coli* veränderte Fluoreszenzintensität (M2) zu ermitteln. Dieser Wert gibt im Verhältnis zur Negativkontrolle Auskunft darüber, um wie viel die Gesamtfluoreszenzintensität angestiegen ist.

Photometrische Analysen

Das Verfahren der Photometrie wurde in dieser Studie für die *in vitro*-Untersuchungen zur Bindungskapazität und zur Ermittlung konzentrationsabhängiger Einflüsse sowie zur Ermittlung der Haptoglobinkonzentration und der Immunglobulinkonzentration M, G und A im Serum eingesetzt.

3.1.2. Bindungskapazität pflanzlicher Substanzen gegenüber einem enteropathogenen *E. coli*-Stamm

Bei dieser Methode erfolgten Untersuchungen zur Bindungskapazität von FRESTA® F, Bockshornkleesamenpulver sowie Süßholzwurzelpulver gegenüber dem verwendeten *E. coli*-Stamm.

Die methodische Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Becker et al. (2007). Die Messung zum Maß der Bindungskapazität erfolgte durch Ermittlung der Wachstumskurve des Bakterienstamms unter Einfluss der Pflanzenextrakte (Abb. 7).

Messung der Extinktion im Photometer

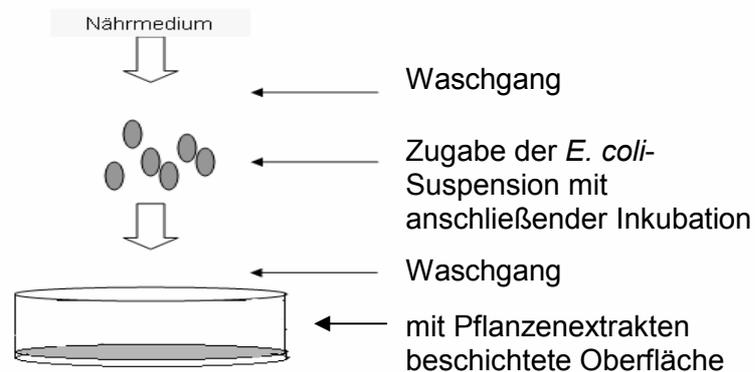


Abbildung 7: Übersicht der Methode zur Ermittlung der Bindungskapazität pflanzlicher Substanzen gegenüber einem *E. coli*-Stamm

Zu diesem Zweck wurde die Oberfläche einer Mikrotiterplatte (ELISA plate MICROLON, Firma Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland), welche aufgrund ihrer Oberflächenstruktur durch eine hohe Bindungseigenschaft charakterisiert ist, mit wässrigen Pflanzenextrakten beschichtet. Anschließend erfolgte die Bindung der Bakterien an die mit dem Pflanzenmaterial beschichtete Oberfläche der Mikrotiterplatte. Zur Beurteilung des Ausmaßes der Bindungsreaktion wurden die bakteriellen Wachstumskurven bei einer Wellenlänge von 620 nm photometrisch ermittelt und daraus das Wachstumsverhalten sowie die Bakteriendichte beurteilt.

Nach Herstellung einer 1%igen Lösung der zu untersuchenden pflanzlichen Testsubstanzen wurden die Überstände dieser Lösungen mit einem 0,2 µm Sterilfilter nochmals filtriert und 350 µl der verschiedenen Pflanzenextrakte für die Beschichtung in einem Achtfach-Ansatz in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert (Abb. 8). Für die Bindungsreaktion des gelösten Pflanzenmaterials wurden die Platten für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen mit je 350 µl PBS gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen.

Um die Bindungsreaktion der Pflanzenlösungen an die Oberfläche der Mikrotiterplatte zu stoppen, wurden in jede Kavität 350µl einer Stopplösung (1% BSA + 0,5% Natriumazid) pipettiert und die Platte für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte eine zweimalige Waschung mit je 300 µl PBS je Kavität.

| | | | | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | P1 | P1 | LB | + | P1 |
| B | P2 | P2 | LB | + | P2 |
| C | P3 | P3 | LB | + | P3 |
| D | P4 | P4 | LB | + | P4 |
| E | P5 | P5 | LB | + | P5 |
| F | NK | NK | LB | + | NK |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Abbildung 8: Pipettierschema für die Inkubation zur Ermittlung der Bindungskapazität pflanzlicher Substanzen gegenüber dem *E. coli*-Stamm

Legende:

| | |
|--------------------|---|
| P1-P5 (weiß) | = Wässrige Pflanzenextrakt-Lösungen (1%ig) |
| NK | = Bovines Serum Albumin (1%ig), Negativkontrolle |
| LB | = LB-Medium (Leerwert) |
| + | = <i>E. coli</i> (10^7 /ml) in LB- Medium, Positivkontrolle |
| P1-P5 (hellgrau) | = wässrige Pflanzenextrakt-Lösungen + LB-Medium |
| P1-P5 (dunkelgrau) | = wässrige Pflanzenextrakt-Lösungen + <i>E. coli</i> Suspension |
| G1-12 und H1-12 | = nicht verwendete Kavitäten |

Die Anzucht und Weiterverarbeitung des enteropathogenen *E. coli*-Stamms erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in der unter 3.1.1. beschriebenen Methode. Die Bakteriendichte der Suspension wurde danach auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml durch Zugabe von LB-Medium eingestellt, was bei einer Wellenlänge von 620 nm einer optischen Dichte von 0,01 entsprach.

Von der Bakteriensuspension wurden 300 μ l pro Kavität pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) inkubiert. Die anschließende dreimalige Waschung mit je 300 μ l PBS diente dazu, Bakterien, die nicht an die Oberfläche gebunden hatten, zu entfernen. Schließlich wurden 300 μ l LB-Medium pro Kavität als Nährmedium für die Bakterien pipettiert und die Platte für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente LB-Medium, als Positivkontrolle die *E. coli*-Suspension.

Für die Ermittlung der optischen Dichte der beschichteten Pflanzenmaterialien wurden zwei Substratkontrollen verwendet. Die erste bestand aus dem an der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebundenen Pflanzenmaterialien, die zweite aus Pflanzenmaterial und LB-Medium.

Die Messung erfolgte photometrisch (Photometer TECAN sunrise, Firma TECAN, Crailsheim, Deutschland) mit der Software XFluor4 (Firma TECAN, Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 620nm und einem Temperaturintervall von 36-38°C. Die erste

Messung erfolgte sofort nach der Zugabe des Nährmediums, alle weiteren Messungen nach 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 und 24 Stunden.

Auswertung der Messergebnisse zur Ermittlung der Bindungskapazität gegenüber dem *E. coli*-Stamm

Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung der optischen Dichten (Extinktionswerte) des Pflanzenmaterials und des LB-Mediums, sodass letztlich die Bakteriendichte als Messwert einer Extinktionsänderung ausgewertet wurde (Gesamtextinktion abzüglich des LB-Mediums und der Extinktionswerte der Pflanzenmaterialien). Gemessen wurden die Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit während des Reaktionsablaufs (Bakterienwachstum). Die Extinktionswerte wurden grafisch gegen die Zeit aufgetragen, um eine Wachstumskurve zu ermitteln. Anhand der sich darstellenden Wachstumskurven erfolgte eine statistische Auswertung zur Ermittlung der Unterschiede auf Grundlage des Messzeitpunktes nach 8 Stunden Inkubation.

3.1.3. Konzentrationseinfluss pflanzlicher Substanzen auf das Wachstumsverhalten eines enteropathogenen *E. coli*-Stamms

Mit diesem Modell sollte der Einfluss verschiedener Konzentrationen von FRESTA® F, Bockshornkleesamenpulver sowie Süßholzwurzelpulver auf das Wachstumsverhalten des *E. coli*- Stamms Aufschluss über mögliche direkte antimikrobielle Aktivitäten der pflanzlichen Testmaterialien geben.

Nach Herstellung einer 1%igen Lösung der zu untersuchenden pflanzlichen Substanzen wurde der Überstand dieser Lösungen mit einem 0,2 µm Sterilfilter nochmals filtriert und eine geometrische Verdünnungsreihe mit PBS hergestellt. In einem Dreifachansatz je Pflanzenlösung erfolgte die Pipettierung von je 100 µl je Kavität als Verdünnungsreihe (1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,06%, 0,03%) auf einer Mikrotiterplatte (Mikrotiterplatte 96, Firma VWR, Darmstadt, Deutschland) (Abb. 9).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | P1 | LB | + | | | | | | | | | |
| C | P1 | LB | + | | | | | | | | | |
| D | P1 | LB | + | | | | | | | | | |
| E | P2 | LB | + | | | | | | | | | |
| F | P2 | LB | + | | | | | | | | | |
| G | P2 | LB | + | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Abbildung 9: Pipettierschema zur Ermittlung des Konzentrationseinflusses pflanzlicher Substanzen auf das Wachstum von *E. coli* (die verschiedenen Graustufen entsprechen folgenden Konzentrationen der Pflanzenlösungen: B5-G5 [1%], B6-G6 [0,5%], B7-G7 [0,25%], B8-G8 [0,125%], B9-G9 [0,06%], B10-G10 [0,03%])

Legende: P1/P2 = wässrige Pflanzenextrakt-Lösungen (1%ig), Leerwert
 LB = LB-Medium (Negativkontrolle)
 + = *E. coli*-Suspension (Positivkontrolle)
 A1-12, H1-12, A4-H4, A11-H11, A12-H12 = nicht verwendete Kavitäten

Die Anzucht und Weiterverarbeitung des enteropathogenen *E. coli*-Stamms erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie in der unter 3.1.1. beschriebenen Methode. Die Bakteriendichte der unverdünnten Suspension wurde danach auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml durch Zugabe von LB-Medium eingestellt, was bei einer Wellenlänge von 620 nm einer optischen Dichte von 0,01 entsprach.

Jeweils 100 µl der Bakteriensuspension wurden zu der Verdünnungsreihe der einzelnen pflanzlichen Testsubstanzen pipettiert und die Platte für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrollen dienten 100 µl LB-Medium in 100 µl PBS, als Positivkontrolle 100µl Bakteriensuspension in 100 µl LB-Medium. Für die Ermittlung der optischen Dichte der verdünnten pflanzlichen Testsubstanzen wurden Substratkontrollen angesetzt, die der Verdünnungsreihe mit Zusatz von 100 µl LB-Medium entsprachen.

Die Messung erfolgte photometrisch (Photometer TECAN sunrise, Firma TECAN, Crailsheim, Deutschland) mit der Software XFluor4 (Firma TECAN, Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 620nm und einem Temperaturintervall von 36-38°C. Die erste Messung erfolgte sofort nach Zugabe des Nährmediums, die weiteren Messungen nach 0,5, 1, 2, 4, 10 und 24 Stunden.

Auswertung der Messergebnisse zu Einflüssen der Konzentration pflanzlicher Substanzen auf das Wachstumsverhalten des *E. coli*-Stamms

Die Auswertung der Konzentrationseinflüsse auf das Wachstumsverhalten des eingesetzten *E. coli*- Stamms erfolgte unter Berücksichtigung der optischen Dichten (Extinktionswerte) des Pflanzenmaterials und des LB-Mediums, sodass die Extinktionsdifferenz der Bakteriendichte entsprach (Gesamtextinktion abzüglich der Extinktionswerte des LB-Mediums und der Pflanzenextrakte, die zum Zeitpunkt Null ermittelt wurden). Gemessen wurden die Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit während des Reaktionsablaufes (Bakterienwachstum). Die Extinktionswerte der einzelnen Konzentrationsstufen wurden grafisch gegen die Zeit aufgetragen, um eine Wachstumskurve zu ermitteln. Anhand der sich darstellenden Wachstumskurven erfolgte eine statistische Auswertung zur Ermittlung der Unterschiede auf Grundlage des Messzeitpunktes nach zehn Stunden Inkubation.

3.2. Fütterungsversuch

3.2.1. Tierexperimentelle Methoden

Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 48 männliche kastrierte Ferkel (Hybridzucht: Duroc x DL x Pietran; farm concepts élevage GmbH & Co. KG, Wahlstedt, Deutschland) im Alter von 21 Tagen eingesetzt. Alle Tiere waren vor der Einstellung serologisch mittels ELISA auf *Salmonellen*-Antikörpertiter untersucht worden (SALMOTYPE® Pig Screen, Fa. Labordiagnostik Leipzig GmbH, Leipzig).

Versuchsaufbau

Zur Untersuchung der Wirkung der pflanzlichen Testsubstanzen wurde im Rahmen der Studie ein Fütterungsversuch mit Absetzferkeln über vier Wochen durchgeführt (Registrierungsnummer Reg 0267/08 LaGeSo Berlin, institutsinterne Versuchsnummer FA1/09). Die Durchführung erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Versuchsreihen. In jeder Versuchsreihe wurden jeweils 16 Ferkel gleichmäßig auf vier Gruppen verteilt (Kontrollgruppe A, Versuchsgruppen B, C und D). Im Verlauf der Fütterungsperiode wurden eine Blutentnahme am vierten Tag nach Einstellung und eine orale Impfung gegen *Salmonella* Typhimurium am fünften Tag nach Einstellung durchgeführt. Die zweite orale Impfung erfolgte 14 Tage später. Zur Verdaulichkeitsprüfung erfolgte sieben Tage vor Versuchende der Zusatz von Chromoxid im Futter (Abb. 10). Unter Berücksichtigung der statistischen Aussagekraft hinsichtlich der zu untersuchenden Parameter wurden für die Erhebung der Leistungsparameter 48 Tiere in den Versuch eingeschlossen, 42 Tiere wurden euthanasiert, von denen 41 Tiere in die Auswertung der Ergebnisse eingeschlossen wurden. Bei einem Ferkel wurden im Vergleich zu allen übrigen Ferkeln bei der mikroskopischen Zellzählung neben den Darmleukozyten bewegliche Einzeller beobachtet. Diese Tier wurde daher aus dem Versuch ausgeschlossen. Die verbliebenen sechs Ferkel wurden nach Versuchsende in die Mast verkauft.

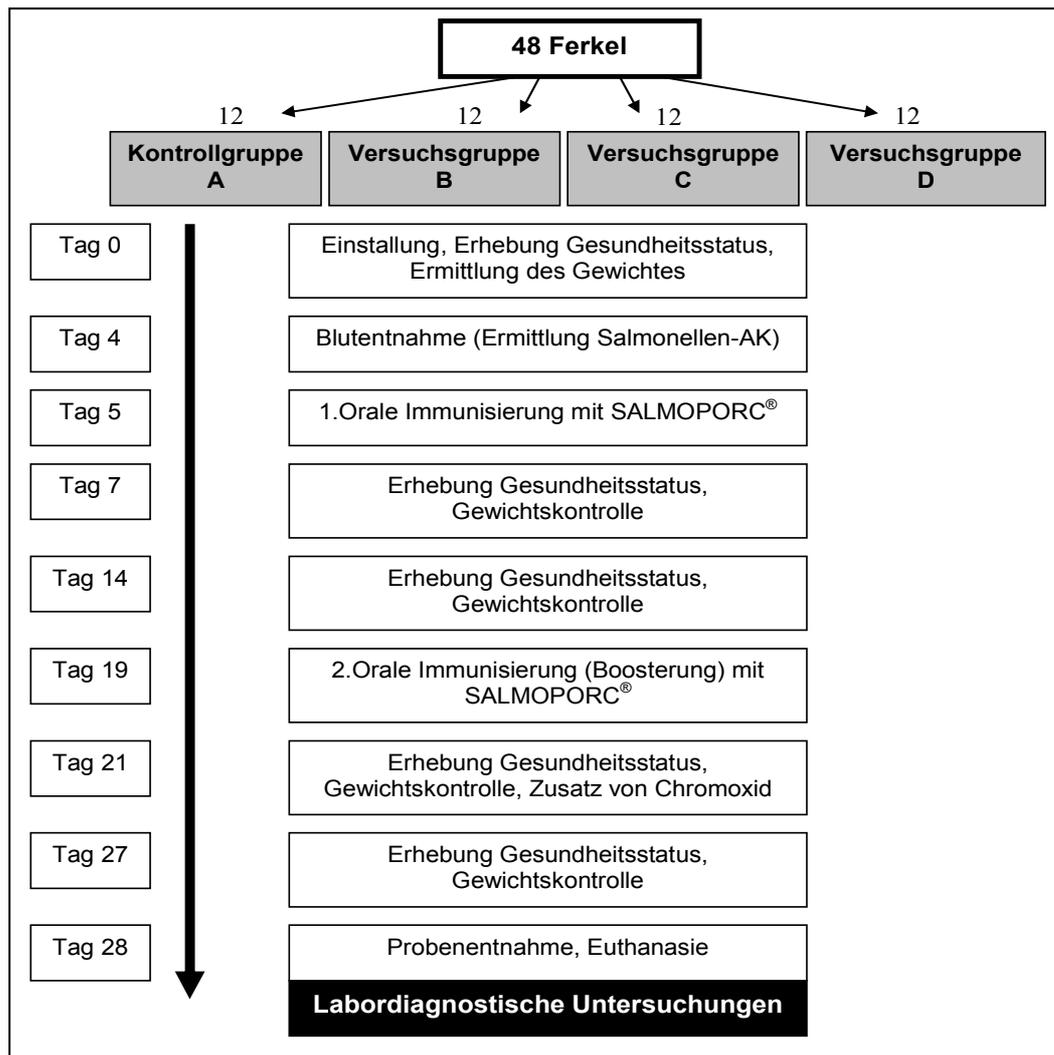


Abbildung 10: Aufbau und zeitlicher Ablauf des Fütterungsversuchs

Haltung der Tiere

Die Haltung der Tiere erfolgte in einem vollklimatisierten Versuchstierstall in Flatdecks. Die Tiere wurden jeweils in Zweiergruppen gehalten. Die Wasseraufnahme war über eine Nippeltränke jederzeit gewährleistet, Futter stand über einen Futterautomaten zur Verfügung. Zwischen den Versuchsgruppen befand sich jeweils ein leer stehendes Flatdeck. Kontaktaufnahme zu Artgenossen war innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen möglich, da jeweils zwei Zweiergruppen einer Versuchsgruppe nebeneinander gehalten wurden. Durch ein Lichtprogramm war eine zwölfstündige Lichtphase gewährleistet. Drei Tage vor Versuchsende betrug die Lichtphase 14 Stunden. Die Temperatur war für die ersten zwei Wochen auf 27°C eingestellt, für die letzten zwei Wochen auf 25°C. Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden täglich mindestens zweimal kontrolliert und in einem Stallbuch protokolliert. Temperaturkontrollen erfolgten im Eingangsbereich des Stalles und im hinteren Bereich. Die Luftfeuchtigkeit wurde nur im hinteren Bereich des Stalles gemessen. Die Luftfeuchte betrug durchschnittlich 41,2% ±5,68. Es wurden Plastikbälle zum Spielen angeboten.

Versuchsfutter und Fütterung

Die Tiere erhielten ein Ferkelaufzuchtfutter, basierend auf Getreide und Sojaextraktionsschrot (Tab. 2). Die Berechnung der Futterzusammensetzung und die Mischung des Futters erfolgten am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin.

Die Nährstoffzusammensetzung des Futters entsprach den empfohlenen Richtlinien für Ferkelfutter (Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung bei Schweinen, GfE 2006, ISBN 978-3-7690-0683-4). Die pflanzlichen Produkte wurden zu der absoluten Futtermischung dazugegeben. Der Versuchsgruppe B wurden 0,04% des pflanzlichen Futterzusatzstoffes FRESTA® F unter das Futter gemischt (Dosierung lt. Hersteller). Versuchsgruppe C erhielt 0,2% FRESTA® F zugesetzt und die Versuchsgruppe D erhielt 0,15% Bockshornkleesamen pulverisiert dem Futter zugesetzt (Abb. 11, Dosierungen in Anlehnung an die Literatur). Allen 4 Mischungen wurden außerdem sieben Tage vor Versuchende 0,2% Chromoxid (Chromium(III)oxide [50µm, ≥ 98 %]) zugesetzt, welches als Marker für die Verdaulichkeitsanalyse genutzt wurde. Die Futtermischungen wurden den Ferkeln in trockener und geschroteter Form angeboten.

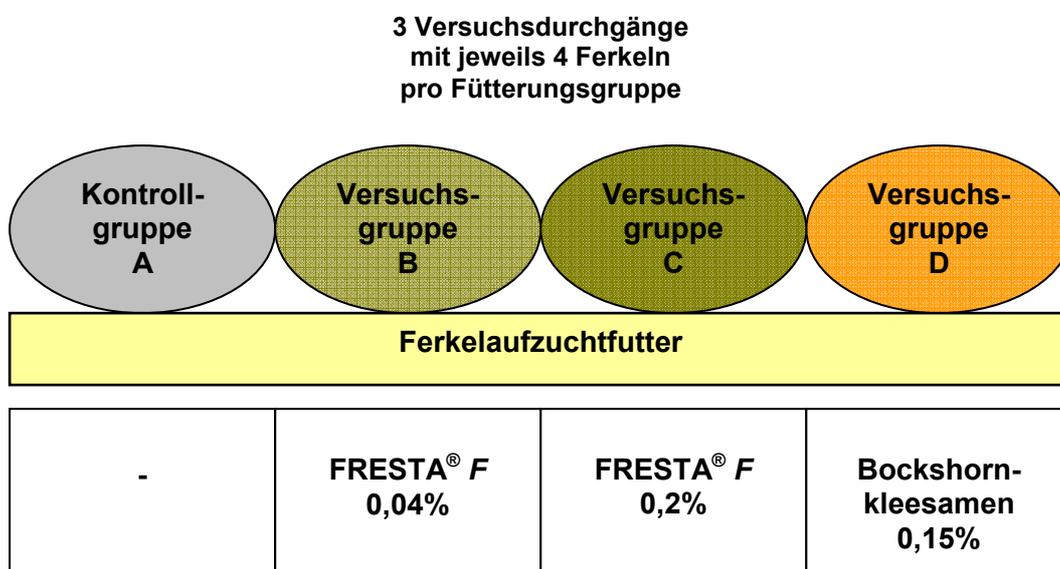


Abbildung 11: Übersicht über die Versuchsgruppeneinteilung

Tabelle 2: Zusammensetzung (%) der verschiedenen Fütterungsdiäten

| Futtermittel | Fütterungsgruppen | | | |
|--------------------------------|-------------------|------|------|------|
| | A | B | C | D |
| | % | | | |
| Weizenschrot | 36,0 | 36,0 | 36,0 | 36,0 |
| Gerstenschrot | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 |
| Sojaextraktionsschrot | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 |
| Maisschrot | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| Kohlensaurer Futterkalk | 1,40 | 1,40 | 1,40 | 1,40 |

| Futtermittel | Fütterungsgruppen | | | |
|----------------------------|-------------------|------|------|------|
| | A | B | C | D |
| | % | | | |
| Monokalziumphosphat | 1,19 | 1,19 | 1,19 | 1,19 |
| Mineralfutter-FM* | 1,18 | 1,18 | 1,18 | 1,18 |
| L-Lysin | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| DL-Methionin | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 |
| Viehsalz | 0,29 | 0,29 | 0,29 | 0,29 |
| Sojaöl | 1,50 | 1,50 | 1,50 | 1,50 |
| Chrom-III-oxid | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| FRESTA® F | - | 0,04 | 0,20 | - |
| Bockshornkleesamen | - | - | - | 0,15 |

*Zusammensetzung: 35,5% Weizengrießkleie, 33,8% Natriumchlorid, 10,5% Magnesiumoxid; Gehalt an Inhaltsstoffen: 13,0% Natrium, 5,5% Magnesium; Gehalt an Zusatzstoffen je kg: 600.000 IE Vitamin A, 120.000 IE Vitamin D3, 8.000mg Vitamin E (α -Tocopherol), 300mg Vitamin K₃, 250mg Vitamin B₂, 400mg Vitamin B₆, 2.000 μ g Vitamin B₁₂, 2.500mg Nikotinsäure, 100mg Folsäure, 25.000 μ g Biotin, 1.000mg Pantothen säure, 80.000mg Cholinchlorid, 5.000mg Eisen (Eisen-II-Carbonat), 1.000mg Kupfer (Kupfer-II-sulfat, Pentahydrat), 5.000mg Zink (Zinkoxid), 6.000mg Mangan (Manganoxid), 30mg Kobalt (Kobalt-II-sulfat, Heptahydrat), 45mg Jod (Calciumjodat, wasserfrei), 35mg Selen (Natrium-Selen)

3.2.2. Futtermitteluntersuchung

Die Analysen der Rohnährstoffe und der Mineralstoffgehalte der Futtermischungen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Rohnährstoff- und Mineralstoffgehalte in den eingesetzten Futtermischungen (Analyse der Basismischung)

| Inhaltsstoff | g/kg uS |
|------------------------------|---------|
| Trockensubstanz | 893 |
| Rohprotein | 170 |
| Rohasche | 51,5 |
| Rohfaser | 48,2 |
| N-freie Extraktstoffe | 595 |
| Rohfett | 27,5 |
| Stärke | 287 |

| Inhaltsstoff | g/kg uS |
|--|--------------|
| Kalzium | 9,67 |
| Phosphor | 6,86 |
| Kalium | 6,83 |
| Natrium | 3,06 |
| Lysin | 8,45 |
| Methionin | 4,35 |
| Threonin | 5,80 |
| Tryptophan | 2,80 |
| Umsetzbare Energie ME (MJ/kg uS)* | 12,75 |

*Berechnung laut GfE, 2008

3.2.2.1. Bestimmung der Rohnährstoffe (Weender Analyse)

Trockensubstanz (TS)

Jeweils 1-2 g der Futtermittelproben wurden eingewogen. Die Proben wurden anschließend für vier Stunden bei 103°C mit offenem Deckel getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Proben im Exsikkator ausgekühlt. Danach erfolgte die Rückwaage der Probe.

Rohasche (Ra)

Zur Bestimmung des Rohaschegehalts wurden jeweils 1 g gemahlenes Futter in einen vorgeglühten Tiegel (T1) eingewogen und über Nacht bei 600°C im Muffelofen verascht. Nach Abkühlen im Exsikkator wurde der Inhalt erneut gewogen (T2).

Rohprotein (Rp)

Die Rohproteinbestimmung erfolgte über die Messung des Stickstoffgehaltes der Proben mithilfe eines Makro-Elementaranalysators (Dumas Verfahren).

Rohfett (Rfe)

Die Bestimmung des Rohfettgehaltes erfolgte nach Extraktion in einem Soxhlet-Apparat. Als Lösungsmittel für die Extraktion wurde Petrolether verwendet. Nach einer Extraktionszeit von drei Stunden und vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Proben zurückgewogen und der Gehalt an Rohfett berechnet.

Rohfaser (Rfa)

Die Bestimmung des Rohfasergehaltes erfolgte mithilfe eines Rohfaser-Analysators. Die Proben wurden in 1,25%iger Schwefelsäure und danach in 1,25%iger Natronlauge gekocht. Nach der Entnahme der Glasfiltertiegel aus dem Analysator wurden sie 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 Glasfiltertiegel.

Stärke

Die Bestimmung von Stärke erfolgte mittels enzymatischen UV-Tests. Das Testprinzip basiert auf der enzymatischen Spaltung von Stärke zu D-Glukose. Durch weitere enzymatische Umwandlungen der D-Glukose entsteht NADPH, welches als Messgröße der durch Hydrolyse der Stärke gebildeten Menge an D-Glukose proportional ist. Die Messung von NADPH erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm.

3.2.2.2. Mineralstoffbestimmung

Probenvorbereitung

Die Futterproben wurden nach der Veraschung mit 6ml Salzsäure (37-38%ig) und 20 ml destilliertem Wasser versetzt. Anschließend wurden die Proben für 50 Minuten bei 250°C im Sandbad erhitzt. Nachdem die Proben durch einen Faltenfilter filtriert wurden, wurden diese mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium

Die Bestimmung der Gehalte an Mineralstoffen in der Aschelösung erfolgte mittels Atomabsorptionsspektrometrie.

Phosphor

Für die Bestimmung des Phosphorgehalts im Futter wurden 500 µl der vorbereiteten Aschelösung mit 5ml einer Lösung aus Salpetersäure (134 ml, w = 65%) und den P-Komplexbildnern Ammoniumvanadat (200 µl) und Ammoniummolybdat (200 µl) versetzt. Anschließend wurden die Proben mit destilliertem Wasser auf 20ml aufgefüllt. In dem salpetersauren Milieu reagierte der in der Probe enthaltene Phosphor zu einem gelben Farbkomplex, dessen Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen wurde. Anhand einer Eichkurve erfolgte die Bestimmung des Phosphorgehalts.

3.2.2.3. Chrom-III-oxid-Bestimmung

Für die Messung des Chromgehaltes in der Futtermischung wurden ca. 0,5 g Futter in einem Tiegel eingewogen und im Muffelofen verascht. Den veraschten Proben wurden 4ml einer 4,5%igen Kaliumbromatlösung und 3 ml einer 0,3%igen Mangansulfatlösung zugefügt und anschließend leicht geschwenkt. Die Proben wurden dann für 50 Minuten bei 200°C im Sandbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben durch einen Faltenfilter in einen 50 ml-Messkolben überführt, in den 6ml 1,47%ige Kalziumchloridlösung (4 g/l Kalzium) vorgelegt worden waren und anschließend mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. In den Proben wurde dann mittels Atomabsorptionsspektrometrie die Menge an enthaltenem Chrom ermittelt.

3.2.2.4. Überprüfung der Mischgenauigkeit

Für die Analyse der Mischgenauigkeit der verwendeten Pflanzenpräparate wurden die Futterproben zu der Firma DELACON (Steyregg, Österreich) versandt. Die quantitative Ermittlung der Zusatzstoffe erfolgte über eine Microtracer™ Analyse (Micro Tracers, Inc.; 1370 Van Dyke Avenue, San Francisco, CA, USA). Für FRESTA® F erfolgte eine F-Quinine Microtracer™ Analyse, für Bockshornkleesamen eine FS-Blue Microtracer™ Analyse, welche als Indikatoren der Futterzusatzstoffmischung beigemischt waren.

Grundlage der Analyse ist eine quantitative Ermittlung der zugesetzten Präparate über Microtracer™ F-Quinine und FS-Blue als Indikatoren. Beide enthalten Eisenpartikel, wobei F-Quinine zusätzlich mit Quinine-Hydrochlorid gecoatet ist und FS-Blue zusätzlich zu über 98% den Farbstoff FD&C Blue #1 enthält.

F-Quinine hat eine spezifische Partikelanzahl von 26.000/g Indikator (Batch FR-401a-018-0021-76), FS-Blue von 62.000/g Indikator (Batch FR-401c-117-0011-76).

Für die Analyse der Indikatoren werden die Partikel gezählt und die Zusatzstoffmenge rückgerechnet. Da die technische Herstellung der Futtermischungen einen Einfluss auf die kalkulierte Indikatormenge im Futterzusatzstoff hat, werden die kalkulierten Indikatormengen angepasst. Für geschrotete Futtermischungen liegt der relative Erwartungswert der ursprünglichen Indikatormenge bei 80%. Eine Übersicht der Analyse ist in den Tabellen 4 und 5 dargestellt, die Ergebnisse in Tabelle 6.

Tabelle 4: Details zur Analyse von FRESTA® F in der Futtermischung über Microtracer™ F Quinine

| F-Quinine | Indikator (g/t FM) | Untersuchte FM-Probe (g) | Kalkulierte Indikatormenge (Partikel/Probe) | Erwartete Indikatormenge (Partikel/Probe) |
|-----------|--------------------|--------------------------|---|---|
| Gruppe B | 5 | 200 | 26 | 21 |
| Gruppe C | 25 | 50 | 33 | 26 |

Tabelle 5: Details zur Analyse von Bockshornkleesamen in der Futtermischung über den Microtracer™ FS-Blue

| FS-Blue | Indikator (g/t FM) | Untersuchte FM-Probe (g) | Kalkulierte Indikatormenge (Partikel/Probe) | Erwartete Indikatormenge (Partikel/Probe) |
|----------|--------------------|--------------------------|---|---|
| Gruppe D | 3 | 200 | 37 | 30 |

Tabelle 6: Ergebnisse der Microtracer™-Analyse von F-Quinine und FS-Blue (Partikel/Probe FM) der Futtermittelzusatzstoffe

| Fütterungsgruppen | Erwartete Anzahl von F-Quinine | Ermittelte Anzahl von F-Quinine | Erwartete Anzahl von FS-Blue | Ermittelte Anzahl von FS-Blue |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Kontrollgruppe A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Gruppe B | 21 | 22 | 0 | 0 |
| Gruppe C | 26 | 32 | 0 | 0 |
| Gruppe D | 0 | 0 | 30 | 25 |

3.2.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere wurden vor dem Einstellen gewogen und in vier Gruppen aufgeteilt (Abb. 10). Die Gruppeneinteilung erfolgte unter Berücksichtigung der Lebendmasse.

Des Weiteren erfolgte unmittelbar nach dem Einstellen eine Beurteilung des Allgemeinzustandes durch Adspektion. Den Tieren wurde dreimal täglich Futter verabreicht (6.00, 12.00, 18.00 Uhr) und *ad libitum* Wasser zur Verfügung gestellt.

Die Ferkel erhielten in der ersten Woche eine tägliche Futterzuteilung von 400 g, in der zweiten Woche von 550 g und ab der dritten Woche eine tägliche Zuteilung von 900 g. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden zweimal täglich der Allgemeinzustand, die Futteraufnahme und die Kotbeschaffenheit durch Adspektion überprüft. Bei Tieren, die während der Untersuchung auffällig waren, erfolgte eine Temperaturkontrolle. Die Gewichtskontrollen und eine Gesundheitsbewertung wurden einmal wöchentlich durchgeführt.

3.2.3.1. Leistungsparameter

Beurteilung des Gesundheitszustandes

Die Beurteilung des Gesundheitszustandes erfolgte täglich zweimal. Einmal wöchentlich erfolgte eine Beurteilung anhand eines Gesundheitsbewertungsschemas (Protokollbogen siehe Anhang Abb. 29).

Körpermasseentwicklung und Körpermassezunahme

Jedes Tier wurde bei der Einstellung, einmal wöchentlich während des Fütterungszeitraums und am Tag vor der Tötung gewogen (Abb. 10).

Futteraufnahme

Die Ermittlung der Futteraufnahme (FA) pro Bucht erfolgte rechnerisch anhand der Differenz aus der Futtereinwaage und der Rückwaage des verbliebenen Futters (FR) im Trog sowie des Futtermittelsverlustes (FV) auf den Auffangblechen unter den Trögen einmal wöchentlich.

Futteraufwand

Der Futteraufwand errechnete sich anhand der mittleren Lebendmassezunahme und der mittleren Futteraufnahme.

3.2.3.2. Blutentnahme

Im Rahmen des Studiendesigns wurden zwei Blutentnahmen durchgeführt (Abb. 10). Die erste Entnahme erfolgte am vierten Tag nach der Einstellung durch Punktion der Vena cava cranialis, wobei die Tiere in Rückenlage fixiert wurden und der Halsbereich überstreckt war. Die zweite Blutentnahme erfolgte intrakardial am narkotisierten Tier am Tag der Tötung *ante mortem*. Die Blutentnahmen wurden mit geschlossenen sterilen Systemen (S-Monovette® EDTA, S-Monovette® Lithium-Heparin, Fima SARSTEDT, Nürmbrecht, Deutschland) durchgeführt.

3.2.3.3. Immunisierung

Die Immunisierung der Tiere erfolgte am fünften Tag nach der Einstellung. Die Tiere wurden mit 1ml SALMOPORC® (Firma IDT, Dessau-Torgau, Deutschland) oral geimpft (Abb. 10). Hierbei handelt es sich um einen attenuierten Lebendimpfstoff, welcher auf der Grundlage einer doppelt attenuierten *Salmonella* Typhimurium-Mutante vom Phagentyp DT (*Definite Type*) 9 entwickelt wurde. Vor der Impfung erfolgte eine Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere. Ebenfalls wurden die Körpertemperatur und die Kotbeschaffenheit überprüft.

3.2.3.4. Gewinnung von Probenmaterial

Die Organentnahmen wurden so organisiert, dass im ersten Versuchsdurchgang an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils vier Tiere euthanasiert wurden, im zweiten Durchgang an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils sechs und acht Tiere und im dritten Versuchsdurchgang jeweils acht Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen euthanasiert wurden. Die Zeitspanne vom Zugang zum Futter bis zur Euthanasie betrug ungefähr zwei Stunden. Damit sollte eine möglichst starke Füllung des Gastrointestinaltrakts als auch eine Vergleichbarkeit der Parameter zwischen den Gruppen und Tieren erreicht werden.

Die Narkose der Tiere erfolgte durch eine intramuskuläre Injektion in den M. glutaeus oder in die lange Sitzbeinmuskulatur von 2 mg/kg Azaperon-Injektionslösung (entspr. 0,1 ml/kg Stresnil®) und 20 mg/kg Ketaminhydrochlorid-Injektionslösung (entspr. 0,2 ml/kg Ursotamin®) als Kombination.

Nach Überprüfung des Zwischenklauenreflexes und Lidreflexes zur Bestätigung eines erwünschten Narkosestadiums drei erfolgte nach Entnahme der Blutproben die Euthanasie der Tiere mittels einer Applikation von 10ml eines Kombinationspräparates bestehend aus Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid und Embutramid (T61® Firma Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) intrakardial.

Post mortem erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle über die Linea alba und Entnahme des Darmkonvoluts. Das Jejunum wurde vollständig mäanderförmig auf dem Sektionstisch ausgebreitet und in drei Drittel aufgeteilt. Aus dem Magen, dem Duodenum, allen Dritteln des Jejunums, dem Ileum, Zäkum, dem Kolon und Rektum wurden Digestaproben in 50ml Greiner-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Aus dem proximalen Drittel des Jejunums erfolgte die Entnahme von circa 30cm Gewebe. Das Gewebestück wurde in PBS gespült und bis zur Weiterverarbeitung in PBS auf Eis gelagert.

Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Die heparinisierten Vollblutproben wurden im Verhältnis 1:2 in PBS verdünnt. Je 35 ml der verdünnten Blutproben wurden anschließend langsam auf 15 ml Ficoll gegeben. Um die Zellausbeute zu erhöhen, wurde das Ficoll vorher auf Raumtemperatur erwärmt. Die Proben wurden bei 500g über 30 Minuten zentrifugiert. Die in den Probenröhrchen entstandene Interphase wurde entnommen und zweimal mit 14 ml PBS gewaschen. Dazu wurde die Interphase mit 14 ml PBS vermischt und bei 400g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml PBS resuspendiert, anschließend wurden 7 ml Lysepuffer hinzugefügt und die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben auf 14 ml mit PBS aufgefüllt und bei 400g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit 14 ml PBS resuspendiert. Die Proben wurden nochmals bei 300g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellsediment mit 1ml Zellkulturmedium resuspendiert. Zehn µl dieser Zellsuspension wurden in 90 µl Trypanblau verdünnt und 10 µl dieser Lösung für die Zellzählung in der modifizierten Neubauer-Zählkammer genutzt. Die Zellzählung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung. Gezählt wurden die nicht gefärbten Zellen in 2x16 Einzelquadrate, aus dieser Summe wurde der Mittelwert gebildet (Σ [Zellen]/2). Zur Berechnung der Zelldichte diente folgende Formel:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Mittelwert der gezählten Zellen} \times 10^4 \times 1 \times 10}{\text{ml}}$$

10^4 = Kammerfaktor der modifizierten Neubauer-Zählkammer

1 = Ausgangsvolumen der Zellsuspension (1ml)

10 = Verdünnungsstufe in Trypanblau (1:10)

Die berechnete Zelldichte wurde anschließend mit Zellkulturmedium für die Weiterverarbeitung auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

1ml dieser Zellsuspension wurde mit 1,5 ml Zellkulturmedium auf eine Zelldichte von 4×10^6 Zellen/ml eingestellt und diente als Ausgangszellsuspension für die Proliferation der Lymphozyten.

Die restliche Zellsuspension wurde für die Phänotypisierung der isolierten Leukozyten verwendet.

Isolierung von intraepithelialen Lymphozyten (IEL) aus der *Lamina epithelialis* des proximalen Jejunums

Die Abbildung 12 zeigt eine schematische Darstellung der Lokalisation der intraepithelialen Lymphozyten im Darm.

Ein 30cm langes Stück der entnommenen Jejunumprobe wurde an einem Ende ligiert, mit PBS gefüllt und anschließend an der anderen Seite mit einer Ligatur versehen. Die Darmproben wurden in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben verbracht und in 100ml HBSS-DTT-Medium überführt und für fünf Minuten bei 28°C und 125 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Danach wurde der Inhalt des Erlenmeyerkolbens über ein 200µm Gaze in ein Becherglas filtriert. Das Medium wurde verworfen. Die Gewebestücke, welche sich nach dem Filtrationsvorgang an der Gaze befanden wurden in einen Erlenmeyerkolben in ca. 100ml HBSS-EDTA zurück überführt und nochmals für 75 Minuten bei 28°C und 125 Umdrehungen

pro Minute inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Filtrationsvorgang über eine 200µm Nylongaze. Die Zellsuspension wurde in einem sterilen Becherglas aufgefangen und danach in 50ml Greiner-Röhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde bei 600g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellsedimente in 20ml RPMI-Medium resuspendiert. Anschließend wurden je Probe 50µl DNase (1mg/ml) zugefügt und die Proben bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 600g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Zellsedimente wurden in 15-30ml 25%igem Percoll resuspendiert und bei 600g und 4°C erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Die entstandene Zellschicht wurde abgenommen und die Zellen in kaltem RPMI-Medium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 300g und 4°C für 10 Minuten wurde den Zellen Lysispuffer (22°C) hinzugefügt und die Proben für 5 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 300g und 4°C für 10 Minuten. Je nach Größe des Zellsediments wurden diese in 30-50ml RPMI-Medium aufgenommen.

Zur Zellzählung wurden 10µl dieser Zellsuspension in 90µl Trypanblau verdünnt und 10µl dieser Lösung für die Zellzählung in der modifizierten Neubauer-Zählkammer genutzt. Die Zellzählung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung. Die berechnete Zelldichte wurde anschließend mit Zellkulturmedium für die Weiterverarbeitung auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Für die Markierung der Zellen mit Antikörpern wurde eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/100µl Zellsuspension benutzt.

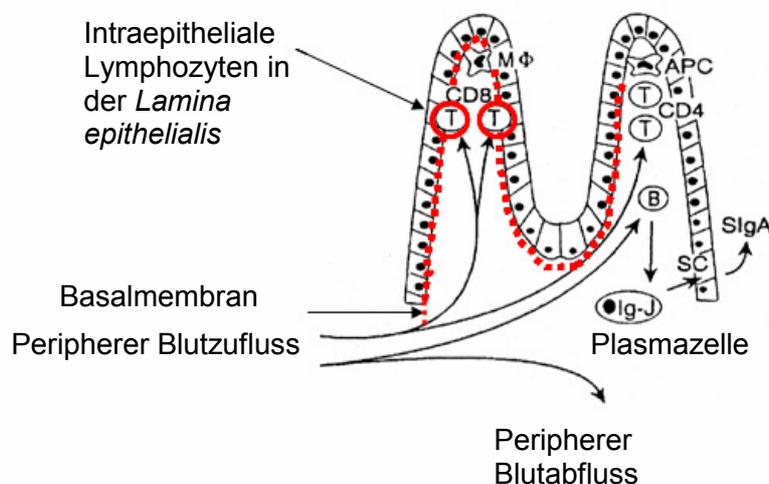


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Lokalisation zur Gewinnung von Lymphozyten aus dem Darm

3.2.4. Immunologische Methoden

3.2.4.1. Differentialblutbild und hämatologische Untersuchungen

Es wurden EDTA, Lithium-Heparin- und Serumproben genommen und sofort auf Eis gelagert. Die Lithium-Heparinproben wurden für die Phänotypisierung der Lymphozyten, die

Lymphozytenproliferation und zur Messung der Phagozytoseaktivität verwendet. Das EDTA-Blut wurde für hämatologische Untersuchungen sowie Differentialblutbild umgehend zur Firma LABOKLIN (Bad Kissingen) übersandt. Die Serumproben wurden bei 1800g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand in sterile 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

3.2.4.2. Markierung der Immunzellen und Ermittlung des Phänotyps im Durchflusszytometer

Je 100 µl der auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellten isolierten Zellsuspension aus dem Blut und je 100 µl der auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellten isolierten Zellsuspension aus dem Darmepithel wurden in FACS-Röhrchen pipettiert und auf Eis gestellt.

Anschließend erfolgte die Zugabe der primären Antikörper als Einfach- oder Doppelfärbung in folgenden Kombinationen:

Kombinationen für Blutleukozyten

1. CD21 + SWC3a
2. TCR1 + CD8 α
3. CD14
4. CD4 + CD8 β
5. CD4 + CD25
6. CD2 + CD5
7. CD5 + MHCII
8. CD45RC

Kombinationen für Darmleukozyten

1. CD21 + SWC3a
2. CD16 + SWC3a
3. TCR1 + CD8 α
4. CD4 + CD8 β
5. CD2 + CD5
6. CD5 + MHCII
7. CD45

Eine Übersicht zur Detektion spezifischer Leukozytenpopulationen anhand der ausgewählten Oberflächenmarker ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Übersicht über die in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Differenzierungsmoleküle von Immunzellen zur Detektion spezifischer Leukozytenpopulationen (modifiziert nach Paßlack, 2010)

| CD-Expression | Nachweis | Referenz |
|---|--|--|
| CD2 ⁺ CD5 ⁻ | NK-Zellen | Duncan et al., 1989; Yang und Parkhouse, 1996; Gerner et al., 2009 |
| CD2 ⁻ CD5 ⁺ | B-Zellen und CD2 ⁻ $\gamma\delta$ -T-Zellen | Saalmüller und Bryant, 1994; Charemtantanakul und Roth, 2007; Pescovitz et al., 1998 |
| CD2 ⁺ CD5 ⁺ | $\alpha\beta$ -T-Zellen (total), CD2 ⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen | Saalmüller und Bryant, 1994; Pescovitz et al., 1998; Charemtantanakul und Roth, 2007 |
| CD4 ⁺ CD8 β ⁻ | $\alpha\beta$ -T-Zellen, naive T-Helfer-Zellen | Saalmüller et al., 2002; Charemtantanakul und Roth, 2007 |

| CD-Expression | Nachweis | Referenz |
|--|--|--|
| CD4 ⁻ CD8 β ^{high} | zytotoxische T-Zellen | Pauly et al., 1996; Arriens et al., 1998; Saalmüller et al., 2002; Charentantanakul und Roth, 2007 |
| CD4 ⁺ CD25 ⁻ | T-Helfer-Zellen | Bailey et al., 1992; Saalmüller et al., 2002 |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ | aktivierte T-Helfer-Zellen | Saalmüller et al., 2002 |
| CD5 ⁻ MHCII ⁺ | antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, ggf. T-Zellen), NK-Zellen | Saalmüller, 2006; Gerner et al., 2009 |
| CD5 ⁺ MHCII ⁺ | B-Zellen, ggf. T-Zellen (ruhende CD8 ⁺ -Zellen) | Saalmüller et al., 1991; Butler et al., 2006; Saalmüller, 2006 |
| CD21 ⁺ SWC3 ⁻ | B-Zellen | Butler et al., 2006; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008 |
| CD21 ⁻ SWC3 ⁺ | myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen) | Lunney und Pescovitz, 1987; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008; Martín de la Fuente et al., 2009 |
| CD16 ⁺ | NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen | Halloran et al., 1994; Youinou et al., 2002; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008 |
| CD14 ⁺ | Makrophagen (im Blut Monozyten) | Piriou-Guzylack und Salmon, 2008; Ezquerria et al., 2009 |
| TCR1 ⁺ CD8 α ⁻ | $\gamma\delta$ -T-Zellen | Yang und Parkhouse, 1996; Charentantanakul und Roth, 2007 |
| TCR1 ⁺ CD8 α ⁺ | $\gamma\delta$ -T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität | Yang und Parkhouse, 1996; Charentantanakul und Roth, 2007 |
| TCR1 ⁻ CD8 α ⁺ | CD8 α ⁺ - $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen | Pauly et al., 1996; Arriens et al., 1998; Saalmüller et al., 2002; Charentantanakul und Roth, 2007 |

| CD-Expression | Nachweis | Referenz |
|---------------------------|---|---|
| CD45RC⁺ | wird in aktivierten T-Helfer-Zellen herunterreguliert; auch Expression auf NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen möglich | Zuckermann et al., 1998; Saalmüller et al., 2002; Gerner et al., 2009 |
| CD45⁺ | Porzine Leukozyten | Hermiston et al., 2009 |

CD = Cluster of Differentiation; NK Zellen = Natürliche Killerzellen

Die Antikörper wurden teilweise vorverdünnt (Tab. 8).

Tabelle 8: Vorverdünnungen der primären Antikörper (Klon) zur Markierung der Leukozyten aus Blut und Darm (Bezugsquellen s. Anhang Tabelle 31)

| Primärer Antikörper (Klon) | Blutleukozyten | Darmleukozyten |
|---|---------------------|---------------------|
| CD2 (Clone „MSA4“) | keine Vorverdünnung | keine Vorverdünnung |
| CD4 (Clone 74-12-4) | 1:50 | 1:25 |
| CD5 (Clone „b53b7“) | keine Vorverdünnung | keine Vorverdünnung |
| CD5α (Clone 9G12) | (1:200*) | (1:200*) |
| CD8α (Clone 76-2-11) | 1:100 | 1:25 |
| CD8β (Clone PG 164A) | 1:100 | 1:100 |
| CD14 (Clone MCA 1218) | 1:100 | n. v. |
| CD16 (Clone SM 1732) | n. v. | 1:100 |
| CD21 (Clone BB6-11C9.6) | 1:100 | n. v. |
| CD25 (Clone SM 561) | 1:100 | n. v. |
| CD45 (Clone K252-1E4) | n. v. | 1:100 |
| CD45RC (Clone 3a56) | keine Vorverdünnung | n. v. |
| MHCII (Clone MSA 3) | 1:200 | 1:200 |
| SWC3a (Clone 74-22-15A) | 1:200 | 1:200 |
| TCR1 (Clone PGBL 22A) | 1:200 | 1:100 |

* = im 3. Durchgang wurde ein anderer CD5 Klon verwendet

n. v. = nicht verwendet

Es wurden monoklonale Antikörper verwendet, die gegen porcine Oberflächenmoleküle gerichtet waren. Für die Markierung von CD4 und CD8 α wurden direkt konjugierte Antikörper verwendet. Zur Detektion aller anderen primären Antikörper wurden sekundäre Antikörper, die mit fluoreszierenden Molekülen gekoppelt waren, eingesetzt. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden Antikörper mit dem grün fluoreszierenden Molekül Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und dem gelb-rot fluoreszierenden Molekül

Phycoerythrin (PE) benutzt. Eine Übersicht zu den in dem Versuch eingesetzten Sekundärantikörpern ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Sekundärantikörper und deren Markierungsmerkmale (Bezugsquellen s. Anhang Tabelle 32)

| Bezeichnung des sekundären Antikörpers | Fluoreszenzfarbstoff | Darstellung des primären Antikörpers |
|--|----------------------|--------------------------------------|
| IgG1 | PE | CD5,CD21, CD25, CD45, CD45RC |
| IgG1 | FITC | TCR1 |
| IgG2a | PE | CD8 α , CD8 β |
| IgG2a | FITC | CD2, MHCII |
| IgG2b | FITC | SWC3a, CD14, CD4, CD16 |

Die Antikörper wurden mit folgenden Volumina auf 100 μ l Zellsuspension der isolierten Blutleukozyten eingesetzt:

| | | | | | |
|--------|--------------|-------|--------------|----------------|---------------|
| CD2 | = 33 μ l | SWC3a | = 50 μ l | CD21 | = 1 μ l |
| CD5 | = 33 μ l | CD4 | = 2 μ l | CD14 | = 1 μ l |
| CD45RC | = 33 μ l | CD8 | = 1 μ l | CD5 α * | = 0,5 μ l |
| MHCII | = 50 μ l | CD25 | = 1 μ l | TCR1 | = 0,5 μ l |

Die Antikörper wurden mit folgenden Volumina auf 100 μ l Zellsuspension der isolierten Darmleukozyten eingesetzt:

| | | | | | |
|-------|--------------|--------------|-------------|----------------|---------------|
| CD2 | = 33 μ l | CD4 | = 4 μ l | CD45 | = 1 μ l |
| CD5 | = 33 μ l | CD8 α | = 4 μ l | CD16 | = 1 μ l |
| SWC3a | = 50 μ l | CD8 β | = 1 μ l | CD5 α * | = 0,5 μ l |
| MHCII | = 50 μ l | TCR1 | = 1 μ l | | |

*: im dritten Durchgang wurde ein anderer CD5 Klon verwendet (anti pig CD5 α 9G12)

Nach Zusatz der Antikörper wurden die Proben für 25 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 2 ml FACS-Puffer dazu pipettiert und die Proben bei 450g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt und das Zellsediment mit je 50 μ l des sekundären Antikörpers resuspendiert. Die sekundären Antikörper mussten dazu verdünnt werden. Die PE-gekoppelten Nachweisantikörper wurden 1:200 verdünnt, die FITC-gekoppelten 1:100.

Nach einer Inkubationsdauer von 25 Minuten, lichtgeschützt auf Eis, wurden die Proben nach Zugabe von 2 ml FACS-Puffer bei 450g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden anschließend im Durchflusszytometer BD FACS Calibur mit der Software CellQuest[®] Pro gemessen.

Da sich die Emissionsspektren von PE und FITC teilweise überschneiden, kommt es zur Detektion von Signalen im jeweils anderen Kanal. Diese falsch-positiven Signale wurden korrigiert (Kompensation). Für die PE-Kompensation wurde CD45RC, für die FITC-

Kompensation SWC3a verwendet. Zusätzlich erfolgte eine Kontrolle zur Über- bzw. Unterkompensation mit der Doppelfärbung CD5 (PE) und MHCII (FITC). Die Darstellung der Messsignale erfolgte in einem Streudiagramm.

Auswertung der Messergebnisse der Phänotypisierung

Die Auswertung der detektierten Zellen erfolgte mit CellQuest[®] Pro zur Ermittlung des relativen Anteils an B- und T-Lymphozyten und mononukleären Zellen sowie zur Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut und im Darm. Dafür wurden in einem Streudiagramm zuerst die morphologischen Parameter Größe (dargestellt im Forward Scatter, FSC-H) und Granularität (dargestellt im Sideward Scatter, SSC-H) gegeneinander aufgetragen, um anhand der sich ergebenden Punktwolken die Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Zelltrümmer (Debris) zu differenzieren (Abb. 13a).

Anschließend wurden die Punktwolken in Regionen (R1, R3, R6) zusammengefasst (Abb. 13b), und die detektierten Zellen in einem FITC-/PE- (FL1-H/FL2-H) Diagramm gegeneinander aufgetragen (Abb. 13c). Die sich ergebenden Punktwolken wurden mittels Quadrantenanalyse in einfach-positiv, doppelt-positiv und negativ gefärbte Zellen untergliedert und auf Grundlage der Oberflächenmarkierungen analysiert. Der Pan-Leukozyten-Marker CD45 wurde verwendet, um den Anteil der Immunzellen in der Darmzell-Suspension zu bestimmen.

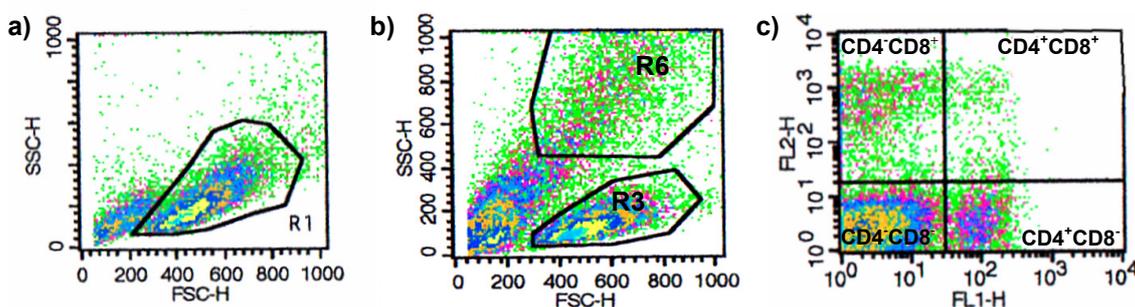


Abbildung 13: Zweiparameterdarstellung im Streudiagramm nach Festlegung einer Region um die Lymphozyten in Blut (a, R1) und Darm (b, R3). Ermittlung spezifischer Zelloberflächenmarker am Beispiel von CD4 und CD8 markierten Lymphozyten

- Darstellung der Zellen anhand ihrer Größe (FSC-H) und ihrer Granularität (SSC-H) zur Differenzierung der isolierten Blutzellen von Zelldetritus. Die Blutzellen wurden in einer Region (R1) zusammengefasst
- Für die aus der *Lamina epithelialis* des Darms isolierten Zellen erfolgte eine Zusammenfassung der Lymphozyten in der Region R3 und der mononukleären Zellen in R6.
- Darstellung der anschließenden Quadrantenanalyse der Fluoreszenzeigenschaften von Zellen aus R1 (Blut) und R3 (Darm), in diesem Fall nach Färbung von CD4 (FITC = FL1-H) und CD8 (PE = FL2-H).

3.2.4.3. Stimulation von peripheren Blutlymphozyten

Die aus den heparinisierten Vollblutproben isolierten Leukozyten wurden auf eine Zelldichte von 4×10^6 /ml mit Zellkulturmedium eingestellt. Die Mitogene wurden vor Verwendung

verdünnt, wobei PWM 1:80, Con A 1:40 und PHA-M 1:20 in Zellkulturmedium verdünnt wurden. Jeweils 25 µl der verdünnten Mitogenlösung wurden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert. Für jedes Tier wurde pro Mitogen ein sechsfacher Ansatz pipettiert, ebenso für die Negativkontrolle. Für die Negativkontrolle wurden 25 µl Zellkulturmedium pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl Zellsuspension in jede Kavität.

Die Platten wurden für 48 Stunden bei 37°C in einem CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 12 µl BrdU je Kavität, welches vorher 1:100 in PBS verdünnt wurde. Die Platten wurden dann für weitere 24 Stunden unter gleichen Konditionen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entnommen, wobei die Ansätze gleicher Konditionen (Mitogene) in ein FACS-Röhrchen pipettiert wurden. Die Proben wurden zur Verarbeitung auf Eis gekühlt. Nach der Entnahme wurden die Proben bei 400g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert.

In den ersten beiden Versuchsdurchgängen wurde das im restlichen Zellmedium verbliebene Zellsediment durch tropfenweise Zugabe von je 1 ml Ethanol (99%, -20°C) zur Permeabilisierung der Zellmembran resuspendiert. Die Proben wurden danach für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im dritten Versuchsdurchgang wurden die Zellen mit jeweils 250 µl PERM 2 Puffer (FACS™ Permeabilizing Solution 2 (10x) PERM 2), 1:10 mit Aqua bidest vorverdünnt, permeabilisiert und anschließend bei 37°C 18 Stunden inkubiert. Die folgenden Arbeitsschritte waren dann für alle Versuchsdurchgänge wieder identisch. Alle Proben wurden anschließend bei 1500rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Zellsediment in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Für die Oberflächenfärbung der Zellen wurden jeweils 50 µl des CD5 Antikörpers zu den Proben pipettiert. Die Proben wurden für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden jeweils 2 ml FACS-Puffer dazupipettiert und die Proben bei 400g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellsedimente mit jeweils 50 µl sekundärem Antikörper (IgG1 PE) resuspendiert. Dieser wurde vorher 1:100 in FACS-Puffer verdünnt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 25 Minuten auf Eis.

Anschließend wurden die Proben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (400g, 4°C und 5 Minuten) und der Überstand dekantiert. Zur Fixierung der Oberflächenfärbung wurden die Zellsedimente in 500 µl Fixierlösung resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml FACS-Puffer wurden die Proben bei 400g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurden die Zellsedimente jeweils in 200 µl DNase-Lösung (DNase 1:10 in DNase-Puffer verdünnt) resuspendiert. Die Proben wurden mit Parafilm abgedeckt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml FACS-Puffer und einer weiteren Zentrifugation bei 400g und 4°C für 5 Minuten wurden die Zellsedimente in 40 µl FACS-Puffer resuspendiert und anschließend jeweils 10 µl FITC conjugated mouse anti-BrdU dazu pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation für 30 Minuten auf Eis wurden die Proben nochmals mit 2 ml FACS-Puffer mittels Zentrifugation bei 400g und 4°C und 5 Minuten gewaschen. Nachdem der Überstand entfernt wurde und die Zellsedimente in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert wurden, erfolgte die Messung mittels Durchflusszytometrie.

Da es sich auch hier um eine Mehrfarbanalyse unter Verwendung zweier unterschiedlicher fluorchromierter Antikörper handelte, mussten die Farbstoffe vor der Messung gegeneinander kompensiert werden. Dafür wurde eine Probe der unstimulierten Zellen benutzt und anschließend mit den vorbereiteten PE- und FITC- Kompensationsproben die

Einstellungen vorgenommen. Zur Kontrolle der Über- bzw. Unterkompensation wurde eine doppelt gefärbte Probe (Con A) gemessen.

Auswertung der Messergebnisse der Lymphozytenproliferation

Für die Auswertung der Lymphozytenproliferation wurde das Computerprogramm CellQuest®Pro verwendet. Zur Differenzierung der Lymphozyten von Zelltrümmern wurden die Zellen in einem Streudiagramm nach Größe (FSC-H) und Granularität (SSC-H) analysiert (Abb. 14a). Die morphologische Detektion der Lymphozyten erfolgte in R2.

Da alle Zellen neben der intrazellulären FITC-Markierung auch eine CD5-Oberflächenmarkierung hatten, erfolgte anschließend die Darstellung der detektierten Lymphozyten aus R2 im FITC/PE-Diagramm (FL1-H/FL2-H), um eine weitere phänotypische Charakterisierung vorzunehmen (Abb. 14b). In einem letzten Schritt wurden die Zellen der Region R2 in ein Größe/ FITC- (FSC-H/FL1-H) Diagramm übertragen, um den Anteil der BrdU-enhaltenen (FITC- positiven) Zellen zu ermitteln (Abb. 14c).

Ermittelt wurde der relative Anteil proliferierter Lymphozyten. Als proliferierte Zellen wurden die BrdU-enhaltenen (FITC-positiven) Zellen definiert.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Lymphozyten}_{\text{proliferiert}} (\%) = \frac{\text{CD5}^+\text{BrdU}^+ \text{ Zellen}}{\Sigma \text{CD5}^+ \text{ Zellen}_{\text{(gesamt)}}} \times 100$$

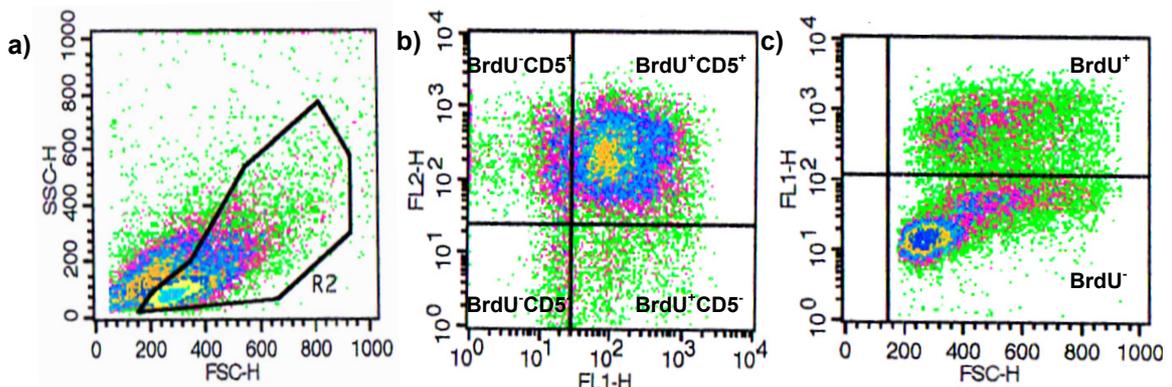


Abbildung 14: Zweiparameterdarstellung im Streudiagramm am Beispiel Con A stimulierter Lymphozyten

- Mithilfe der Darstellung von Zellgröße (FSC-H) und Granularität (SSC-H) erfolgte die Ermittlung der durch Con A stimulierten Lymphozytenpopulation, die dann in der Region R2 zusammengefasst wurde.
- Die detektierten Zellen aus R2 wurden in einem FITC- (BrdU) /PE- (CD5) Diagramm gegeneinander aufgetragen, um den relativen Anteil stimulierter Lymphozyten ($\text{BrdU}^+\text{CD5}^+$) zu ermitteln.
- Da die Zellpopulationen im FITC-/PE- Diagramm nicht immer deutlich abzugrenzen waren, erfolgte eine zusätzliche Darstellung der BrdU-positiven Zellen im Streudiagramm aufgetragen gegen die Zellgröße (FSC-H), um eine Stimulation nachzuweisen.

3.2.4.4. Messung der Phagozytoseaktivität mononukleärer Zellen aus dem Blut

Dieses Testsystem erlaubt die quantitative Determination der Phagozytoseaktivität isolierter Monozyten und Granulozyten aus heparinisiertem Vollblut. Als Merkmal der unspezifischen Immunabwehr steigt nach Antigenkontakt die Aktivität mononukleärer Zellen, körperfremdes Material zu phagozytieren.

Zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität wurde das kommerzielle Test-Kit PHAGOTEST® (Firma ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Deutschland, s. Anhang Tab. 37) benutzt.

Eine Übersicht zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität ist in Abbildung 15 dargestellt.

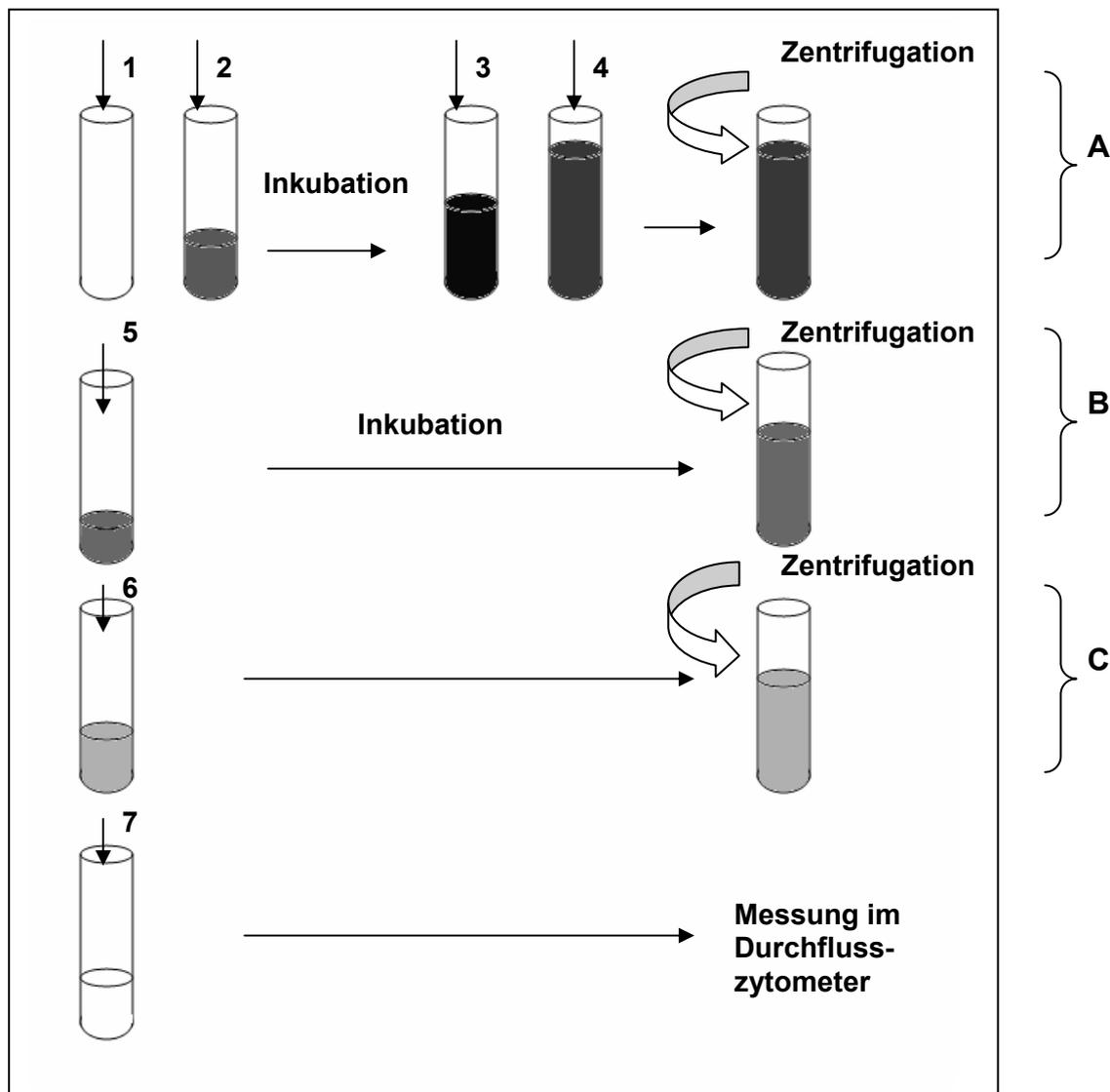


Abbildung 15: Arbeitsschritte zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität

Erläuterungen zur Abbildung 15

A: Markierung und Quenching:

- 1 – Vorlage der Vollblutprobe
- 2 – Zugabe der Bakterien
- 3 – Zugabe der Quenchlösung
- 4 – Zugabe der Waschlösung

B: Lyse und Fixation:

- 5 – Zugabe der Lyselösung

C: DNA- Markierung:

- 6 – Zugabe der Waschlösung
- 7 – Zugabe DNA – Lösung

Das heparinisierte Vollblut wurde vor Verwendung nochmals gemischt und 100 µl pro Ansatz in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Je Tier erfolgte der Ansatz mit einer Negativkontrolle und zwei Positivproben. In die Ansätze für die Positivproben wurde je 20 µl vorgekühlte opsonierte FITC-markierte *E. coli*-Suspension pipettiert und die Proben nach automatischer Durchmischung bei 37°C exakt 10 Minuten in einem geschlossenen Wasserbad inkubiert. Die Kontrollansätze blieben auf Eis. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden alle Proben zum Abstoppen der Phagozytose aus dem Wasserbad genommen und auf Eis gestellt.

Je Ansatz wurden 100 µl eiskalte Quenclösung (gebrauchsfertig im Kit) zugegeben und gemischt. Jeder Probe wurden anschließend 3 ml Waschlösung (gebrauchsfertig zum Verdünnen im Kit enthalten) zugefügt, die Proben kurz gemischt und dann 5 Minuten bei 4°C mit 250g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde der Waschvorgang wiederholt. Die Proben wurden dann bei Raumtemperatur für 20 Minuten durch Zugabe von je 2 ml Lysepuffer lysiert und fixiert. Anschließend wurden die Proben bei 4°C, 250g für 5 Minuten wieder zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstand wurden die Proben gewaschen und zentrifugiert. Nach Zugabe von 200 µl DNA-Färbelösung (gebrauchsfertig im Kit) je Probe und lichtgeschützter Inkubation von 10 Minuten auf Eis erfolgte die Messung der Zellsuspension im Durchflusszytometer BD FACS Calibur.

Auswertung der Messergebnisse der Phagozytoseaktivität

Die Auswertung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten erfolgte mit der Software CellQuest®Pro. Im Histogramm (FL2-H) erfolgte die Detektierung der Gesamt-Leukozyten in R1, um bei der Messung Bakterienaggregate auszuschließen (Abb. 16a). Anschließend erfolgte im Streudiagramm (FSC-H/SSC-H) die Detektierung der Granulozyten in R2 und der Monozyten in R3 (Abb. 16b). Die Regionen für Granulozyten und Monozyten wurden dann einzeln in zwei weiteren Histogrammen (FL1-H[FITC⁺Zellen]/ Anzahl gezählter Fälle) analysiert (Abb. 16c und 16d).

Die Einstellungen erfolgten so, dass pro Probe 10.000-15.000 Leukozyten gemessen wurden. Die Auswertung wurde unter der Berücksichtigung durchgeführt, dass die Kontrollproben, welche mit *E. coli* bei 4°C inkubiert wurden, auch eine gewisse FITC-Eigenfluoreszenz aufweisen. Daher wurden in den Histogrammen der Kontrollproben eine Markierung (M1) so gesetzt (<1% der detektierten Fälle), dass die Fluoreszenzstärke unterhalb dieser Markierung als negativ bzw. als Eigenfluoreszenz gewertet werden konnte. Eine zweite Markierung (M2) in den Testansätzen definierte, unter Beibehaltung des ersten Markers, den Bereich der Fluoreszenzintensität, der als positive Phagozytoseaktivität gewertet wurde. Bestimmt wurden der prozentuale Anteil der Zellen, die phagozytiert hatten und deren mittlere Fluoreszenzstärke.

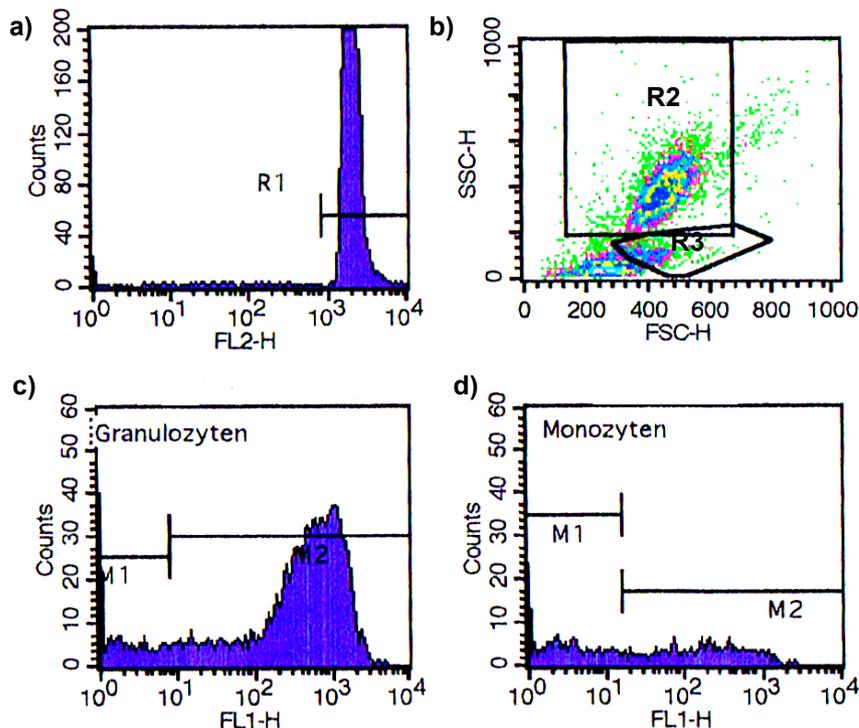


Abbildung 16: Darstellung der Ermittlung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten im Histogramm und Streudiagramm

- Darstellung der Leukozytenpopulation im Histogramm und Festsetzung einer Region R1 zum Ausschluss von Bakterienaggregaten.
- Differenzierung von Monozyten und Granulozyten anhand der Zellgröße und Granularität im Streudiagramm (FSC-H/SSC-H), Festsetzung der Regionen R2 für Granulozyten und R3 für Monozyten.
- Darstellung zur Ermittlung des relativen Anteils der in M2 (Markierungsbereich phagozytischer Zellen) phagozytischer Granulozyten aus R2 mittels Histogramm
- Darstellung zur Ermittlung des relativen Anteils der in M2 phagozytischer Monozyten aus R3 mittels Histogramm.

3.2.4.5. Bestimmung von Haptoglobin im Serum

Zur Bestimmung der Haptoglobin-Konzentration im Serum der Schweine wurde ein serologisches Testsystem (PIG HAPTOGLOBIN ELISA[®], Dunn Labor Technik GmbH, Asbach, Deutschland, s. Anhang Tab. 35-36) auf Grundlage eines Sandwich-ELISAs verwendet. Die Blutproben wurden für 10 Minuten bei 4°C und 1800g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und für den Test benutzt. Das Verdünnungsmedium wurde in einem Mischverhältnis von 1:5, die Waschlösung in einem Mischverhältnis von 1:20 mit deionisiertem Wasser zubereitet. Das Antikörperkonjugat wurde 1:100 verdünnt.

Die Chromogen- und Stopplösungen waren gebrauchsfertig. Der PIG Haptoglobin Kalibrator wurde mit 2 ml deionisiertem Wasser gemischt und hatte damit eine Konzentration von 55,4µg/ml. Aus dieser Kalibrationslösung wurden anschließend acht Standards hergestellt, die beginnend mit einer Konzentration von 400ng/ml geometrisch weiter verdünnt wurden.

Alle Proben wurden mit dem Verdünnungsmedium 1:10.000 verdünnt.

Hundert µl der Proben wurden in einem Doppelansatz auf eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Ebenfalls wurden 100 µl jedes Standards im Doppelansatz pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) unter Lichtschutz. Nach Inkubation wurde jede Probe in den Kavitäten aspiriert, 200 µl Waschlösung dazu pipettiert, die Platte für 20 Sekunden geschüttelt und danach die Kavitäten durch Ausschlagen entleert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Anschließend wurden 100 µl Antikörperkonjugat pro Kavität pipettiert und die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang.

Das Chromogensubstrat wurde zu 100 µl pro Kavität hinzu pipettiert und die Platte für exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Danach erfolgte eine sofortige Zugabe von 100 µl Stopplösung pro Kavität.

Bei einer Wellenlänge von 450 nm wurde die Extinktion mittels Photometer (Firma TECAN sunrise, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die Voreinstellungen und Messung erfolgten über das Programm Magellan 6 (Firma TECAN, Crailsheim, Deutschland).

Auswertung der Messergebnisse der Haptoglobinkonzentration

Die Auswertung der Haptoglobinkonzentration erfolgte mit dem Computerprogramm Magellan 6. Da vor der Messung die Konzentrationen der Standards und der Verdünnungsstufen der Proben in das Programm eingegeben wurden, konnte eine direkte Auswertung über das Computerprogramm erfolgen. Die Extinktionswerte wurden auf Grundlage der Verdünnungsstufe und der Konzentrationen der Standards vom Programm ermittelt. Da die Quantität des gebundenen Enzyms direkt mit der Konzentration von Haptoglobin im Serum korreliert, entspricht die Ermittlung der Extinktion der Konzentration an Haptoglobin in den Proben. Die ermittelten Werte wurden anschließend unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors umgerechnet.

3.2.4.6. Bestimmung der *Salmonella*-spezifischen Immunglobulinkonzentrationen (IgG, IgM, IgA) im Serum

Zur blutserologischen Diagnostik wurde der indirekte, nicht-kompetitive, isotypspezifische Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Salmotype® Pig Screen der Firma Labordiagnostik Leipzig GmbH (s. Anhang Tab. 33) verwendet.

Dieses Testsystem ermöglicht einen quantitativen Antikörpernachweis gegen *Salmonella* spp.-Antigene in Schweineseren. Der Antikörpernachweis richtet sich gegen die *Salmonella*-Oberflächenantigene 1, 4, 5, 6, 7 und 12. Die Mikrotiterplatte war mit inaktiviertem Antigen von *Salmonella* Choleraesuis und *Salmonella* Typhimurium beschichtet. Bei der Negativkontrolle handelte es sich um Serum eines gegen *Salmonella* spp. negativ getesteten Schweins, bei der Positivkontrolle um Serum eines gegen *Salmonella* spp. positiv getesteten Schweins. Der Waschpuffer wurde 1:10 verdünnt. Die Serumproben wurden 1:100 mit Verdünnungspuffer für die weitere Verwendung verdünnt. Auf der Mikrotiterplatte wurden sowohl von den Kontrollen als auch von den Proben jeweils 100 µl im Duplikat in die Kavitäten pipettiert. Anschließend wurde die Platte unter Lichtschutz und bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Es erfolgte eine dreimalige Waschung mit jeweils 300 µl Waschpuffer. Danach wurden in jede Kavität 100 µl anti-IgG-HRP-Konjugat pipettiert und die Platte weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter dreimaliger

Waschung mit je 300 µl Waschpuffer erfolgte das Pipettieren von je 100 µl TMB-Konjugat pro Kavität. Nach exakt 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mittels Zugabe von 100 µl Stopplösung je Kavität gestoppt. Die Visualisierung der Reaktion erfolgte mittels Stopplösung. Die Messung der optischen Dichte erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620-650 nm.

Außerdem erfolgte die Bestimmung Isotyp-spezifischer (IgA, IgG, IgM) *Salmonella* Typhimurium-Antikörper im Serum der Schweine unter Verwendung eines *in-house* ELISAs aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene der Freien Universität Berlin modifiziert nach Roesler et al. (2005), Roesler (2007) und Szabò (2008) (s. Anhang Tab. 34). Anhand dieser Methode ist es möglich, diagnostische Aussagen zum Infektionsverlauf zu treffen. Um konkrete Aussagen sowohl zur Dynamik der Immunantwort nach der Impfung als auch zur Menge der produzierten Antikörper treffen zu können, mussten die Serum- und Kontrollproben \log_2 -titriert werden. Entsprechend den Isotypen wurden mehrere Mikrotiterplatten (96-Well, U-shape, flach, high binding, Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) verwendet, die mit dem *Salmonella* Typhimurium-Stamm DT104 beschichtet waren. Der Bakterienstamm wurde im Vorfeld auf Schafblutagar für zwölf Stunden angezüchtet und die Mikrotiterplatten mit der anschließend hergestellten Bakteriensuspension beschichtet. Als Positivkontrolle diente das Serum eines an Sepsis erkrankten Schweins, welches gegen *Salmonella* Typhimurium positiv getestet wurde. Als Negativkontrolle wurde *Salmonella* Enteritidis-Antigen verwendet. Für die Bestimmung von IgA wurden die Serumproben 1:50 in Verdünnungspuffer (aus SALMOTYPE® Pig Screen Test-Kit) verdünnt und auf der Mikrotiterplatte bis 1:50.000 austitriert. Für IgM und IgG wurden die Serumproben 1:1.000 verdünnt und auf der Platte bis 1:1.000.000 austitriert. Die Antikörperkonjugate (Fa. Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) wurden für IgA 1:2500 und für IgM und IgG 1: 2000 verdünnt.

Die Serumproben wurden anschließend auf einer Mikrotiterplatte in einer \log_2 -Verdünnungsreihe pipettiert (Abb. 17). Die Platten wurden für 60 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur (22°C) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit je 300 µl Waschpuffer pro Kavität (aus SALMOTYPE® Pig Screen Test-Kit) wurden je 100 µl Antikörper-Konjugat in die Kavitäten pipettiert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem viermaligem Waschgang mit je 300 µl Waschpuffer wurden je 100 µl TMB-Konjugat (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) für 10 Minuten dazu pipettiert. Nach exakter Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von je 100 µl Stopplösung je Kavität (Schwefelsäure 0,5M, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A | - | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| B | | 100µl | | | | | | | | | | |
| C | | 100 µl | | | | | | | | | | |
| D | | 100 µl | | | | | | | | | | |
| E | + | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Abbildung 17: Titrationsschema und Anordnung der Proben zur Bestimmung von Immunglobulinen gegen *Salmonella* Typhimurium im Serum der Schweine

- Legende:
- A1-D1 = Titrationsplätze der Negativkontrolle
 - E1-H1 = Titrationsplätze der Positivkontrolle
 - A2-A12/E2-E12 = Ausgangskonzentration der Serumproben
(IgG 1:1000, IgM 1:1000, IgA 1:50)
 - B2-B12/F2-F12 = Titrationsstufe 1(100µl Probe aus der oberen Kavität überführt)
 - C2-C12/G2-G12 = Titrationsstufe 2
 - D2-D12/H2-H12 = Titrationsstufe 3

Die Messung der Extinktion erfolgte mit dem Photometer (SUNRISE, Firma TECAN) mit folgenden Messparametern:

| | |
|--------------|----------------------|
| Wellenlänge | 450nm |
| Lesemodus | normal |
| Schüttelzeit | 5s |
| Einheit | OD (Optical Density) |

Auswertung der Messergebnisse der Immunglobulinkonzentration im Serum

Die Ermittlung der Serum-Titer-Werte erfolgte mit der Software SalmoSoft™ (Labordiagnostik Leipzig GmbH, Leipzig, Deutschland). Die Ermittlung der Proben-OD%-Werte erfolgten durch die ermittelten Mittelwerte (MW) der gemessenen Optischen Dichten (OD) der Negativkontrolle (NK) und der Positivkontrolle (PK) nach folgender Formel:

$$\text{Proben-OD\%-Wert} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}}{\text{MW OD}_{\text{PK}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}} \times 72,1 \text{ OD\%}$$

Im Falle des *in-house* ELISAs wurden die erhobenen Daten mittels eines Computerprogramms berechnet und die Antikörperaktivitäten in ELISA-Units (EU)/ml angegeben.

3.2.5. Verdauungsphysiologische Methoden

3.2.5.1. Bestimmung des pH-Werts des Chymus

Die Messung des pH-Wertes vom Chymus erfolgte mit einer pH-Elektrode nach Zweipunktkalibrierung mit Standardlösungen bei pH 4 und pH 7. Dafür wurde ein Gramm der Chymusproben der jeweiligen Darmabschnitte in ein 15 ml-Gefäß überführt, mit 9 ml destilliertem Wasser aufgefüllt und homogenisiert. Da von einigen Tieren aus dem Duodenum und Ileum nicht ausreichend Digesta gewonnen werden konnte, war eine pH-Messung von dieser Lokalisation nicht für alle Tiere möglich.

3.2.5.2. Bestimmung der Trockensubstanz in der Digesta und im Kot

Die Bestimmung der Trockensubstanz (TS) erfolgte aus allen Darmabschnitten anhand von Poolproben.

Dafür wurden die jeweiligen Digestaprobe der einzelnen Darmabschnitte einer Fütterungsgruppe und eines Durchgangs vereinigt und gewogen.

Die Proben wurden anschließend mithilfe der Vakuumgefriertrocknung für zwei Tage getrocknet. Die getrockneten Poolproben wurden danach erneut gewogen und der prozentuale Anteil der Trockensubstanz bestimmt.

$$\text{TS (\%)} = \frac{\text{Masse (g)}_{\text{gefriergetrocknete Digesta}}}{\text{Masse (g)}_{\text{frische Digesta}}} \times 100$$

Zusätzlich erfolgte die Ermittlung der Trockensubstanz mittels einer weiteren Methode. Jeweils 1-2 g Digesta (E) wurden eingewogen und über vier Stunden bei 103°C mit offenem Deckel getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Proben im Exsikkator ausgekühlt. Danach erfolgte eine erneute Gewichtsbestimmung.

3.2.5.3. Bestimmung der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins

Im vorliegenden Versuch wurde die scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mittels Indikatormethode. Als Indikator wurde dem Futter Chrom-III-oxid zugesetzt.

Für die Untersuchungen wurden für jeden Versuchsdurchgang Poolproben genutzt. In dem ersten Versuchsdurchgang ergab sich eine Poolprobe aus dem Kot von jeweils drei Tieren jeder Versuchsgruppe. Für den zweiten Versuchsdurchgang setzten sich die Poolproben der Gruppen A und B aus dem Kot von vier Tieren sowie bei den Gruppen C und D aus dem Kot von drei Tieren zusammen. Für den letzten Versuchsdurchgang bestand die Poolprobe jeder Versuchsgruppe aus Kot von jeweils vier Tieren.

Die Bestimmung von Chrom erfolgte mit dem Atomabsorptionsspektrometer.

Die Rohproteinbestimmung erfolgte über die Messung des Stickstoffgehaltes der Probe mithilfe eines Makro-Elementaranalysators (Dumas Verfahren).

Die Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit erfolgte schließlich nach folgender Formel:

$$sV (\%) = 100 - \frac{\text{Chromgehalt}_{\text{FM}} (\text{g/kg})}{\text{Chromgehalt}_{\text{Kot}} (\text{g/kg})} \times \frac{\text{Rp}_{\text{Kot}} (\text{g/kg})}{\text{Rp}_{\text{FM}} (\text{g/kg})} \times 100$$

Legende: FM = Futtermittel

Chromatographische Analysen

3.2.5.4. Bestimmung der D- und L-Laktatkonzentration in der Digesta

Die Quantifizierung von D-/L-Laktat in Digesta und Kot erfolgte mit der HPLC-Anlage Agilent 1100 (Firma Agilent, Waldbronn, Deutschland). Grundlage ist die Trennung von D- und L-Laktat aus einem wässrigen Extrakt der Proben über eine chirale Säule.

Für die Bestimmung der Laktatkonzentrationen in der Digesta der jeweiligen Darmabschnitte wurden die Proben zu 0,5 g Portionen in Eppendorfgefäßen abgewogen. Dafür wurden die abgewogenen Proben 1:1 mit eiskalter 0,5 molarer Kupfersulfat-Lösung versetzt und 5 Minuten gut gemischt.

Nachdem die Proben 10 Minuten auf Eis inkubiert wurden, wurden sie bei 28392g, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 50µl 85 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{H}_2\text{O}$ (Carrez I) versetzt, durchmischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 50 µl 250 mM $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Carrez II) zugegeben und die Proben erneut für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden dann bei 141960g, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Cellulose-Acetat-Spritzenvorsatzfilter in Eppendorfgefäße überführt und die Lösungen nach entsprechender Verdünnung gemessen. Für die Messungen wurde die Säule Phenomenex Chirex 3126 (D)-Penicillamine 150 x 4,6 mm (Firma Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) benutzt, als Vorsäule Phenomenex C18 4.0 L mm x 2.0 ID mm (Firma Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland).

Die Proben wurden wie folgt für die Analyse in Probengefäßen verdünnt:

| | |
|-----------------|--|
| <u>Duodenum</u> | 200 µl Probe und 800 µl Kupfer-II-sulfat-Lösung (0,5 mmol) |
| <u>Jejunum</u> | 200 µl Probe und 800 µl Kupfer-II-sulfat-Lösung (0,5 mmol) |
| <u>Ileum</u> | 200 µl Probe und 800 µl Kupfer-II-sulfat-Lösung (0,5 mmol) |
| <u>Zäkum</u> | 400 µl Probe und 600 µl Kupfer-II-sulfat-Lösung (0,5 mmol) |

An der HPLC-Anlage wurden folgende Parameter eingestellt:

| | |
|-------------------------------|---|
| Fließgeschwindigkeit: | 1,0 ml/min |
| Fließmittel | Leitung A: Kupfer-II-sulfat-Lösung 0,5 mmol/l |
| | Leitung B: leer |
| | Leitung C: Kupfer-II-sulfat-Lösung 2,5 mmol/l |
| | Leitung D: leer |
| Injektionsvolumen der Proben: | 20 µl |
| UV-Detektor: | 253 nm |
| Temperatur: | 35°C |
| Stoppzeit: | 24 min |

| | |
|--------------------------------|-------------|
| Retentionszeit (D-Laktat): | 12-12,5 min |
| Retentionszeitzeit (L-Laktat): | 15-15,5 min |

Analyseprogramm

| Zeit (min) | Leitung A (%) | Leitung B (%) | Leitung C (%) | Leitung D (%) |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 0 | 65 | 0 | 35 | 0 |
| 17 | 65 | 0 | 35 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 23 | 65 | 0 | 35 | 0 |
| 24 | 65 | 0 | 35 | 0 |

3.2.5.5. Bestimmung der Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren in der Digesta

Die Gehalte an kurzkettigen Fettsäuren (Azetat, Propionat, Butyrat und Valeriat) in der Digesta wurden gaschromatographisch (Gaschromatograph Agilent Technologies 6890N mit Autosampler G2614A und Injektionsturm G2613A, Firma Agilent, Waldbronn, Deutschland) mit einem Flammenionisationsdetektor ermittelt.

Hierfür wurde die Kapillarsäule Agilent 19095N-123 HP-INNOWax Polyethylenglykol (Firma Agilent, Waldbronn, Deutschland) genutzt, Wasserstoff diente als Trägergas.

Die Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren erfolgte aus dem Jejunum, Ileum, Zäkum und Kolon. Dafür wurden jeweils 0,3 g Digesta- und Kotproben frisch eingewogen und mit 1ml Verdünnungslösung eines internen Standards, der 0,5 mmol/l Capronsäure (C6:0) enthielt, versetzt. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde geschüttelt und danach bei Raumtemperatur und 16200g für 8 Minuten zentrifugiert. Von Jejunum- und Zäkum-Digesta wurden jeweils 400 µl des Überstands mit 800 µl des internen Standards versetzt, von der Kolon-Digesta wurden 100 µl Überstand mit 1000 µl internem Standard versetzt. Die Proben wurden erneut gut geschüttelt und anschließend gemessen.

Am Gaschromatographen wurden folgende Parameter eingestellt:

| | | | | |
|---------------------|-------------------|---------------|-----|-----|
| Injektoreinstellung | Volumen: | 1 µl | | |
| Inlet | Modus: | Split | | |
| | Gas: | Wasserstoff | | |
| | Splitverhältnis: | 1:1 | | |
| | Splitfluss: | 30 ml/min | | |
| Temperaturprogramm | Temperatur (°C) | 100 (initial) | 150 | 250 |
| | Zeit (in Minuten) | 0,02 | 0,5 | 2,0 |
| | °C/Minute | | 600 | 600 |
| Ofenprogramm | Temperatur (°C) | 70 (initial) | 140 | 190 |
| | Zeit (in Minuten) | 0,5 | 1,5 | 4,0 |
| | °C/Minute | | 15 | 120 |

3.3. Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen und die grafischen Darstellungen wurden mit der Software SPSS 15.0 und 17.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, USA) und Excel 2003 für Windows (Fa. Microsoft, Redmond, USA) erstellt. Die Daten wurden unter Berücksichtigung der zu prüfenden Parameter mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Für normalverteilte Daten erfolgte eine weitere statistische Auswertung anhand der einbeziehungsweise mehrfaktoriellen Varianzanalyse, wobei die ermittelten Ergebnisse die abhängigen Variablen darstellten und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ angesetzt wurde. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ wurden zur Überprüfung auf Gruppenunterschiede die Post-Hoc-Tests nach Bonferroni und Scheffé angewendet. Bei Daten, die nicht normalverteilt waren, erfolgte die Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ wurden Gruppenunterschiede mittels Mann-Whitney- Test (U-Test) analysiert. Die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen erfolgt durch die Superskripte a, b und c.

4. ERGEBNISSE

4.1. *In vitro*-Untersuchungen

4.1.1. Einfluss der Pflanzenextrakte auf die zelluläre Interaktion zwischen einem enteropathogenen *E. coli*-Stamm und einer IPEC-J2-Zelllinie

Die Ergebnisse der Versuche zeigten deutliche Effekte durch den Einsatz der untersuchten Pflanzenrohstoffe auf die Fluoreszenzintensität der mit Bakterien koinkubierten Epithelzelllinie.

Unter dem Einfluss von FRESTA® F und Bockshornkleesamen konnte eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der Fluoreszenz der IPEC-J2 Zellen im Vergleich zu der Positivkontrolle nachgewiesen werden. Dabei reduzierte sich die Fluoreszenzintensität unter dem Einfluss von FRESTA® F um 52,7% im Vergleich zur Positivkontrolle. Unter dem Einfluss von Bockshornkleesamen konnte eine Reduktion von 57,6% im Vergleich zur Positivkontrolle beobachtet werden. Aufgrund der starken Eigenfluoreszenz des Süßholzwurzelextraktes war eine Auswertung möglicher Effekte auf die Bindung der fluoreszenzmarkierten *E. coli* an die koinkubierte Epithelzelllinie mit dieser Methode nicht möglich.

Tabelle 10: Einfluss pflanzlicher Substanzen auf die Fluoreszenz von IPEC-J2-Zellen als Parameter der Adhäsion eines enteropathogenen *E. coli*-Stamms, Mittelwerte \pm Standardabweichungen

| Substanzen | Relative Fluoreszenzintensität (n ¹ =52) | Relativer Anteil der fluoreszierenden IPEC-J2-Zellen (n=52) |
|--------------------|---|---|
| Positivkontrolle | 2,03 ^a (\pm 1,13) | 26,0 ^a (\pm 8,9) |
| FRESTA® F | 0,96 ^b (\pm 0,63) | 24,5 ^{ab} (\pm 9,1) |
| Bockshornkleesamen | 0,86 ^b (\pm 0,61) | 16,8 ^b (\pm 7,9) |
| Süßholzwurzel | n.b. | n.b. |

¹Anzahl der gewerteten Fälle, n.b. = nicht bestimmbar

Mittelwerte mit unterschiedlichen Superskripten in einer Spalte unterscheiden sich signifikant, $p < 0,05$

Tabelle 10 verdeutlicht den Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Fluoreszenzintensität von IPEC-J2-Zellen nach der Inkubation mit markierten *E. coli*. Die Fluoreszenz dient als Messparameter für die Menge zellgebundener Bakterien. Dafür wurde die relative Fluoreszenzintensität ermittelt, da das emittierte Fluoreszenzlicht proportional zu der Zahl gebundener Fluorochrommoleküle ist. Durch die Berechnung der Differenz aus der Positivprobe (Epithelzellen, Medium, *E. coli* und Testsubstanzen; außer in Positivkontrolle) und der Negativprobe (Epithelzellen, Medium, Testsubstanzen; außer in Negativkontrolle) wurde die Eigenfluoreszenz der Epithelzellen, des Mediums und der Testsubstanzen berücksichtigt. Anschließend wurde dieser Wert mit der Negativprobe in ein Verhältnis gesetzt, um die relative Fluoreszenzintensität zu berechnen. Der ermittelte Wert stellt als dimensionslose Größe den Faktor dar, um den sich die Fluoreszenzintensität gegenüber der

Negativkontrolle durch gebundene markierte *E. coli* erhöht. In absoluten Zahlen bedeutet das, dass sich die Fluoreszenz bei einem Faktor von 1 bezogen auf den Wert der Negativkontrolle verdoppelt. Dagegen ist bei einem Faktor von Null davon auszugehen, dass keine Adhäsion von *E. coli* an den Epithelzellen stattgefunden hat. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sowohl für die Positivkontrolle als auch für die geprüften Substanzen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden konnte. Demzufolge ist eine Adhäsion von *E. coli* an die IPEC-J2-Zellen erfolgt. Allerdings zeigten sich unter dem Einfluss der pflanzlichen Testsubstanzen signifikant geringere Zunahmen der Fluoreszenzintensität als in der Positivkontrolle. Die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität lag hier unter eins. Unter dem Einfluss von FRESTA® F stieg die Fluoreszenzintensität um den Faktor 0,96 (p=0,006), bei Bockshornkleesamen um den Faktor 0,86 (p=0,003). Dagegen stieg die Fluoreszenzintensität in der Positivkontrolle, also bei Inkubation von Epithelzellen mit *E. coli*, um den Faktor zwei. Neben der veränderten Fluoreszenzintensität der Epithelzellen konnte auch eine Veränderung des relativen Anteils der mit *E. coli* inkubierten Epithelzellen beobachtet werden. Während der prozentuale Anteil der fluoreszierenden Epithelzellen in der Positivkontrolle bei 26% lag, zeigte sich unter dem Einfluss von FRESTA® F ein prozentualer Anteil fluoreszierender Epithelzellen von 24,5% (p=1,00) und bei Bockshornkleesamen von 16,8% (p=0,031). Damit wurde der Anteil der mit *E. coli* assoziierten Epithelzellen unter dem Einfluss von FRESTA® F um 5,7% reduziert, unter dem Einfluss von Bockshornkleesamen sank der Anteil um 35,5%.

4.1.2. Bindungskapazität pflanzlicher Substanzen gegenüber einem *E. coli*-Stamm

In den Untersuchungen zur Bindung des *E. coli*-Stamms an die Prüfsubstanzen waren signifikanten Unterschiede der Extinktionen der geprüften Testsubstanzen gegenüber der Positiv- und Negativkontrolle (BSA) erkennbar. Die Messungen wurden für die achte Stunde der Inkubation ausgewertet, da sich in dieser Zeitphase eine logarithmische Wachstumskurve darstellte. Bei einer Ausgangskonzentration von 1×10^7 Zellen/ml, die einer optischen Dichte von 0,01 bei 620 nm entspricht, verdeutlichen die erhöhten Extinktionswerte nach acht Stunden eine Zunahme der Bakteriendichte.

Tabelle 11: Optische Dichte (OD) nach acht Stunden Inkubation zur quantitativen Beurteilung der Bindungskapazität der pflanzlichen Substanzen für den *E. coli*-Stamm, Mittelwert \pm Standardabweichung

| Substanzen | n ¹ | OD (620nm) |
|--------------------|----------------|--|
| Positivkontrolle | 16 | 0,49^a (\pm 0,06) |
| Negativkontrolle | 8 | 0,06^c (\pm 0,05) |
| FRESTA® F | 15 | 0,32^b (\pm 0,20) |
| Bockshornkleesamen | 15 | 0,37^{ab} (\pm 0,15) |
| Süßholzwurzel | 8 | 0,26^b (\pm 0,08) |

¹Anzahl der gewerteten Fälle

Mittelwerte mit unterschiedlichen Superskripte in einer Spalte unterscheiden sich signifikant (p< 0,05)

Bei einer angenommenen Ausgangskonzentration an *E. coli* von 1×10^7 Zellen/ml mit einer gemessenen Extinktion von 0,01 zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Extinktion bzw. eine Erhöhung der Bakteriendichte nach acht Stunden Inkubation. Das Ausmaß der Zunahme wurde als Maßstab zur Charakterisierung des Bindungspotenzials der pflanzlichen Materialien für den untersuchten *E. coli*-Stamm gedeutet. Die Ergebnisse zeigten in der Positivkontrolle die höchste Extinktion (0,49), was als Folge der Bindung der Bakterien an die Oberfläche der Mikrotiterplatte zu interpretieren ist. Diese war mit einer speziellen Polysaccharidschicht überzogen. Die geringste Bindung der Bakterien erfolgte in der Negativkontrolle (0,06), in der Rinderserumalbumin auf der Oberfläche der Platte gebunden war. Für die Testsubstanzen zeigten sich eine signifikant niedrigere Extinktionen bei FRESTA® F ($p = 0,01$) und der Süßholzwurzel ($p = 0,002$) gegenüber der Positivkontrolle. Gegenüber der Negativkontrolle zeigte alle Testsubstanzen signifikant erhöhte Extinktionswerte ($p < 0,01$).

4.1.3. Einfluss der Konzentration pflanzlicher Substanzen auf das Wachstumsverhalten des *E. coli*-Stamms

Ein Einfluss der Konzentration der einzelnen Pflanzensubstanzen auf das Wachstumsverhalten des geprüften *E. coli* Stamms konnte nicht beobachtet werden. Weder bei einer Konzentration von 1% noch bei den weiteren Verdünnungsstufen zeigten sich Veränderungen der Wachstumskinetik oder der Bakteriendichte (Abbildungen 18-20). Allerdings zeigten sich bei der 1%igen und 0,5%igen Lösung des Bockshornkleesamens im Vergleich zu der Positivkontrolle numerisch niedrigere Extinktionswerte, die statistisch jedoch nicht abgesichert werden konnten (Abb. 19). Im Falle des Süßholzwurzelextraktes zeigten sich trotz Korrektur der Leerwerte höhere Ausgangsextinktionswerte im Vergleich zur Positivkontrolle (Abb. 20).

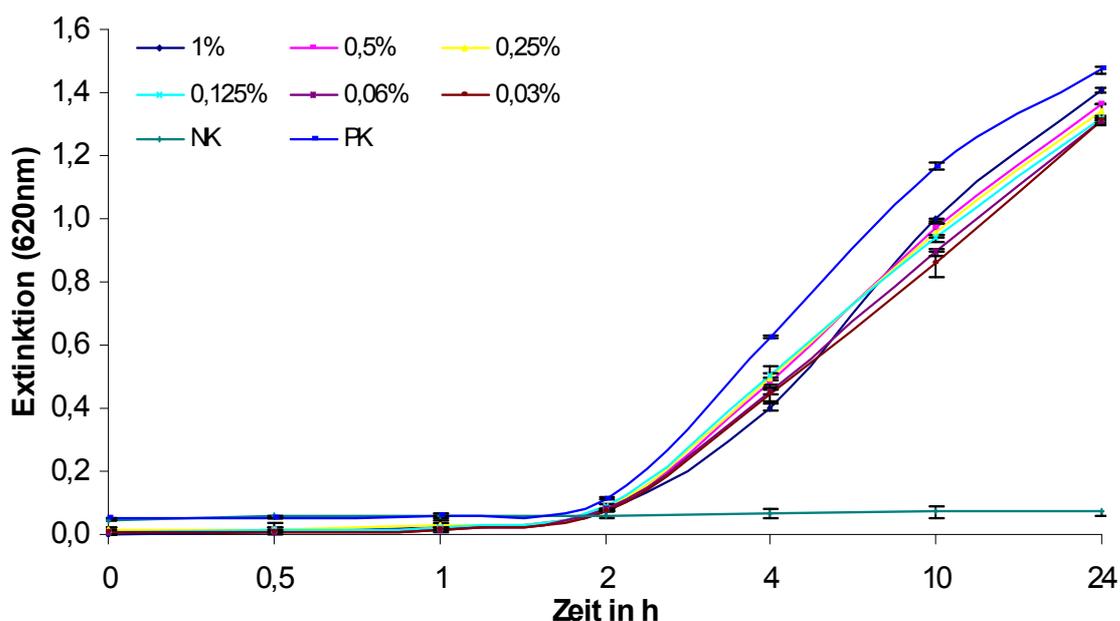


Abbildung 18: Einfluss verschiedener Konzentrationen von FRESTA® F auf das Wachstum eines enteropathogenen *E. coli*-Stamms bei 24-stündiger Inkubation
 Legende: NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle (Anzahl der gewerteten Fälle: 3)

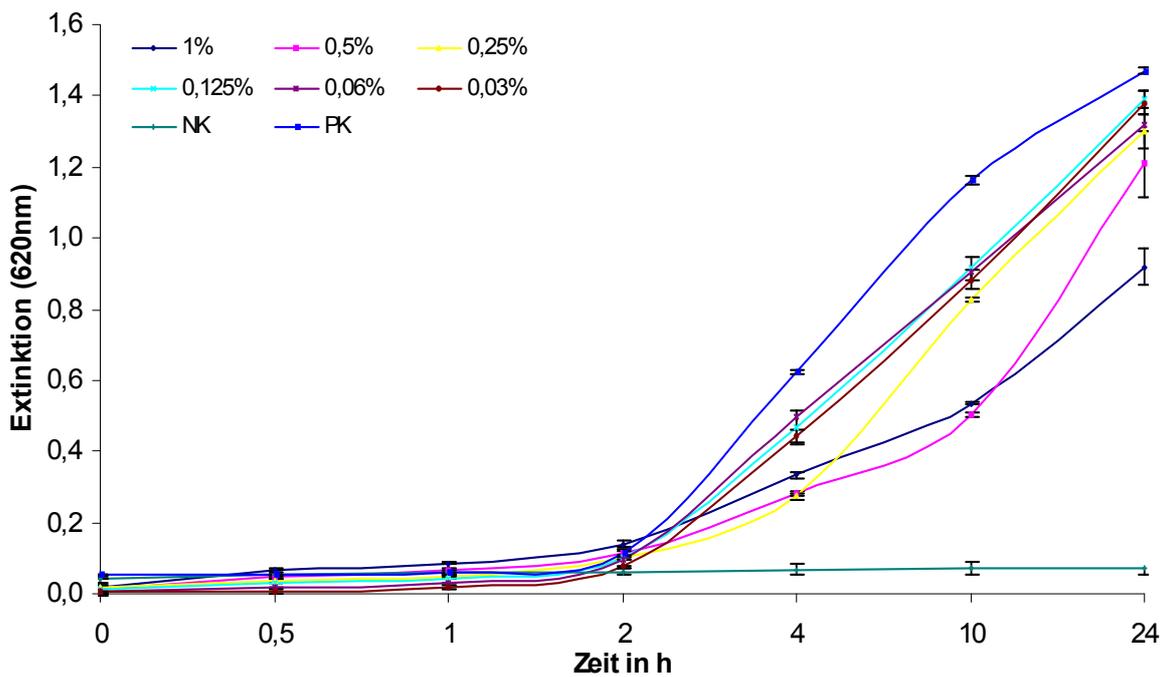


Abbildung 19: Einfluss verschiedener Konzentrationen von Bockshornkleesamen auf das Wachstum eines enteropathogenen *E. coli*-Stammes bei 24-stündiger Inkubation
 Legende: NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle (Anzahl der gewerteten Fälle: 3)

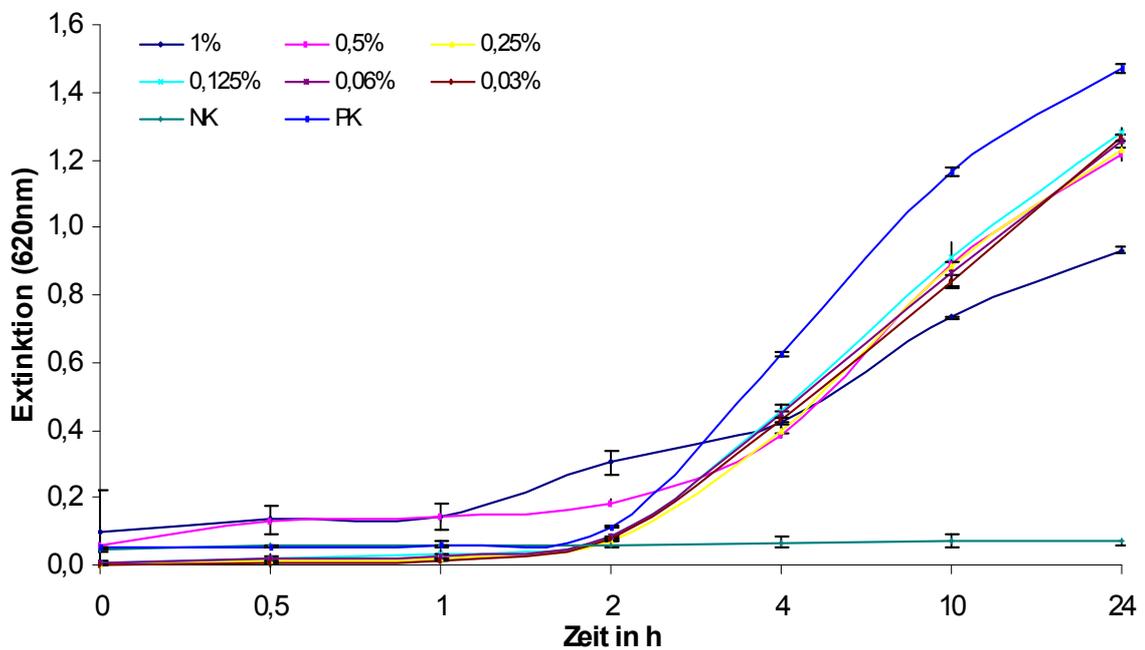


Abbildung 20: Einfluss verschiedener Konzentrationen der Süßholzwurzel auf das Wachstum eines enteropathogenen *E. coli*-Stammes bei 24-stündiger Inkubation
 Legende: NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle (Anzahl gewerteter Fälle: 3)

4.2. Fütterungsversuch

4.2.1. Leistungsparameter

4.2.1.1. Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere während des Versuchs

In den drei Versuchsdurchgängen zeigten alle Tiere ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Am zweiten Tag nach der Einstallung konnte bei allen Tieren eine Futteraufnahme beobachtet werden. Nach der oralen Vakzinierung gegen Salmonellen zeigten die Tiere bei uneingeschränktem Allgemeinbefinden und guter Futteraufnahme an bis zu zwei Tagen dünnbreiigen Kotabsatz.

4.2.1.2. Lebendmasse und Lebendmassezunahme

Die Ferkel wurden anhand ihrer Lebendmasse gleichmäßig auf die Gruppen verteilt. Da die Spannweite der Aufnahmegewichte zwischen 5,32kg und 13,0kg lag, wurden die Ferkel so aufgeteilt, dass es in jeder Gruppe sowohl leichtere als auch schwerere Tiere gab. Damit ergab sich ein vergleichbarer Durchschnittswert zwischen den Gruppen (Tab. 12).

Tiere mit höherem Anfangsgewicht zeigten während des Versuchs eine höhere Lebendmassezunahme. Während es in der ersten Fütterungswoche in allen drei Versuchsreihen bei allen Ferkeln zu einer Lebendmassezunahme kam, zeigten die Tiere in der ersten Versuchsreihe nach der zweiten Woche Gewichtsverluste zwischen 10 g und 970 g, wobei die größten Gewichtsverluste in der Kontrollgruppe auftraten. Diese Ferkel unterschieden sich allerdings nach der dritten Woche nicht mehr von den anderen Tieren der jeweiligen Gruppen.

Die Mittelwerte in den einzelnen Versuchsgruppen unterschieden sich nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 zusammengefasst.

4.2.1.3. Futteraufnahme und Futteraufwand

Die Ermittlung der mittleren täglichen Futteraufnahme der Einzeltiere erfolgte rechnerisch (Tab. 12), da aufgrund der Gruppenhaltung von jeweils zwei Ferkeln je Flatdeck nur die mittlere tägliche Futteraufnahme der jeweiligen Tiergruppe ermittelt werden konnte. Für die mittlere Futteraufnahme konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p=0,491$). Futterreste wurden über die Rückwaage von Auffangblechen unter den Automaten zur Berechnung der Futteraufnahme und des Futtermittelsverlustes ermittelt. Zur Berechnung der tatsächlichen Futteraufnahme einer Zweiergruppe wurde der Wert des Futtermittelsverlustes von dem Futtermittelverbrauch subtrahiert. Die Futtermittelsverluste waren über den gesamten Versuchszeitraum sehr gering und lagen in den Fütterungsgruppen im Durchschnitt zwischen 0,16 und 0,25 kg/Woche. Da eine Fütterungsgruppe auf zwei Flatdecks mit jeweils zwei Ferkeln verteilt war, erfolgte anschließend die Berechnung des arithmetischen Mittels aus beiden Einzelwerten. Der Futteraufwand wurde aus der wöchentlichen Futteraufnahme und der wöchentlichen Lebendmassezunahme ermittelt (Tab. 12). Für den Futteraufwand konnten keine fütterungsbedingte Einflüsse ermittelt werden ($p=0,994$).

Tabelle 12: Mittlere Lebendmassen und -zunahmen (kg), mittlere tägliche Futtermittelaufnahme (kg/Tier) und mittlerer Futtermittelaufwand der Ferkel nach 28tägiger Versuchsperiode, Mittelwert \pm Standardabweichung

| | Fütterungsgruppen | | | |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | A (n ¹ = 6) | B (n = 6) | C (n = 6) | D (n = 6) |
| Versuchsbeginn (LM in kg) | 8,22 (\pm 0,78) | 8,34 (\pm 1,29) | 8,19 (\pm 0,82) | 8,30 (\pm 0,96) |
| Versuchsende (LM in kg) | 16,7 (\pm 1,51) | 16,5 (\pm 1,83) | 16,2 (\pm 1,09) | 17,4 (\pm 1,30) |
| Tageszunahmen (LM in kg) | 0,30 (\pm 0,04) | 0,29 (\pm 0,03) | 0,29 (\pm 0,03) | 0,33 (\pm 0,03) |
| Futtermittelaufnahme (kg/Tier/Tag) | 0,59 (\pm 0,10) | 0,57 (\pm 0,08) | 0,57 (\pm 0,06) | 0,64 (\pm 0,10) |
| Futtermittelaufwand | 1,96 (\pm 0,25) | 1,96 (\pm 0,28) | 1,98 (\pm 0,15) | 1,95 (\pm 0,24) |

¹Anzahl gewerteter Fälle = 6 Fütterungseinheiten mit jeweils 2 Ferkeln

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA[®] F 0,04%, C = FRESTA[®] F 0,2%, D = Bockshornkleesamen 0,15%

4.2.2. Hämatologische und immunologische Parameter

4.2.2.1. Hämatologie

Bei den hämatologischen Parametern konnten keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Hämatologische Parameter und Differenzialblutbild der Ferkel am Ende des Versuchszeitraums, Mittelwert \pm Standardabweichung

| | | Fütterungsgruppen | | | |
|---------------------------------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | A (n ¹ = 11) | B (n = 10) | C (n = 10) | D (n = 10) |
| Erythrozyten | (T/l) | 5,40 (\pm 0,47) | 5,20 (\pm 0,43) | 5,10 (\pm 0,24) | 5,60 (\pm 0,46) |
| Hämatokrit | (l/l) | 0,30 (\pm 0,02) | 0,30 (\pm 0,02) | 0,30 (\pm 0,03) | 0,30 (\pm 0,03) |
| Hämoglobin | (g/l) | 82,6 (\pm 6,23) | 84,3 (\pm 6,02) | 84,4 (\pm 6,00) | 90,0 (\pm 7,50) |
| Leukozyten | (G/l) | 14,3 (\pm 4,21) | 15,1 (\pm 3,79) | 14,2 (\pm 3,20) | 18,0 (\pm 2,36) |
| Lymphozyten | (G/l) | 7,70 (\pm 2,81) | 7,70 (\pm 3,03) | 7,50 (\pm 2,64) | 9,60 (\pm 2,10) |
| Monozyten | (G/l) | 0,60 (\pm 0,22) | 0,70 (\pm 0,30) | 0,70 (\pm 0,26) | 0,90 (\pm 0,14) |
| Eosinophile Granulozyten | (G/l) | 0,30 (\pm 0,08) | 0,30 (\pm 0,16) | 0,30 (\pm 0,05) | 0,40 (\pm 0,15) |
| Thrombozyten | (G/l) | 155 (\pm 72,5) | 197 (\pm 75,7) | 217 (\pm 5,40) | 193 (\pm 2,6) |

¹Anzahl der gewerteten Fälle,

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA[®] F 0,04%, C = FRESTA[®] F 0,2%, D = Bockshornkleesamen 0,15%

4.2.2.2. Phänotypisierung der peripheren Blutleukozyten

Bei der Analyse der exprimierten Oberflächenmarker zeigten sich ausgeprägte tierindividuelle Unterschiede, die zu einer großen Spannweite der Ergebnisse führten (Tab. 14). Ein Großteil der Lymphozyten war für die Oberflächenmarker CD2, CD5, MHCII und CD45RC positiv.

CD2-Expression

Bei dem größten Teil der Blutzellen konnte eine CD2-Expression nachgewiesen werden (NK-Zellen, $\alpha\beta$ -T-Zellen, $CD2^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen). Die Zellpopulation der CD2-negativen Blutzellen (B-Zellen, $CD2^-$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen) war in der Versuchsgruppe D tendenziell höher als in den anderen Versuchsgruppen ($p = 0,064$) und zeigte eine Koexpression von CD5. Anteile der CD2-positiven Blutzellen wiesen ebenfalls eine Koexpression von CD5 ($\alpha\beta$ -T-Zellen, $CD2^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen) und CD25 (aktivierte T-Helfer-Zellen) auf. Daneben konnten keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen hinsichtlich der Expression von CD2 festgestellt werden.

CD4-Expression

Für die Expression von CD4 ($\alpha\beta$ -T-Zellen, naive T-Helfer-Zellen) konnten keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen festgestellt werden.

CD5-Expression

Die CD5-Expression war bei einem Großteil der Lymphozyten positiv ($\alpha\beta$ -T-Zellen, $CD2^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen, $CD2^-$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen und B-Zellen). Zusätzlich zeigte ein Teil dieser Zellen eine Koexpression von CD2 ($\alpha\beta$ -T-Zellen, $CD2^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen) und MHCII (B-Zellen, ggf. T-Zellen [ruhende $CD8^+$ -Zellen]). Für die Expression von CD5 konnten keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen festgestellt werden.

CD8-Expression

Die Expression von $CD8\alpha$ ($CD8\alpha^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität) zeigte keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. Ein geringer Teil der $CD8\alpha$ -exprimierenden Zellen wies eine Koexpression von TCR1 ($\gamma\delta$ -T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität) auf. Für die Expression von $CD8\beta$ (zytotoxische T-Zellen) konnten ebenfalls keine Gruppenunterschiede beobachtet werden. Der relative Anteil $CD8\alpha$ -exprimierender Zellen war insgesamt etwas höher als der der $CD8\beta$ -exprimierenden Zellen. Bei einem kleinen Anteil $CD8\beta$ -positiver Blutzellen konnte eine Koexpression von CD4 nachgewiesen werden.

CD14-Expression

In der Gesamtbetrachtung der Verteilung der markierten Blutzellen war der relative Anteil CD14-positiver Zellen (Monozyten) gering. Die Kontrollgruppe zeigte einen tendenziell höheren Anteil dieser Zellpopulation als die Versuchsgruppen ($p = 0,051$).

CD21-Expression

Für die CD21-positiven Zellen (B-Lymphozyten), die gleichzeitig für die Expression von SWC3 negativ waren, konnten keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen festgestellt werden. Ihr Anteil an der gesamten Leukozytenpopulation lag bei ungefähr 20%.

CD25-Expression

Ein kleiner Anteil der CD4-positiven Zellen ($\alpha\beta$ -T-Zellen, naive T-Helfer-Zellen) wies eine gleichzeitige Expression von CD25 (aktivierte T-Helfer-Zellen) auf. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen beobachtet.

MHCII-Expression

Die MHCII-Expression (antigenpräsentierende Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, ggf. T-Zellen) war bei einem Großteil der analysierten Blutzellen positiv. Anteile dieser Zellpopulation wiesen eine Koexpression von CD5 (B-Zellen, ggf. T-Zellen) auf. Bei der Zellpopulation, die für die Expression von CD5 negativ war (antigenpräsentierende Zellen), zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant geringer Anteil dieser Zellen in der Versuchsgruppe D ($p < 0,05$).

CD45RC-Expression

Die Expression von CD45RC war bei durchschnittlich 80,7% der Blutzellen positiv. Dieser Marker wird in aktivierten T-Helfer-Zellen herunterreguliert, es ist aber auch eine Expression auf NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen möglich. Zwischen den Fütterungsgruppen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

TCR1- Expression

Für die Expression von TCR 1 zeigten sich fütterungsbedingte Unterschiede. Bei den TCR1-positiven Lymphozyten ($\gamma\delta$ -T-Zellen), die keine Koexpression von CD8 ($\gamma\delta$ -T-Zellen) aufwiesen, zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung des Anteils positiver Zellen in der Versuchsgruppe D ($p < 0,05$). Nur ein kleiner Teil der TCR1-positiven Zellen zeigte eine Koexpression von CD8 α ($\gamma\delta$ -T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität).

Tabelle 14: Verteilung der Immunzellen im Blut der Ferkel, Angaben in Prozent (%) der durch Oberflächendifferenzierungsmarker detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum)

| | Fütterungsgruppen | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | A (n ¹ = 11) | B (n = 10) | C (n = 10) | D (n = 10) |
| CD2⁺CD5⁺ | 39,9 (33,6-49,6) | 41,5 (32,6-44,8) | 39,9 (30,6-46,3) | 41,5 (27,1-47,2) |
| CD2⁺CD5⁻ | 22,6 (10,2-31,3) | 23,6 (15,6-31,3) | 17,4 (8,56-28,0) | 18,0 (9,42-35,7) |
| CD2⁻CD5⁺ | 6,70 (2,49-34,3) | 7,20 (2,30-16,0) | 10,1 (6,17-27,4) | 12,1 (2,96-23,9) |
| CD4⁺CD8β⁺ | 2,20 (0,89-4,30) | 1,90 (0,64-6,97) | 3,70 (1,34-6,23) | 3,10 (2,07-5,17) |
| CD4⁺CD8β⁻ | 16,3 (8,60-28,4) | 17,7 (9,11-28,1) | 14,1 (9,03-24,3) | 13,4 (5,45-23,9) |
| CD4⁻CD8β⁺ | 11,3 (10,0-24,3) | 10,8 (6,25-18,4) | 11,2 (7,54-18,7) | 13,9 (9,17-24,0) |
| CD8α⁺TCR1⁺ | 3,40 (1,93-7,60) | 3,30 (1,73-8,72) | 3,60 (1,96-6,88) | 4,10 (1,84-7,13) |

| | Fütterungsgruppen | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | A (n ¹ = 11) | B (n = 10) | C (n = 10) | D (n = 10) |
| CD8α ⁺ TCR1 ⁻ | 24,8 (20,7-39,9) | 27,5 (17,0-47,5) | 21,9 (16,0-44,5) | 26,2 (18,3-43,2) |
| CD8α ⁻ TCR1 ⁺ | 9,40 ^a (3,92-20,7) | 8,40 ^{ab} (4,56-16,2) | 13,5 ^{ab} (9,38-25,9) | 17,2 ^b (7,28-35,0) |
| CD14 ⁺ | 11,3 (4,16-23,4) | 9,00 (4,41-15,2) | 7,80 (4,17-20,6) | 6,30 (3,13-17,2) |
| CD21 ⁺ SWC3 ⁻ | 16,8 (8,78-22,9) | 19,2 (13,0-24,3) | 20,1 (11,3-30,0) | 17,3 (8,51-26,6) |
| CD25 ⁺ CD4 ⁺ | 3,10 (0,83-4,88) | 2,80 (1,24-3,45) | 3,20 (1,49-5,72) | 2,20 (1,40-4,64) |
| MHCII ⁺ CD5 ⁺ | 17,0 (10,1-21,3) | 16,0 (6,90-28,0) | 17,2 (10,5-22,2) | 15,1 (6,92-32,1) |
| MHCII ⁺ CD5 ⁻ | 30,5 ^a (11,2-43,4) | 25,3 ^{ab} (17,7-37,6) | 23,8 ^{ab} (16,6-35,5) | 20,9 ^b (16,4-36,0) |
| CD45RC ⁺ | 77,9 (64,6-90,5) | 80,6 (74,0-85,4) | 80,9 (70,8-89,5) | 83,5 (74,1-88,7) |
| CD45RC ⁻ | 21,7 (9,44-35,4) | 19,2 (14,5-25,9) | 18,9 (10,4-29,0) | 16,2 (11,1-25,7) |

¹Anzahl der gewerteten Fälle

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA[®] F 0,04%, C = FRESTA[®] F 0,2%, D = Bockshornkleesamen 0,15%
 Mittelwerte mit unterschiedlichen Superskripten in einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05)

4.2.2.3. Phänotypisierung der intraepithelialen Leukozyten des proximalen Jejunums

Bei der Analyse der exprimierten Oberflächenmarker der intraepithelialen Leukozyten des Darms zeigten sich ausgeprägte tierindividuelle Unterschiede, die zu einer großen Spannweite der Ergebnisse führten. Ein Großteil der Leukozyten exprimierte CD2, CD5, CD45, CD8α, CD16 und MHCII (Tab. 15).

CD2-Expression

Bei durchschnittlich 48,1% der analysierten Leukozyten konnte eine CD2-Expression (NK Zellen, αβ-T-Zellen, CD2⁺-γδ-T-Zellen) nachgewiesen werden, wobei durchschnittlich 55,7% dieser Zellen eine Koexpression von CD5 (αβ-T-Zellen (total), CD2⁺-γδ-T-Zellen) zeigten. Der Anteil CD2-positiver Zellen war im Darm höher als im Blut. Der relative Anteil der Verteilung dieser Zellpopulationen im Darm zeigte aber keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen.

CD4-Expression

Der relative Anteil CD4-exprimierender Zellen (αβ-T-Zellen, naive T-Helfer-Zellen) lag unter 4,5%. Die Expression von CD4 auf Darmlymphozyten war geringer als die der Blutlymphozyten. Es konnten keine gruppenabhängigen Unterschiede festgestellt werden.

CD5-Expression

Bei durchschnittlich 55,7% der CD5-positiven Zellen (αβ-T-Zellen, CD2⁺-γδ-T-Zellen, CD2⁻-γδ-T-Zellen) konnte eine Koexpression von CD2 (αβ-T-Zellen (total), CD2⁺-γδ-T-Zellen) und

MHCII (B-Zellen, ggf. T-Zellen) beobachtet werden. Der Anteil CD5-exprimierender Lymphozyten war im Darm höher als im Blut, insbesondere in Verbindung mit einer Expression von MHCII.

CD8-Expression

Ein Nachweis der Expression des Oberflächenmarkers CD8 (CD8 α^+ - $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität) konnte ebenfalls auf vielen Zellen erbracht werden. Der Anteil CD8 α -exprimierender Zellen (CD8 α^+ - $\gamma\delta$ -T-Zellen zytotoxische T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität) war höher als der CD8 β -exprimierender Zellen (zytotoxische T-Zellen). Lediglich durchschnittlich 0,43% der CD8-positiven Zellen wiesen eine Koexpression von dem Oberflächenmarker CD4 auf, 13,3% der CD8-positiven Zellen zeigten eine Koexpression von TCR1 ($\gamma\delta$ -T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität). Die Expression von CD8 auf Darmlymphozyten war höher als die auf Blutlymphozyten, insbesondere für CD8 α . Es konnten für die Expression von CD8 keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen nachgewiesen werden.

CD16-Expression

Zwischen 30-35% der analysierten Zellen zeigten eine Expression von CD16 (NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen). Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen konnten nicht festgestellt werden.

MHCII-Expression

Durchschnittlich 40,2% der MHCII-exprimierenden Zellen (antigenpräsentierende Zellen, B-Zellen, ggf. T-Zellen) waren positiv für die Expression von CD5 (B-Zellen, ggf. T-Zellen). Bei den MHCII $^+$ CD5 $^+$ -Zellen zeigte sich zur Kontrollgruppe ein tendenziell geringerer Anteil in der Versuchsgruppe D. Der Anteil der MHCII $^+$ CD5 $^+$ Zellfraktion lag im Darm höher als im Blut.

CD45-Expression

54,8-60,6% der isolierten Zellen waren CD45-positiv (porzine Leukozyten, gesamt), während 19,4-28,4% keine Expression von CD45 (vmtl. Epithelzellen) aufwiesen. Die relative Verteilung der Zellen zwischen den Fütterungsgruppen war ähnlich.

TCR1-Expression

Im Vergleich zum Expressionsmuster der Blutlymphozyten zeigte sich im Darm ein relativ größerer Anteil TCR1-positiver Zellen, die gleichzeitig eine Koexpression von CD8 α aufwiesen ($\gamma\delta$ -T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität). Für die Expression von TCR1 konnten keine fütterungsbedingten Unterschiede festgestellt werden.

Tabelle 15: Verteilung der intraepithelialen Leukozyten im proximalen Jejunum der Ferkel, Angaben in Prozent (%) der durch Oberflächendifferenzierungsmarker detektierten Leukozyten, Median (Minimum-Maximum)

| | Fütterungsgruppen | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | A (n ¹ = 11) | B (n = 10) | C (n = 10) | D (n = 10) |
| CD2⁺CD5⁺ | 57,3 (40,5-75,5) | 59,0 (40,5-85,6) | 54,4 (31,8-70,2) | 52,1 (21,7-67,9) |
| CD2⁺CD5⁻ | 34,6 (22,4-58,2) | 40,0 (13,3-55,0) | 43,3 (27,4-76,1) | 43,9 (30,2-73,7) |
| CD2⁻CD5⁺ | 0,60 (0,29-1,86) | 0,50 (0,21-0,74) | 0,80 (0,20-2,64) | 0,80 (0,24-2,63) |
| CD4⁺CD8^β⁺ | 0,60 (0,33-0,95) | 0,30 (0,17-0,93) | 0,40 (0,15-1,01) | 0,40 (0,26-1,43) |
| CD4⁺CD8^β⁻ | 3,30 (1,83-7,95) | 2,40 (1,05-4,87) | 2,10 (1,25-4,28) | 3,00 (1,55-6,72) |
| CD4⁻CD8^β⁺ | 34,1 (26,3-41,2) | 33,5 (15,6-50,4) | 33,8 (21,6-47,0) | 25,9 (14,7-40,3) |
| CD8α⁺TCR1⁺ | 12,1 (8,96-27,1) | 14,0 (10,7-21,9) | 14,8 (10,1-39,7) | 12,4 (9,25-24,6) |
| CD8α⁺TCR1⁻ | 78,4 (66,9-84,8) | 79,0 (56,4-85,9) | 78,6 (50,9-86,6) | 80,7 (25,9-86,9) |
| CD8α⁻TCR1⁺ | 3,10 (1,21-6,99) | 2,10 (0,76-16,9) | 2,30 (0,22-9,38) | 3,10 (0,45-43,1) |
| CD16⁺SWC3⁺ | 2,10 (0,73-5,13) | 1,40 (0,72-5,96) | 1,30 (0,53-2,96) | 1,30 (0,78-1,94) |
| CD16⁺SWC3⁻ | 34,5 (23,0-42,5) | 28,6 (16,9-43,5) | 31,9 (24,9-54,4) | 32,6 (23,7-42,3) |
| MHCII⁺CD5⁺ | 46,4 (28,1-65,4) | 49,8 (14,3-81,6) | 30,1 (12,4-54,9) | 34,5 (13,1-59,9) |
| MHCII⁺CD5⁻ | 22,3 (14,9-29,3) | 24,3 (2,74-42,6) | 13,4 (6,72-33,6) | 22,0 (9,09-46,7) |
| CD45⁺ | 60,6 (32,7-77,7) | 54,8 (32,4-83,6) | 55,3 (28,3-85,3) | 59,6 (8,16-70,8) |
| CD45⁻ | 28,4 (12,7-54,9) | 19,4 (9,77-55,9) | 25,8 (7,55-49,8) | 21,4 (15,6-60,4) |

¹Anzahl der gewerteten Fälle

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA[®] F 0,04%, C = FRESTA[®] F 0,2%, D = Bockshornkleesamen 0,15%

4.2.2.4. Proliferation peripherer Blutlymphozyten

Die Stimulation der peripheren Lymphozyten des Blutes mittels PWM, Con A und PHA-M ergab keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. Es war zu beobachten, dass die Stimulierbarkeit der Zellen mittels PWM weniger ausgeprägt war im Vergleich zu Con A und PHA-M. Auffällig waren die deutlichen tierindividuellen Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Relativer Anteil (%) der proliferierten Lymphozyten im Blut der Ferkel nach Stimulation mit PWM, Con A und PHA-M, Median (Minimum-Maximum)

| Fütterungsgruppen | | | | |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | A (n ¹ = 11) | B (n = 10) | C (n = 10) | D (n = 10) |
| PWM | 31,6 (16,3-70,2) | 34,8 (19,4-63,8) | 46,1 (11,9-68,1) | 37,8 (12,8-63,1) |
| Con A | 72,2 (58,6-86,3) | 65,1 (41,3-88,4) | 64,5 (48,6-79,5) | 59,1 (48,8-79,6) |
| PHA-M | 67,2 (39,0-79,2) | 61,2 (50,5-87,5) | 65,4 (42,2-76,9) | 60,0 (43,5-76,7) |

¹Anzahl der gewerteten Fälle

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA[®] F 0,04%, C = FRESTA[®] F 0,2%, D = Bockshornklee Samen 0,15%

4.2.2.5. Phagozytoseaktivität der peripheren Granulozyten und Monozyten

Für die phagozytierenden Granulozyten und Monozyten im Blut konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Daten zeigten hohe tierindividuelle Schwankungen (Abb. 21).

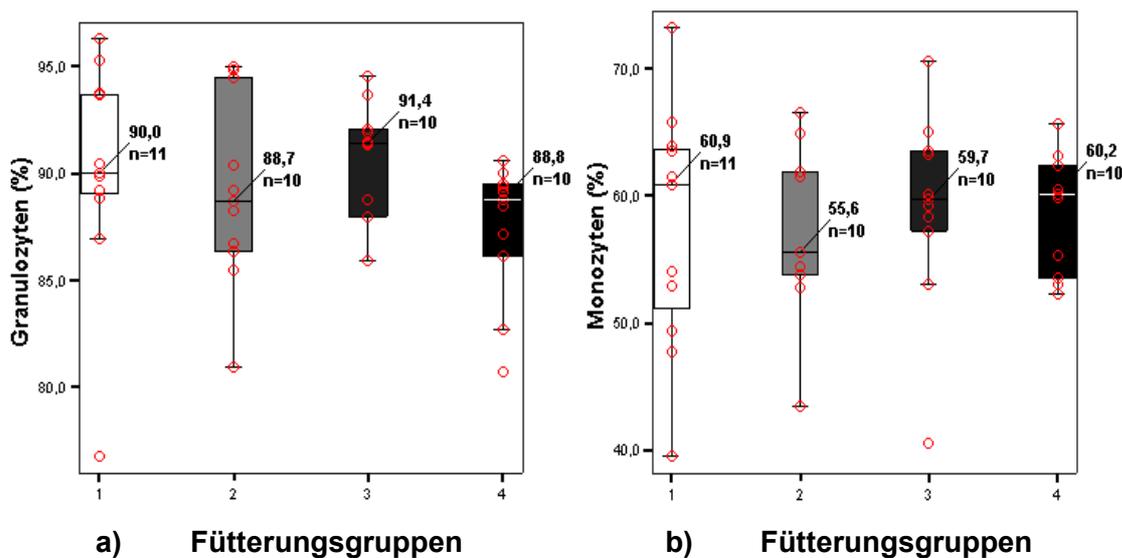


Abbildung 21: Prozentualer Anteil (%) der phagozytierenden Granulozyten (a) und Monozyten (b) im Blut der Ferkel

Dargestellt sind der Median sowie die Minimum- und Maximumwerte, o = Ausreißer, n = Anzahl der gewerteten Fälle, 1 = Kontrollgruppe A, 2 = Versuchsgruppe B (FRESTA[®] F 0,04%), 3 = Versuchsgruppe C (FRESTA[®] F 0,2%), 4 = Versuchsgruppe D (Bockshornklee Samen 0,15%)

Die Fluoreszenzintensität gibt als dimensionslose Größe das Maß für die Menge aufgenommener Bakterien pro Zelle an. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (Abb. 22).

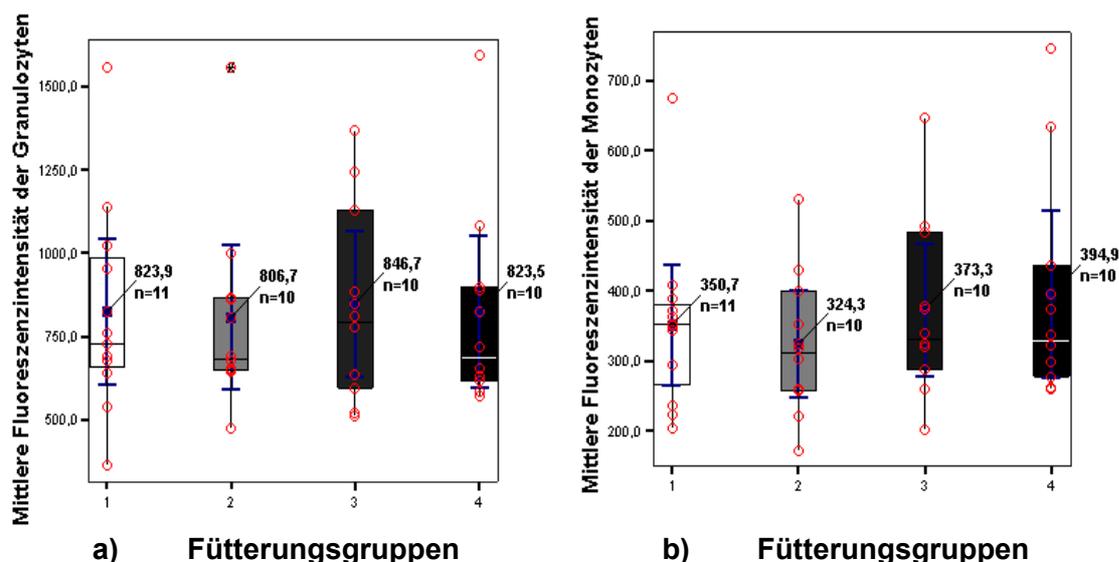


Abbildung 22: Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten (a) und Monozyten (b) im Blut der Ferkel

Dargestellt sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken zeigen die 95%-Konfidenzintervalle an, o = Ausreißer, * = Extremwerte; 1 = Kontrollgruppe A, 2 = Versuchsgruppe B (FRESTA® F 0,04%), 3 = Versuchsgruppe C (FRESTA® F 0,2%), 4 = Versuchsgruppe D (Bockshornkleeisamen 0,15%)

4.2.2.6. Konzentration von Haptoglobin im Serum der Ferkel

Bei der Auswertung der Daten zeigten sich durch die großen tierindividuellen Unterschiede hohe Standardabweichungen. Ein Gruppenunterschied der Konzentration von Haptoglobin im Serum der Ferkel konnte nicht beobachtet werden (Tab. 17).

Tabelle 17: Mittlere Haptoglobinkonzentration im Serum (mg/ml) der Ferkel in den einzelnen Fütterungsgruppen, Mittelwert ± Standardabweichung

| | Fütterungsgruppen | | | |
|--------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | A (n ¹ = 11) | B (n = 10) | C (n = 10) | D (n = 10) |
| Haptoglobin | 0,37 (± 0,353) | 0,39 (± 0,603) | 0,26 (± 0,202) | 0,31 (± 0,347) |

¹Anzahl der gewerteten Fälle

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA® F 0,04%, C = FRESTA® F 0,2%, D = Bockshornkleeisamen 0,15%

4.2.2.7. Konzentration spezifischer Antikörper gegen Salmonella Typhimurium

Für den Nachweis von spezifischem Immunglobulin G gegen Salmonellen mittels SALMOTYPE® Pig Screen ELISA konnten nur fünf Tiere als positiv bewertet werden (Tab. 18). In der Kontrollgruppe zeigte kein Tier positive IgG-Titerwerte. Während in der Versuchsgruppe B ein Tier positiv war, lag der Anteil positiver Tiere in den Versuchsgruppen C und D bei jeweils zwei Tieren (Abb. 23).

Tabelle 18: Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Salmonellen im Serum der Schweine mittels ELISA (SALMOTYPE® Pig Screen, Labordiagnostik, Leipzig)

| Fütterungsgruppen | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | A | | B | | C | | D | |
| | ELISA/OD% | | | | | | | |
| Tier | a.vacc. | p.vacc. | a.vacc. | p.vacc. | a.vacc. | p.vacc. | a.vacc. | p.vacc. |
| 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 2 | 1 | 3 | 2 | 8 | 2 | 3 | 2 | 5 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 6 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 4 | 3 | 6 | 1 | 3 | 5 | 2 | 1 | 22 |
| 5 | 3 | 1 | 1 | 59 | 3 | 1 | 1 | 3 |
| 6 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 20 | 1 | 1 |
| 7 | 1 | 17 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 33 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 29 | 1 | 15 |
| 9 | 1 | 16 | 5 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | 1 | 3 | 1 | 10 | 1 | 1 | 2 | 15 |
| Mittelwert und SD | 1,5 (±0,78) | 4,8 (±5,70) | 1,6 (±1,16) | 9,0 (±16,1) | 1,9 (±1,30) | 6,3 (±9,34) | 1,3 (±0,46) | 9,9 (±10,4) |

Beurteilung: Proben mit OD%-Werten kleiner als 10 gelten als negativ, Proben mit OD%-Werten von 10- < 20 gelten als fraglich, Proben mit OD%-Werten ≥ 20 gelten als positiv

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA® F 0,04%, C = FRESTA® F 0,2%, D = Bockshornkleesamen 0,15%
SD = Standardabweichung, a.vacc. = ante vaccinationem, p.vacc. = post vaccinationem

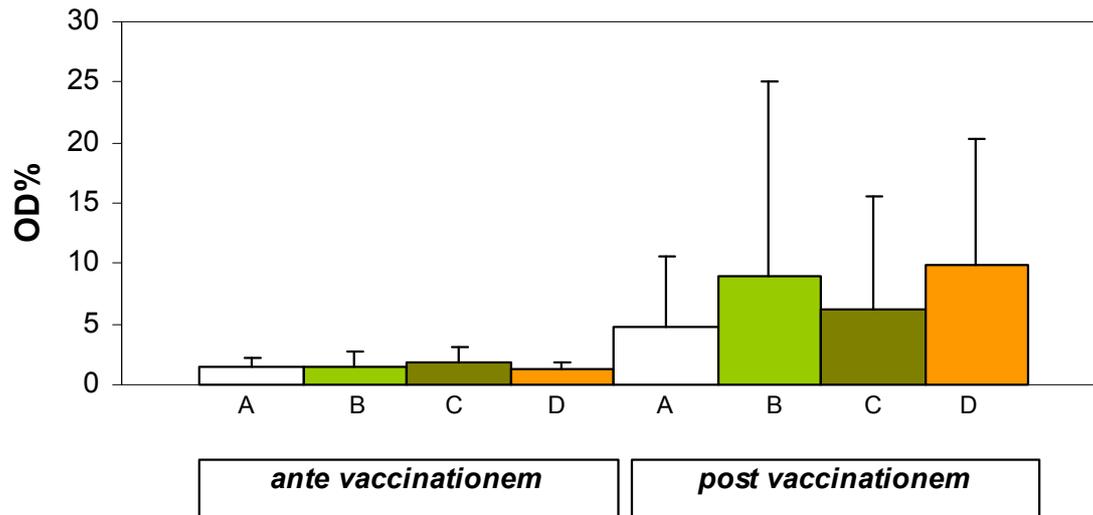


Abbildung 23: OD%-Werte von spezifischem Immunglobulin G im Serum der Ferkel (SALMOTYPE® Pig Screen ELISA), Mittelwerte ± Standardabweichungen

Legende: A=Kontrollgruppe, B=FRESTA® F 0,04%, C=FRESTA® F 0,2%,
D=Bockshornkleesamen 0,15%

Beurteilung der Ergebnisse: OD% Wert <10 = negativ
OD% Wert 10-20 = fraglich
OD% Wert > 20 = positiv

Der Nachweis von spezifischen Immunglobulin G mittels modifiziertem ELISA aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene der Freien Universität Berlin unter Verwendung des Phagentyps DT104 von *S. Typhimurium* fiel bezüglich einer Konzentrationsveränderung von Immunglobulin G im Serum ebenfalls negativ aus (Abb. 26).

Für die Serumkonzentration von spezifischem Immunglobulin M unter Verwendung des modifizierten ELISA mit *S. Typhimurium* DT104 konnte nach der Impfung in jeder Fütterungsgruppe eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Werten vor der Impfung festgestellt werden ($p < 0,05$) (Abb. 24 und 25). Fütterungsbedingte Unterschiede konnten nicht ermittelt werden.

Für die Serumkonzentration von spezifischem Immunglobulin A konnten keine Veränderungen zu den Konzentrationen dieser Immunglobuline vor Verabreichung des Impfstoffes nachgewiesen werden (Abb. 27). Ein fütterungsbedingter Einfluss konnte entsprechend nicht beobachtet werden.

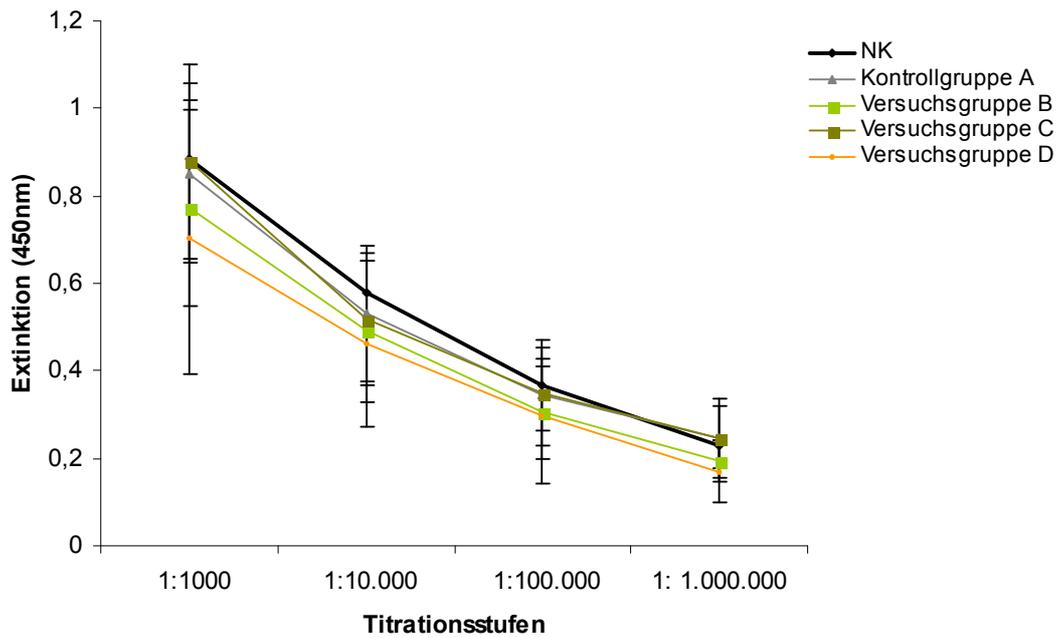


Abbildung 24: Salmonellen-spezifische IgM-Extinktionswerte im Serum der Ferkel vor Vakzination mit SALMOPORC[®], Mittelwerte und Standardabweichung
 Legende: NK=Negativkontrolle (Serum eines *S. Typhimurium*-negativen Schweins)
 Versuchsgruppe B= FRESTA[®] F 0,04%, Versuchsgruppe C= FRESTA[®] F 0,2%
 Versuchsgruppe D= Bockshornkleesamen 0,15%

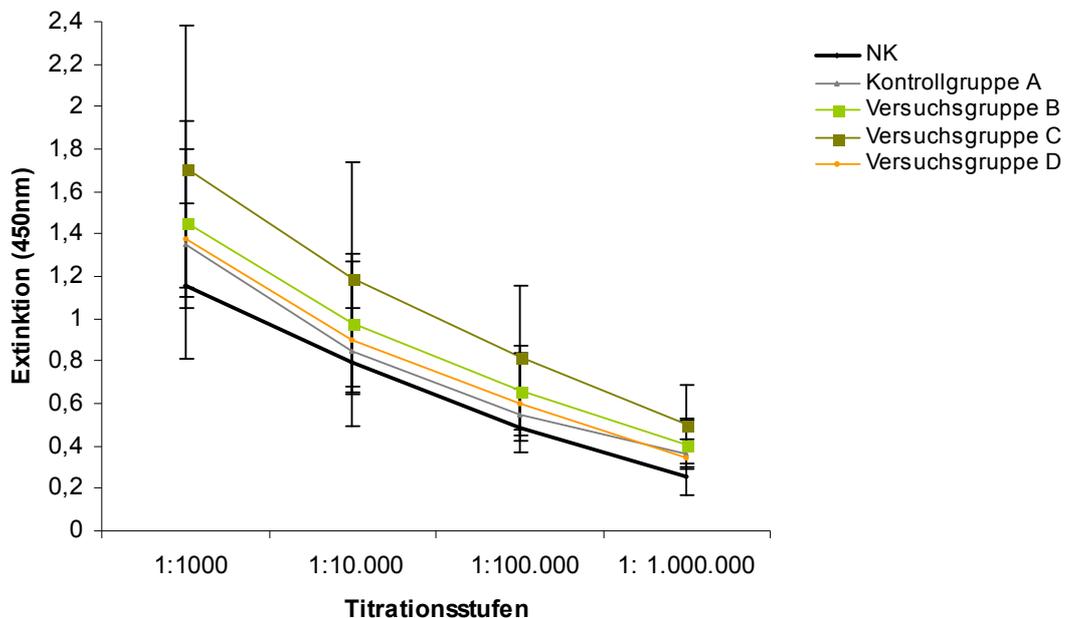


Abbildung 25: Salmonellen-spezifische IgM-Extinktionswerte im Serum der Ferkel nach Vakzination mit SALMOPORC[®], Mittelwerte und Standardabweichungen
 Legende: NK=Negativkontrolle (Serum eines *S. Typhimurium*-negativen Schweins)
 Versuchsgruppe B= FRESTA[®] F 0,04%, Versuchsgruppe C= FRESTA[®] F 0,2%
 Versuchsgruppe D= Bockshornkleesamen 0,15%

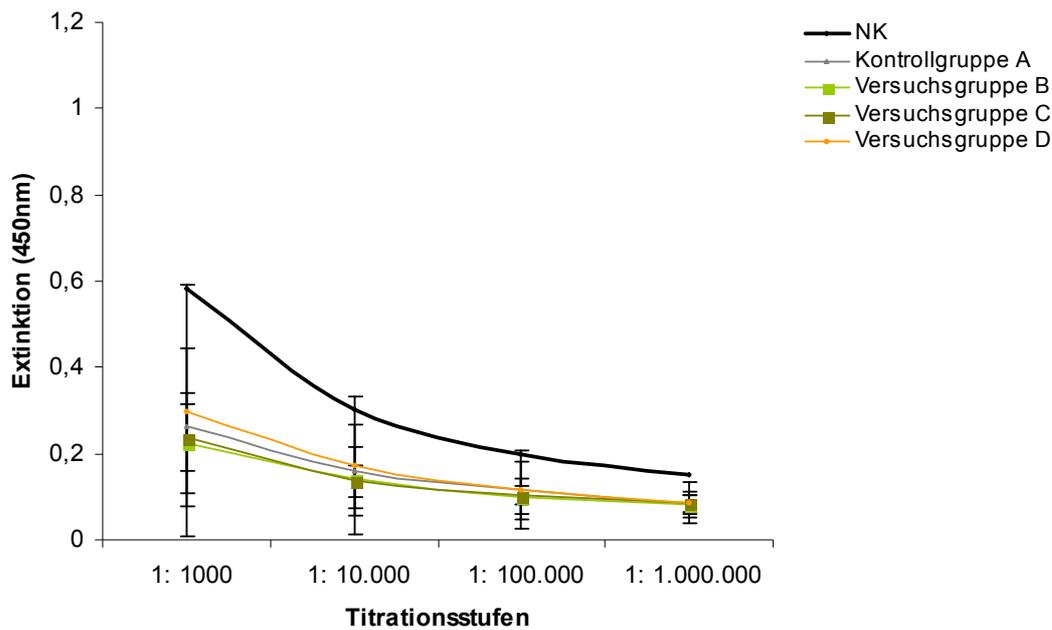


Abbildung 26: Salmonellen-spezifische IgG-Extinktionswerte im Serum der Ferkel nach Vakzination mit SALMOPORC[®], Mittelwerte und Standardabweichungen

Legende: NK=Negativkontrolle (Serum eines S. Typhimurium-negativen Schweins)
 Versuchsgruppe B= FRESTA[®] F 0,04%, Versuchsgruppe C= FRESTA[®] F 0,2%
 Versuchsgruppe D= Bockshornkleesamen 0,15%

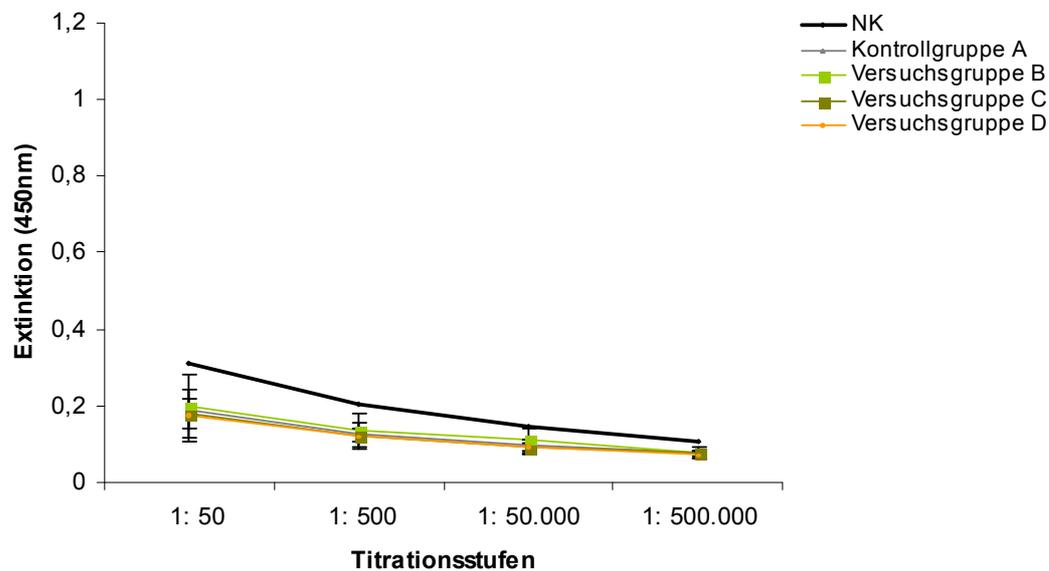


Abbildung 27: Salmonellen-spezifische IgA-Extinktionswerte im Serum der Ferkel nach Vakzination mit SALMOPORC[®], Mittelwerte und Standardabweichungen

Legende: NK=Negativkontrolle (Serum eines S. Typhimurium-negativen Schweins)
 Versuchsgruppe B= FRESTA[®] F 0,04%, Versuchsgruppe C= FRESTA[®] F 0,2%
 Versuchsgruppe D= Bockshornkleesamen 0,15%

4.2.3. Verdauungsphysiologische Parameter

4.2.3.1. pH-Werte der Digesta

Zwischen den Fütterungsgruppen traten Unterschiede der pH-Werte in der Digesta der einzelnen Darmabschnitte auf. Die höchsten pH-Werte wurden im Ileum ermittelt, wobei sich hier allerdings aufgrund der geringen Chymusmengen die geringste Probenanzahl ergab. Zum Zeitpunkt der Probenahme konnten bei einigen Tieren nicht aus allen Darmabschnitten Digestaprobe genommen werden, da sich teilweise nur wenig bzw. keine Digesta in den Darmabschnitten befand. Daher ergaben sich unterschiedliche Probenzahlen. Dies galt besonders für das Duodenum, das distale Jejunum und das Ileum (Tab. 19).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte im distalen Jejunum der Versuchsgruppe D (p= 0,002) und im Ileum in den Versuchsgruppen B (p= 0,048) und C (p= 0,029) eine signifikante Abnahme der pH-Werte der Digesta beobachtet werden. Ebenfalls zeigte sich im Zäkum eine signifikante Abnahme der pH-Werte der Digesta in den Versuchsgruppen C (p= 0,014) und D (p= 0,002) im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Für die Versuchsgruppe D konnte auch im Kolon eine Abnahme des pH-Wertes der Digesta im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt werden (p= 0,010).

Die Ergebnisse der Ermittlung der pH-Werte in der Digesta der Ferkel sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: pH-Werte der Digesta in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts der Ferkel, Mittelwert ± Standardabweichung

| | Fütterungsgruppen | | | | | | | |
|------------------|--------------------------|----------------|---------------------------|----|---------------------------|----|---------------------------|----|
| | A | n ¹ | B | n | C | n | D | n |
| Duodenum | 5,6 (±0,87) | 10 | 5,6 (±0,95) | 8 | 6,2 (±0,85) | 9 | 5,3 (±0,47) | 8 |
| Jejunum 1 | 6,1 (±0,61) | 11 | 5,7 (±0,48) | 10 | 5,7 (±0,63) | 9 | 5,4 (±0,52) | 10 |
| Jejunum 2 | 6,9 ^a (±0,61) | 7 | 6,4 (±0,19) | 10 | 6,3 (±0,40) | 5 | 5,3 ^b (±0,45) | 3 |
| Ileum | 7,8 ^a (±0,22) | 3 | 6,7 ^b (±0,58) | 5 | 6,6 ^b (±0,42) | 5 | 6,8 ^{ab} (±0,61) | 5 |
| Zäkum | 5,7 ^a (±0,37) | 11 | 5,5 ^{ab} (±0,14) | 10 | 5,3 ^b (±0,13) | 10 | 5,3 ^b (±0,24) | 10 |
| Kolon | 6,0 ^a (±0,23) | 11 | 5,8 ^{ab} (±0,33) | 10 | 5,7 ^{ab} (±0,34) | 10 | 5,5 ^b (±0,36) | 10 |
| Kot | 6,5 (±0,47) | 11 | 6,6 (±0,46) | 10 | 6,5 (±0,37) | 10 | 6,3 (±0,37) | 10 |

¹Anzahl der gewerteten Fälle

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA[®] F 0,04%, C = FRESTA[®] F 0,2%, D = Bockshornkleesamen 0,15%
 Mittelwerte mit unterschiedlichen Superskripten in einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p< 0,05),
 Jejunum 1 = proximales Jejunum, Jejunum 2 = distales Jejunum

4.2.3.2. Trockensubstanzgehalt der Digesta

Für den Trockensubstanzgehalt der Digesta konnten keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen ermittelt werden. Aufgrund der Verwendung von Poolproben ergab sich eine geringe Probenzahl. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Trockensubstanzgehalt (% der ursprünglichen Substanz) der Digesta vom distalen Jejunum, Ileum und Kot, Median (Minimum-Maximum)

| | Fütterungsgruppen | | | |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | A (n ¹ = 3) | B (n = 3) | C (n = 3) | D (n = 3) |
| Jejunum 2 | 15,4 (14,5-15,5) | 14,3 (13,3-15,1) | 12,5 (10,7-18,1) | 14,7 (10,7-18,1) |
| Ileum | 14,7 (11,4-19,8) | 14,6 (12,1-15,6) | 17,2 (15,8-18,1) | 15,7 (9,19-33,0) |
| Kot | 23,1 (21,5-23,5) | 25,3 (22,9-25,4) | 19,2 (13,4-35,9) | 23,3 (13,4-35,9) |

¹Anzahl der gewerteten Fälle

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA[®] F 0,04%, C = FRESTA[®] F 0,2%, D = Bockshornkleesamen 0,15%, Jejunum 2 = distales Jejunum

4.2.3.3. Scheinbare Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins

Die Bestimmung der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit von Rohprotein erfolgte wie bei der Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes aus Poolproben, daher war die Probenzahl entsprechend reduziert und es erfolgte keine weitere statistische Auswertung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Scheinbare Gesamtverdaulichkeit (%) des Rohproteins im Kot in den einzelnen Fütterungsgruppen, Mittelwert ± Standardabweichung

| | Fütterungsgruppen | | | |
|--|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | A (n ¹ = 2) | B (n = 3) | C (n = 3) | D (n = 2) |
| Scheinbare Gesamtverdaulichkeit (%) | 84,7 (±0,58) | 81,9 (±1,68) | 84,6 (±0,53) | 80,4 (±1,93) |

¹Anzahl der gewerteten Fälle

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA[®] F 0,04%, C = FRESTA[®] F 0,2%, D = Bockshornkleesamen 0,15%

Metaboliten des mikrobiellen Stoffwechsels

4.2.3.4. D- und L-Laktat

Bei der Ermittlung der intestinalen Konzentrationen von D- und L-Laktat zeigten sich sowohl in den Fütterungsgruppen als auch innerhalb der einzelnen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes starke tierindividuelle Schwankungen, die sich in hohen Standardabweichungen widerspiegeln (Tab. 22). Insgesamt konnten in fast allen Darmlokalisationen höhere Werte für L-Laktat als für D-Laktat festgestellt werden. Lediglich im Zäkum zeigten sich annähernd gleiche Konzentrationen der beiden Isomere in der Digesta. In der Versuchsgruppe D zeigte sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe A in mehreren Lokalisationen des Gastrointestinaltraktes eine tendenzielle Erhöhung der Laktatkonzentration in der Digesta. Während im Duodenum ein Anstieg der D-Laktat-Konzentration nachgewiesen werden konnte (p=0,329), zeigten sich im Bereich des distalen Jejunums erhöhte Konzentrationen beider Isomere (p=0,211 und 0,093) und im Ileum erhöhte Werte von L-Laktat (p=0,173). Für die übrigen Versuchsgruppen konnten keine Unterschiede der Laktatkonzentrationen der Digesta der einzelnen Abschnitte im Vergleich

zu der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Konzentrationen von D- und L-Laktat (mmol/kg Digesta (uS)) in der Digesta der jeweiligen Darmabschnitte der Ferkel, Mittelwert ± Standardabweichung

| | | Fütterungsgruppen | | | |
|-----------|----------------|-------------------------|--------------|--------------|---------------|
| | Laktat-Isomere | A (n ¹ = 11) | B (n = 10) | C (n = 10) | D (n = 10) |
| Duodenum | D - Laktat | 5,84 (±5,85) | 5,11 (±2,99) | 5,53 (±3,24) | 10,2 (±6,46) |
| | L - Laktat | 10,2 (±5,53) | 8,76 (±6,46) | 9,89 (±2,33) | 12,1 (±6,53) |
| Jejunum 1 | D - Laktat | 9,95 (±10,5) | 6,76 (±4,49) | 7,83 (±7,45) | 5,77 (±4,25) |
| | L - Laktat | 19,4 (±5,60) | 17,1 (±7,15) | 18,2 (±8,22) | 17,2 (±9,63) |
| Jejunum 2 | D - Laktat | 16,3 (±14,3) | 16,6 (±10,4) | 24,1 (±12,3) | 40,4 (±20,7) |
| | L - Laktat | 34,6 (±20,5) | 43,9 (±23,5) | 62,7 (±33,7) | 105,2 (±64,8) |
| Ileum | D - Laktat | 22,7 (±27,8) | 40,2 (±38,9) | 48,5 (±28,5) | 34,5 (±20,2) |
| | L - Laktat | 43,1 (±32,7) | 67,3 (±32,1) | 82,5 (±34,6) | 85,6 (±40,7) |
| Zäkum | D - Laktat | 4,81 (±14,6) | 5,57 (±5,04) | 7,35 (±7,58) | 7,31 (±12,6) |
| | L - Laktat | 4,91 (±4,42) | 4,53 (±4,61) | 7,21 (±7,74) | 7,73 (±12,9) |

¹Anzahl der gewerteten Fälle,

A = Kontrollgruppe, B = FRESTA[®] F 0,04%, C = FRESTA[®] F 0,2%, D = Bockshornkleesamen 0,15%, Jejunum 1 = proximales Jejunum, Jejunum 2 = distales Jejunum

4.2.3.5. Kurzkettige Fettsäuren

Die Gesamtkonzentration an kurzkettigen Fettsäuren zeigte in allen untersuchten Lokalisationen des Verdauungstraktes keine fütterungsbedingten Unterschiede. Im Dickdarm (Zäkum, Kolon) war die höchste Gesamtkonzentration an kurzkettigen Fettsäuren feststellbar (Abb. 28), wobei vom Verteilungsmuster die Konzentration von Azetat den größten Anteil an der Gesamtkonzentration der Fettsäuren ausmachte, gefolgt von Propionat, Butyrat und Valeriansäure (Tab. 23). Im Verhältnis zur Gesamtkonzentration der kurzkettigen Fettsäuren in den einzelnen Darmabschnitten wurde die höchste Azetatkonzentration im Ileum ermittelt. Im Ileum zeigte sich in der Versuchsgruppe C ein signifikanter Anstieg der Azetatkonzentration (p=0,004). Während in der Kontrollgruppe eine Azetatkonzentration von 2,51mmol/kg ermittelt wurde, zeigte die Versuchsgruppe C eine Konzentration von 10,6mmol/kg (Tab. 23). Außerdem zeigte sich in der Versuchsgruppe D im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen C und D in der Digesta des Ileums eine signifikante Senkung des relativen Anteils der Azetatkonzentration (p [A]=0,015, p [B]=0,044, p [C]=0,031) (Tab. 23). In den einzelnen Darmabschnitten konnte unabhängig von der Konzentration der Fettsäuren das gleiche Verteilungsmuster beobachtet werden. Lediglich für die Verteilung der Isomere von Butyrat und Valeriansäure konnten differierende Gehalte

in den untersuchten Darmabschnitten ermittelt werden. Die Konzentrationen von n-Butyrat waren im Dickdarm höher als im Dünndarm, während für i-Butyrat höhere Konzentrationen im Dünndarm gemessen wurden. Dabei konnte die höchste Konzentration im Jejunum ermittelt werden. Die Konzentration von n-Valeriansäure war im Bereich des Dickdarms höher als im Dünndarm. Außerdem konnte im Dickdarm quantitativ mehr n-Valeriansäure gemessen werden als i-Valeriansäure. Dagegen zeigte sich im Bereich des Dünndarms eine nahezu gleichmäßige Verteilung der beiden Isomere.

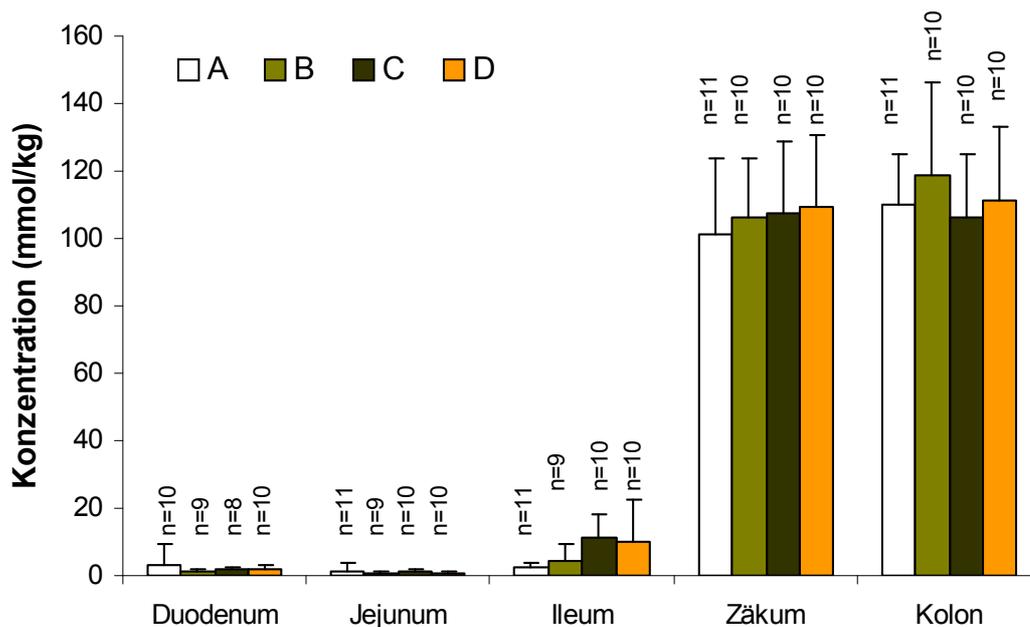


Abbildung 28: Gesamtkonzentration kurzkettiger Fettsäuren in den untersuchten Darmabschnitten, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = gewertete Fälle
 A=Kontrollgruppe, B=FRESTA® F 0,04%, C=FRESTA® F 0,2%, D=Bockshornkleesamen 0,15%,

Im Duodenum lag die Gesamtkonzentration an kurzkettigen Fettsäuren bei 2,3mmol/kg, davon entfielen 66,4% auf Azetat, 21,6% auf Propionat, 9,3% auf Butyrat und 2,6% auf Valeriansäure. Bei einer Gesamtkonzentration von 1,1mmol/kg im Jejunum lag der relative Anteil der einzelnen Fettsäuren für Azetat bei 69,7%, für Propionat bei 16,8%, für Butyrat bei 14,8% und für Valeriansäure bei 4,4%. Im Ileum lag der relative Anteil von Azetat bei 78,4%, für Propionat bei 9,8%, für Butyrat bei 9,6% und für Valeriansäure bei 3,1% bei einer Gesamtkonzentration von 7,4mmol/kg.

Bei einer Konzentration von 106mmol/kg im Zäkum entfielen 55,4% auf Azetat, 29,6% auf Propionat, 12,1% auf Butyrat und 2,9% auf Valeriansäure. Im Kolon lag die Verteilung der Fettsäuren bei einer Gesamtkonzentration von 112mmol/kg für Azetat bei 56,5%, für Propionat bei 26,8%, für Butyrat bei 12,9% und für Valeriansäure bei 3,7%.

Die Ergebnisse der Fettsäuremuster in den jeweiligen Darmabschnitten sind in den Tabellen 23 und 24 zusammengefasst.

Tabelle 23: Relativer Anteil (%) der kurzkettigen Fettsäuren an der Gesamtkonzentration (mmol/kg, Mittelwerte und Standardabweichungen) in der Digesta des Dünndarms in den Fütterungsgruppen

| | | Fütterungsgruppen | | | | | | | |
|------------------|------------------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------|----|---------------------------------|----|----------------------------------|----|
| | | A | n ¹ | B | n | C | n | D | n |
| Duodenum | mmol/kg | 3,49 (±2,25) | | 1,48 (±0,25) | | 1,90 (±0,19) | | 2,14 (±0,38) | |
| | Azetat | 75,1 (±10,94) | 10 | 71,7 (±8,19) | 9 | 67,8 (±6,30) | 8 | 72,9 (±11,9) | 10 |
| | Propionat | 16,9 (±7,48) | 10 | 19,7 (±6,54) | 9 | 22,1 (±4,43) | 8 | 17,0 (±8,62) | 10 |
| | i-Butyrat | 1,17 (±0,90) | 4 | 2,53 (±2,06) | 3 | 4,55 (±0,29) | 2 | 4,98 (±2,96) | 3 |
| | n-Butyrat | 5,54 (±3,19) | 8 | 5,13 (±2,56) | 8 | 6,33 (±3,75) | 8 | 6,92 (±3,68) | 8 |
| | i-Valeriansäure | 1,80 (±1,56) | 10 | 2,41 (±2,61) | 7 | 1,22 (±0,68) | 7 | 1,46 (±2,13) | 9 |
| | n-Valeriansäure | 1,98 (±1,35) | 7 | 1,69 (±0,77) | 7 | 1,64 (±0,94) | 8 | 2,54 (±1,87) | 7 |
| Jejunum 1 | mmol/kg | 1,56 (±0,84) | | 0,79 (±0,11) | | 1,12 (±0,21) | | 1,11 (±0,21) | |
| | Azetat | 77,2 (±9,26) | 10 | 77,1 (±9,51) | 9 | 73,3 (±7,50) | 10 | 82,4 (±12,7) | 10 |
| | Propionat | 12,7 (±8,45) | 10 | 12,6 (±6,33) | 9 | 16,3 (±4,55) | 10 | 9,48 (±7,06) | 8 |
| | i-Butyrat | 10,3 (±11,1) | 2 | 11,3 (±0,00) | 1 | - | 0 | 0,29 (±0,00) | 1 |
| | n-Butyrat | 3,10 (±1,24) | 6 | 3,66 (±2,15) | 7 | 7,13 (±6,37) | 10 | 3,89 (±2,73) | 5 |
| | i-Valeriansäure | 7,57 (±7,74) | 10 | 4,51 (±3,25) | 9 | 2,11 (±1,90) | 9 | 7,15 (±9,24) | 10 |
| | n-Valeriansäure | 1,41 (±0,96) | 7 | 1,90 (±1,08) | 8 | 1,96 (±1,15) | 7 | 1,46 (±1,11) | 6 |
| Ileum | mmol/kg | 2,68^a (±1,27) | | 4,52^a (±4,86) | | 11,4^b (±6,54) | | 9,94^{ab} (±12,6) | |
| | Azetat | 94,3^a (±2,88) | 10 | 92,3^a (±6,95) | 10 | 93,1^a (±4,94) | 10 | 76,3^b (±23,9) | 10 |
| | Propionat | 3,28 (±3,06) | 10 | 4,38 (±5,61) | 9 | 3,60 (±4,58) | 10 | 8,37 (±11,5) | 9 |
| | i-Butyrat | 0,37 (±0,37) | 1 | 0,36 (±0,13) | 9 | 0,42 (±0,52) | 2 | 2,23 (±1,92) | 3 |
| | n-Butyrat | 1,30 (±1,34) | 6 | 3,04 (±2,34) | 6 | 2,76 (±2,49) | 9 | 3,96 (±4,99) | 9 |
| | i-Valeriansäure | 1,54 (±0,93) | 10 | 1,66 (±1,56) | 10 | 0,73 (±0,63) | 10 | 11,5 (±21,1) | 10 |
| | n-Valeriansäure | 0,73 (±0,59) | 7 | 0,64 (±0,10) | 2 | 0,13 (±0,53) | 3 | 0,68 (±0,92) | 6 |

¹= Anzahl der gewerteten Fälle, Mittelwerte mit unterschiedlichen Superskripten in einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p<0,05), A= Kontrollgruppe, B= FRESTA[®] F 0,04%, C= FRESTA[®] F 0,2%, D= Bockshornkleesamen 0,15%, Jejunum 1 = proximales Jejunum

Tabelle 24: Relativer Anteil (%) der kurzkettigen Fettsäuren an der Gesamtkonzentration (mmol/kg, Mittelwerte und Standardabweichungen) in der Digesta des Dickdarms in den Fütterungsgruppen

| | | Fütterungsgruppen | | | | | | | |
|--------------|------------------------|----------------------|----------------|----------------------|----|----------------------|----|----------------------|----|
| | | A | n ¹ | B | n | C | n | D | n |
| Zäkum | mmol/kg | 101,2 (±22,6) | | 106,4 (±17,1) | | 107,2 (±21,7) | | 106,5 (±21,0) | |
| | Azetat | 57,0 (±4,04) | 11 | 53,2 (±6,90) | 10 | 55,6 (±1,94) | 10 | 55,8 (±3,12) | 10 |
| | Propionat | 29,7 (±3,25) | 11 | 30,6 (±2,15) | 10 | 28,2 (±2,45) | 10 | 30,5 (±3,98) | 10 |
| | i-Butyrat | 0,90 (±1,97) | 11 | 0,26 (±0,11) | 10 | 0,27 (±0,11) | 10 | 0,36 (±0,24) | 7 |
| | n-Butyrat | 9,91 (±2,38) | 11 | 12,2 (±2,72) | 10 | 13,0 (±2,21) | 10 | 11,1 (±2,99) | 10 |
| | i-Valeriansäure | 0,30 (±0,07) | 11 | 0,25 (±0,10) | 10 | 0,28 (±0,10) | 10 | 0,31 (±0,24) | 10 |
| | n-Valeriansäure | 2,18 (±1,86) | 11 | 3,51 (±2,84) | 10 | 2,68 (±1,40) | 10 | 2,07 (±1,13) | 10 |
| Kolon | mmol/kg | 110,0 (±15,1) | | 119,0 (±27,3) | | 106,2 (±18,5) | | 111,1 (±21,7) | |
| | Azetat | 58,4 (±3,75) | 11 | 55,9 (±4,72) | 10 | 56,8 (±3,42) | 10 | 55,4 (±4,65) | 10 |
| | Propionat | 26,5 (±4,72) | 11 | 27,9 (±4,38) | 10 | 25,5 (±3,32) | 10 | 26,6 (±3,55) | 10 |
| | i-Butyrat | 0,68 (±3,57) | 11 | 0,67 (±0,27) | 10 | 0,61 (±0,26) | 10 | 0,68 (±0,55) | 10 |
| | n-Butyrat | 11,1 (±1,72) | 11 | 11,6 (±2,28) | 10 | 13,6 (±1,31) | 10 | 13,5 (±1,32) | 10 |
| | i-Valeriansäure | 0,76 (±0,37) | 11 | 0,70 (±0,32) | 10 | 0,62 (±0,38) | 10 | 0,80 (±0,72) | 10 |
| | n-Valeriansäure | 2,57 (±1,02) | 11 | 3,16 (±1,48) | 10 | 2,94 (±1,21) | 10 | 2,99 (±1,12) | 10 |

¹= Anzahl der gewerteten Fälle, A= Kontrollgruppe, B= FRESTA[®] F 0,04%, C= FRESTA[®] F 0,2%, D= Bockshornkleesamen 0,15%

5. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Studie war, mögliche Effekte pflanzlicher Futterzusatzstoffe bzw. pflanzlicher Komponenten auf verdauungsphysiologische Parameter sowie hinsichtlich möglicher weitergehender Wirkungen beim Schwein zu prüfen. Ziel der *in vitro*-Untersuchungen war die Ermittlung möglicher antiadhäsiver und antimikrobieller Wirkungen gegenüber einem enteropathogenen *E. coli*-Stamm, der durch die Expression des Fimbrientyps F4 charakterisiert war. Da diese Stämme als Hauptverursacher absetzbedingter Durchfälle bei Ferkeln identifiziert wurden, sollte dieser Stamm als Vertreter enteropathogener *E. coli*-Stämme dienen. Ziel der Fütterungsstudie waren die Untersuchungen verdauungsphysiologischer und immunmodulatorischer Wirkungen eines pflanzlichen Futterzusatzstoffes und einer weiteren Futterkomponente (Bockshornkleesamen) bei Absetzferkeln. Fütterungsbedingte Einflüsse auf das Immunsystem und mikrobielle Prozesse im Darm sind grundsätzlich von wissenschaftlichem Interesse, da darmassoziierte Reaktionen in ihrer Komplexität auch zu einer Beeinflussung systemischer immunologischer Prozesse führen und damit die Tiergesundheit beeinflussen können. Trotzdem liegen bisher nur vereinzelte Daten fütterungsassoziierter Wirkungen auf das intestinale lymphoretikuläre Gewebe (intraepitheliale Leukozyten, Leukozyten der *Lamina propria*) und möglicher Zusammenhänge auf systemische Reaktionen beim Schwein vor. Das Versuchsdesign wurde so gewählt, dass es sowohl eine Erfassung verdauungsphysiologischer Parameter und bakterieller Metaboliten als auch die Erfassung immunologischer Parameter aus dem Darm und dem Blut von Absetzferkeln erlaubte. Außerdem erfolgte eine orale Immunisierung der Ferkel mit einem Salmonellen-Lebendimpfstoff, um die Ermittlung spezifischer lokaler und systemischer Immunreaktionen zu ermöglichen. Anhand des Probenmaterials konnte im Durchflusszytometer ein großes Spektrum der Leukozytenpopulationen aus dem Darm und dem Blut detektiert werden. Zusätzlich wurden spezifische Immunglobuline im Serum der Ferkel bestimmt, um die humorale Immunantwort zu charakterisieren.

5.1. Kritik der Methoden

5.1.1. Aufbereitung der pflanzlichen Testmaterialien

Die Aufbereitung der pulverisierten Pflanzenmaterialien für die *in vitro*-Untersuchungen erfolgte unter Berücksichtigung von verschiedenen Aspekten. Dazu gehörten das Löslichkeitsverhalten der Pflanzeninhaltsstoffe und die möglichen beeinflussenden Effekte auf die Vitalität der verwendeten Epithelzelllinie und des *E. coli*-Stamms. Auf Analysen zur Identifizierung der aktiven Substanzen in den Pflanzenmaterialien wurde verzichtet, da bezugnehmend auf die Hypothesen eine Beurteilung einzelner aktiver Inhaltsstoffe nicht im Mittelpunkt der Studie stand. Für die kommerzielle Pflanzenmischung FRESTA[®] F lag eine Deklaration vor.

Die Aufbereitung der Pflanzenmaterialien erfolgte in einem wässrigen Medium. In anderen *in vitro*-Studien erfolgten die Aufbereitungen von Pflanzenmaterialien auch auf Grundlage der Herstellung einer wässrigen Lösung (Summerfield und Saalmüller, 1998; Becker et al., 2007). Allerdings handelte es sich dort um andere pflanzliche Ausgangsstoffe, die zum Teil

schon einer Vorbehandlung unterzogen waren (Becker et al., 2007). Neben des Einflusses der Herkunft auf den Anteil aktiv wirksamer Inhaltsstoffe in der Pflanze muss auch die methodische Aufarbeitung bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

In der vorliegenden Studie erfolgte die Entnahme der jeweiligen pulverisierten pflanzlichen Ausgangsmaterialien für alle *in vitro*-Untersuchungen aus einer Charge, um eventuelle Konzentrationsschwankungen der Inhaltsstoffe so gering wie möglich zu halten. Bei der Aufbereitung der verschiedenen Pflanzenpulver zeigten sich unterschiedliche Eigenschaften auf Grund der vielseitigen Inhaltsstoffe, die den Einsatz für die vorgesehenen Methoden stark beeinflussten. Die methodische Aufarbeitung und die Wahl der Konzentration der Pflanzenextrakte erfolgten im Hinblick auf eine Reproduzierbarkeit der *in vitro*-Ergebnisse auf mögliche Effekte im Tier. Die Dosierung richtete sich daher nach Herstellerangaben und berücksichtigte eine zusätzliche Verdünnung der Substanzen im Chymus unter physiologischen Bedingungen (Wald, 2004).

5.1.2. In vitro- Methoden

5.1.2.1. IPEC-J2-Zellkulturmodell zur Beurteilung des Einflusses auf die bakterielle Adhäsion

In der vorliegenden Studie erfolgten durchflusszytometrische Untersuchungen zum Einfluss der eingesetzten Pflanzenextrakte auf die Adhäsion eines enteropathogenen *E. coli*-Stamms an eine intestinale Epithelzelllinie des Schweins (IPEC-J2), die sich aufgrund ihrer vielfältigen Zellfunktionen als geeignete Zelllinie hinsichtlich der Untersuchungen zu Interferenzen mit pathogenen Mikroorganismen in anderen Studien bewährt hat (Schierack et al., 2006; Skjolaas et al., 2006; Schmidt et al., 2008). Um eine zellassoziierte Adhäsion durchflusszytometrisch ermitteln zu können, wurden die Bakterien vor Inkubation mit den Epithelzellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Ein Anstieg der Fluoreszenzintensität der Epithelzellen wurde demnach durch die Assoziation markierter Bakterien an den Epithelzellen verursacht. Diese Aussage wird durch Studien unterstützt, die gleichzeitig fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchführten (Logan et al., 1998). Dabei korrelierte der Anteil mit *H. pylori* assoziierter Epithelzellen im Durchflusszytometer eng mit der Anzahl im Fluoreszenzmikroskop ermittelter Bakterien pro Zelle (Logan et al., 1998). Durchflusszytometrische Analysen erwiesen sich auch in anderen Studien als geeignete und aussagekräftige Methode der Ermittlung einer bakteriellen Adhäsion an Epithelzellen (Logan et al., 1998; Valdivia und Falkow, 1998; Sethman et al., 2002; Pils et al., 2006). Durch die Markierung von Bakterien mit einem Fluoreszenzfarbstoff werden Adhäsionsmechanismen mit sowohl niedriger als auch hoher Bindungsaffinität detektiert, wodurch eine quantitative Aussage der Adhäsion möglich zu sein scheint (Logan et al., 1998; Sethman et al., 2002). Allerdings ist eine weitere Differenzierung bezüglich qualitativer Adhäsionsmechanismen dadurch nicht möglich. Durch die Verwendung von Antikörpern zur Markierung spezifischer Oberflächenmoleküle von Epithelzellen ist es möglich, die Aussagefähigkeit bezüglich spezifischer Adhäsionsmechanismen mittels durchflusszytometrischer Analysen zu erhöhen (Valdivia und Falkow, 1998). Dadurch kann auch eine Invasion von Bakterien detektiert werden (Valdivia und Falkow, 1998; Pils et al., 2006).

Die in der vorliegenden Studie verwendete Methode zur Ermittlung einer Adhäsion eines enteropathogenen *E. coli*-Stamms an eine IPEC-J2 Zelllinie lässt somit eine Aussage zur Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen als Epithelzell-/Bakterienkomplex zu. Weitere Interpretationen hinsichtlich der Beurteilung von Adhäsionsmechanismen sind nicht möglich.

Außerdem war es durch die Methode nicht möglich, die genaue Anzahl gebundener Bakterien je Epithelzelle zu bestimmen. Dazu hätten zusätzliche immunhistochemische oder mikroskopische Untersuchungen erfolgen müssen. Da das Ziel der *in vitro*-Untersuchungen die Ermittlung möglicher Einflüsse der Pflanzenextrakte auf die Adhäsion von Bakterien an einer Epithelzelllinie war, standen Untersuchungen zu spezifischen Adhäsionsmechanismen nicht im Mittelpunkt der methodischen Untersuchungen. Ob es sich bei den ermittelten Ergebnissen um eine spezifische oder unspezifische Bindung der Bakterien handelt, könnte zum Beispiel durch eine Blockierung der F4-Rezeptoren an den Epithelzellen weiter untersucht werden (Valdivia und Falkow, 1998).

5.1.2.2. Modell der Beschichtung von Oberflächen mit Pflanzenmaterialien zur Ermittlung der pflanzlichen Bindungskapazität gegenüber dem *E. coli*-Stamm

Diese Methode erfolgte in Ergänzung zu dem Zellkulturmodell unter der Annahme, dass die Blockierung der Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen durch eine Bindung der Bakterien an pflanzliche Kohlenhydrate erfolgt. In einem Adhäsionsmodell erfolgten in Anlehnung an die Methode von Becker et al. (2007) Untersuchungen bezüglich einer Bindungskapazität der Pflanzenextrakte gegenüber dem enteropathogenen *E. coli*-Stamm. Dabei erfolgte die Ermittlung der Adhäsion durch Erstellung einer Wachstumskurve. Durch die Messung der Extinktion über einen Zeitraum von 24 Stunden konnte eine Zunahme der optischen Dichte in den Testansätzen ermittelt werden. Anhand der grafischen Auswertung der Extinktionswerte konnte eine sigmoidal verlaufende Kurve ermittelt werden, die wie in der Studie von Becker et al. (2007) als Ausdruck bakteriellen Wachstums interpretiert wurde. Demnach korreliert der Anstieg der gemessenen optischen Dichte in den Testansätzen mit einem Wachstum der Bakterien. In Abhängigkeit von der Menge gebundener Bakterien zeigen sich damit Differenzen in den Extinktionen. Durch einen Vergleich der Extinktionen beziehungsweise der Wachstumskurven können somit Rückschlüsse auf die Menge gebundener Bakterien gezogen werden.

Die Anhaftung der Bakterien in der Positivkontrolle wird auf eine direkte Bindung der Bakterien an die Polystyrol-Oberfläche der verwendeten Mikrotiterplatte zurückgeführt und erklärt damit das bakterielle Wachstum. Das geringe Bakterienwachstum in der Negativkontrolle ist darauf zurückzuführen, dass bovines Serumalbumin aufgrund seiner Proteinstruktur keine ausreichenden Bindungsstellen für bakterielle Fimbrien bietet (Sokurenko et al., 1995). Eine Bindung der Bakterien an noch mögliche freie Stellen der Polystyrol-Oberfläche der Mikrotiterplatte nach dem Beschichten mit den Pflanzenmaterialien kann ausgeschlossen werden, da diese durch das zum Stoppen der Bindungsreaktion der Pflanzenmaterialien eingesetzte Albumin gebunden wurden. Eine mögliche Adhäsion von Albumin an pflanzliche Bindungsstellen konnte bei dieser Methode nicht ausgeschlossen werden.

In ähnlichen Studien erfolgte die Ermittlung einer bakteriellen Adhäsion an der Oberfläche von Magenmucus (Bernet et al., 1994; Burger et al., 2000). Nach der Inkubation von Bakterien mit der Oberfläche des beschichteten Magenmucus erfolgte nach Entfernung ungebundener Bakterien die Detektion der Adhäsion entweder durch Bestimmung bakterieller Enzymaktivitäten (Burger et al., 2000) oder durch Markierung der Bakterien mittels radioaktiver Substanzen und quantitativer Zellzahlbestimmung (Lee et al., 2000). Während es sich bei diesen Methoden um eine Endpunktbestimmung handelt, stellt die Messung des bakteriellen Wachstums in der vorliegenden Studie eine Verlaufsmessung dar. Neben der Verlaufsmessung erfolgte in einer vorausgegangenen Studie anschließend auch

eine Endpunktbestimmung durch Ermittlung der Zellzahl in den Testansätzen (Becker et al., 2007). Auf eine Endpunktbestimmung wurde in der vorliegenden Studie verzichtet, da es in diesem Testmodell hauptsächlich darum gehen sollte, die grundlegende Hypothese einer Bindungsaffinität der getesteten Pflanzenmaterialien gegenüber dem *E. coli*-Stamm zu bestätigen.

5.1.2.3. Methode zur Bestimmung direkter antimikrobieller Effekte

Diese Methode erfolgte unter dem Aspekt, dass Inhaltstoffe der Testsubstanzen möglicherweise zu antimikrobiellen Effekten führen und somit das Wachstum des *E. coli*-Stamms hemmen. Der Nachweis direkter antimikrobieller Effekte gegenüber pathogenen Bakterien wie *E. coli* durch verschiedene pflanzliche ätherische Öle ist in etlichen *in vitro*-Studien durch die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration belegt worden (Dorman und Deans, 2000; Burt und Reinders, 2003). In Anlehnung an diese Methodik erfolgte in der vorliegenden Studie die simultane Inkubation des *E. coli*-Stamms mit verschiedenen Konzentrationen der Pflanzenextrakte in Form einer geometrischen Verdünnungsreihe. Zur Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der anderen Modelle und unter der Berücksichtigung eines Einsatzes im Fütterungsversuch wurde eine 1%ige Lösung als Höchstkonzentration gewählt. Ob ein Einfluss der Testsubstanzen bei höheren Konzentrationen zu beobachten ist, bleibt zu klären. Da es auch in diesem Testmodell um die grundlegende Betrachtung von Wirkmechanismen gehen sollte, erfolgte keine Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration wie in vorausgegangenen Studien (Dorman und Deans, 2000).

Das Modell sollte dazu dienen, zu beurteilen, ob sich konzentrationsabhängige Einflüsse auf das Wachstum des geprüften *E. coli*-Stamms nach einer 24stündigen Inkubation anhand der Extinktionen abzeichnen und ein antimikrobieller Effekt als Wirkmechanismus in Betracht gezogen werden könnte. Ob dieses Modell überhaupt zur Beurteilung antimikrobieller Effekte für die eingesetzten Pflanzenextrakte herangezogen werden kann, ist fraglich, da es aufgrund der zum Teil sehr intensiven Eigenfärbung in den Pflanzenlösungen zu einer erheblichen Beeinträchtigung der photometrischen Messungen kam. Dieser Einfluss konnte vor allem bei dem Süßholzwurzelextrakt beobachtet werden, welches aufgrund einer intensiven Gelbfärbung schon zu Messbeginn höhere Extinktionswerte erreichte als die zur Kontrolle eingesetzte *E. coli*-Suspension. Diese Werte konnten vor allem bei der 1%igen und 0,5%igen Lösung ermittelt werden. Trotz Korrektur des Leerwertes konnte damit keine aussagekräftige Interpretation der Ergebnisse für die Süßholzwurzellösung erfolgen. Eine mögliche Alternative wäre auch hier das Auszählen der in der Suspension befindlichen Bakterien gewesen, um eine aussagekräftige Auswertung zu erhalten. Dabei hätte der Einfluss der Pflanzenfarbstoffe unberücksichtigt bleiben können.

5.1.3. Versuchdesign

Es wurde ein Versuchdesign gewählt, welche die komplexe Erfassung immunologischer Parameter aus dem Darm und dem Blut von abgesetzten Ferkeln ermöglichte. Die Fragestellung der Studie bestand in der Ermittlung möglicher immunmodulatorischer Einflüsse der eingesetzten Futterzusatzstoffe. Der Aspekt, zusätzlich die spezifische humorale Immunantwort auf eine orale Vakzination gegen *Salmonella* Typhimurium zu beurteilen, erforderte die Voraussetzung seronegativer Tiere. Obwohl vor Studienbeginn Daten serologischer Nachweisverfahren (ELISA) für die Einzeltiere vorlagen, erfolgte

nochmals eine serologische Beprobung der Tiere vor der Vakzination zur Bestimmung von spezifischen Antikörpern. Für die Betrachtung der ermittelten immunologischen Parameter sollten die Versuchsbedingungen nicht unberücksichtigt bleiben. Daher ist die Aufteilung des Versuchs in drei Versuchsdurchgänge kritisch zu betrachten. Obwohl äußere klimatische, haltungs- und fütterungsassoziierte Schwankungen weitgehend reduziert wurden, ist ein Einfluss der differierenden Versuchsdurchgänge möglich. Daneben spielen auch genetische Faktoren der Einzeltiere eine Rolle bei der Betrachtung der Immunparameter. Um den Einfluss dieser Faktoren so weit wie möglich zu reduzieren, wurde auf die innerhalb der Versuchsdurchgänge durchgeführte Einheitlichkeit des Versuchsdesigns geachtet, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse erzielen zu können. Daher wurde darauf geachtet, dass die Fütterungsgruppen in jedem Versuchsdurchgang homogen waren. Die Zuteilung der nach 21 Tagen abgesetzten Ferkel erfolgte unter der Berücksichtigung der Körpermasse der Tiere, sodass für die Fütterungsgruppen annähernd gleiche Durchschnittsgewichte gegeben waren. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsdurchgänge wurden separat ermittelt und zusammenfassend dargestellt, da sich durch eine erhöhte Probenzahl die statistische Auswertung besser absichern lässt. Eine Durchführung der Untersuchungen in einem Versuchsdurchgang wäre aufgrund der hohen Tierzahl und der notwendigen zeitnahen Bearbeitung der Proben in diesem Zusammenhang nicht realisierbar gewesen. Die Aufteilung des Versuchs in drei Durchgänge war dafür erforderlich. Die ursprünglich geplante Beprobung von jeweils drei Tieren pro Fütterungsgruppe und Versuchsdurchgang zeigte sich hinsichtlich der statistischen Bewertung der zu erwartenden Ergebnisse als kritisch. Da im ersten Durchgang ein beprobtes Tier für die weitere Bewertung ausgeschlossen werden mußte, erfolgte im zweiten Durchgang die Beprobung von 14 Tieren an zwei Tagen und im dritten Durchgang die Beprobung von acht Tieren pro Tag, um trotzdem möglichst viele Ergebnisse unter der Voraussetzung gleicher Bedingungen mit einer möglichst hohen statistischen Aussagefähigkeit bewerten zu können.

Die Haltung der Tiere erfolgte während der gesamten Versuchsperiode in Gruppen zu zwei Tieren in Flatdecks. Unter den gegebenen Umständen der vorliegenden Versuchsdurchführung wurden die Tiere in wesentlich kleineren Gruppen und unter räumlichen Verhältnissen gehalten, die mit Praxisbedingungen nicht verglichen werden können. Die Ferkel zeigten über den gesamten Versuchszeitraum einen gesunden Habitus und ungestörtes Fressverhalten. Die vorliegenden Ergebnisse sind demzufolge unter der Berücksichtigung des Einflusses optimaler Haltungsbedingungen zu diskutieren.

5.1.3.1. Probenmaterial und Untersuchungsmethoden

Die vor der Immunisierung zur Bestimmung von Salmonellen-Antikörpern aus der *Vena cava cranialis* gewonnenen Blutproben der Ferkel wurden zur Serumgewinnung weiterverarbeitet und bis zur Analyse eingefroren. Am Ende des Versuchs erfolgte die Blutentnahme von narkotisierten Tieren. Die Proben wurden am selben Tag weiterverarbeitet und bis dahin auf Eis gekühlt. Die Markierung der Immunzellen erfolgte mittels monoklonaler Antikörper. Für die Detektion der Immunzellpopulationen wurden die Antikörperkombinationen CD2⁺CD5⁺ (T-Zellen (total), außer CD2-γδ-T-Zellen), CD2⁺CD5⁻ (NK-Zellen), CD21⁺SWC3⁻ (B-Zellen), CD21⁻SWC3⁺ (myeloide Zellen (Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen, Makrophagen)) sowie CD14⁺ (Monozyten) verwendet. Um innerhalb der Populationen weitere Differenzierungen zu ermöglichen, wurden außerdem die Antikörperkombinationen CD4⁺CD8β⁻ und CD4⁺CD25⁺ (Helfer-Zellen), CD4⁻CD8β⁺ und TCR⁻CD8α⁺ (zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen), TCR⁺CD8α⁻ und TCR⁺CD8α⁺ (γδ-T-Zellen, CD8⁺ mit zytotoxischer

Aktivität), CD5⁻MHCII⁺ (antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, ggf. T-Zellen) eingesetzt. Die Beurteilung einer Aktivierung von Helferzellen wurde anhand der Antikörperkombinationen CD4⁺CD25⁺ und CD45RC ermöglicht.

Eine weitere Differenzierung für CD8α⁺, CD8β⁺, CD5⁺ und MHCII⁺ Zellen aufgrund der exprimierten Rezeptordichte in CD8α^{low/high}, CD8β^{low/high}, CD5^{low/high} und MHCII^{low/high} war im Rahmen der Untersuchungen nicht möglich, da die zur Auswertung der ermittelten Daten genutzten Grafiken nicht eindeutig waren. Die Markierung der Zellen mit CD5 unterschied sich im letzten Versuchsdurchgang durch die Verwendung eines anderen CD5-Klons. Dieser wurde im Vorfeld austitriert und hinsichtlich seiner Bindungskapazitäten mit dem zuvor eingesetzten CD5-Klon im Durchflußzytometer verglichen. Da die erhaltenen Ergebnisse vergleichbar waren, scheint der Einfluss des Antikörperklons hinsichtlich der Bindung an die Immunzellen eher gering.

Die Proliferation der Lymphozyten aus dem Blut erfolgte durch Stimulation mit den Mitogenen PWM, Con A und PHA-M am Tag der Probennahme. Durch den Einbau von BrdU in die neu synthetisierte DNA der proliferierenden Zellen konnte eine Proliferation durchflußzytometrisch ermittelt werden. Die Aufarbeitung der Lymphozyten unterschied sich im letzten Versuchsdurchgang dahingehend, dass anstelle des Ethanol die Permeabilisierung der Zellen mit FACS Perm2 durchgeführt wurde. Auch hier konnte aufgrund der erhaltenen Ergebnisse der Einfluss des Aufarbeitungsschrittes auf die Proliferationsleistung der Zellen als gering betrachtet werden.

Die Phagozytoseaktivität der Monozyten und Granulozyten im Serum der Ferkel wurde mittels des kommerziell erwerblichen Phagotest[®] bestimmt. Da dieses Testsystem auf der Verwendung von Vollblutproben innerhalb von 24 Stunden beruht, wurden die Proben für jeden Versuchsdurchgang am selben Tag gemessen und die Ergebnisse für die statistische Auswertung wie bei den Immunzellen bei Versuchsende zusammengefasst.

Die Haptoglobinkonzentration im Serum der Ferkel wurde durch einen kommerziellen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ermittelt. Alle Proben wurden zusammenhängend nach dem dritten Versuchsdurchgang gemessen und die Ergebnisse für die einzelnen Gruppen zusammengefasst.

Die Bestimmung der spezifischen Antikörper gegen *Salmonella* Typhimurium nach Vakzinierung erfolgte sowohl mittels eines kommerziellen ELISA (SALMOTYPE[®] Pig Screen, LDL), um die vor Versuchsbeginn vorliegenden Ergebnisse vergleichen zu können, als auch durch ein etabliertes modifiziertes ELISA-Testverfahren (Roesler et al., 2005), welches eine Differenzierung zwischen den einzelnen Immunglobulinen ermöglichte. Die Proben aller drei Versuchsdurchgänge wurden zusammen gemessen, um zeitlich bedingte Unterschiede in den Messungen zu vermeiden.

Die Entnahme der Darmproben der Ferkel erfolgte unmittelbar *post mortem*, wobei ein circa 30cm langes Segment des proximalen Jejunums gewählt wurde. Für die Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten wurden die Darmstücke mehrfach in HBSS-DTT inkubiert und über Gaze gespült, sodass die Überstände überwiegend Epithelzellen und intraepitheliale Lymphozyten enthielten (20-28% Epithelzellen und 55-60% isolierte Lymphozyten). Die eingesetzten Antikörper für die Phänotypisierung der Immunzellen entsprachen weitgehend denen aus dem Blut bis auf die Kombinationen CD16⁺SWC3⁻ (B-Zellen), CD16⁺SWC3⁺ (myeloide Zellen) und CD45 zur Bestimmung der Gesamtzahl intestinaler Leukozyten.

Die Entnahme der Digestaproben erfolgte ebenfalls unmittelbar nach der Euthanasie der Tiere. Dabei erfolgte zuvor eine Einteilung in die jeweiligen Darmsegmente. Die Digestaproben wurden sofort gekühlt und bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Die Proben

aller Tiere wurden nach dem dritten Versuchsdurchgang zusammen gemessen, um experimentell bedingte Unterschiede in den Messungen zu vermeiden. Die Ergebnisse wurden für die jeweiligen Fütterungsgruppen zusammengefasst, um eine statistische Auswertung zu sichern.

Da es in jedem Versuchsdurchgang bei einzelnen Tieren aufgrund einer zu geringen Digestamenge im Duodenum, proximalen Jejunum und Ileum nicht möglich war, ausreichend Probenmaterial zu gewinnen, ergaben sich in den Fütterungsgruppen Differenzen in der Probenanzahl. Die Bestimmung der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins musste daher auch aus Poolproben erfolgen. Die Aussagen über Nährstoffverdaulichkeiten sind aufgrund der geringen Probenzahl nur eingeschränkt möglich.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Einfluss der pflanzlichen Substanzen auf die Adhäsion eines enteropathogenen *E. coli*-Stamms an eine IPEC-J2-Zelllinie

Die Ergebnisse der Versuche im Zellkulturmodell zeigen deutliche Effekte der verwendeten Pflanzenpräparate auf die Adhäsion des *E. coli*-Stamms. Durch den Einfluss von FRESTA® F und Bockshornkleesamen konnte im Vergleich zur Positivkontrolle eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität im Histogramm ermittelt werden, die damit auf eine Reduktion der Menge zellgebundener *E. coli* hinweist. Im Vergleich zur Positivkontrolle reduzierte sich die Menge zellgebundener Bakterien durch den Einfluss von 0,33% FRESTA® F um 52,7%, durch den Einfluss von 0,33% Bockshornkleesamen um 57,6%. Unter dem Einfluss des Bockshornkleesamenextraktes zeigte sich außerdem eine signifikante Reduktion der mit *E. coli* markierten Epithelzellen von 35,5%, während für FRESTA® F eine Reduktion von 5,7% beobachtet werden konnte.

Während für beide Pflanzenextrakte eine Reduktion der Menge zellgebundener *E. coli* ermittelt werden konnte, zeigte sich durch den Einfluss des Bockshornkleesamens auch eine geringe Anzahl mit *E. coli* assoziierter Epithelzellen im Vergleich zur Positivkontrolle. Das lässt vermuten, dass sich durch den Einfluss von Bockshornkleesamen sowohl die Menge zellgebundener Bakterien als auch der Anteil *E. coli* „infizierter“ Epithelzellen reduzieren lässt.

Die Ergebnisse lassen sich mit denen anderer *in vitro*-Studien zum Einfluss pflanzlicher Substanzen auf die Adhäsion enteropathogener und nichtpathogener *E. coli*-Stämme vergleichen (Naughton et al., 2001; Shoaf et al., 2006). Dabei konnte in den Untersuchungen mit Gewebesuspensionen des Jejunums und Ileums vom Schwein durch eine 2,5%ige Mannoselösung und eine Fruktooligosaccharidlösung eine signifikante Reduktion der Anzahl nichtpathogener *E. coli* im Jejunum ermittelt werden (Naughton et al., 2001). Mittels Licht- und Phasenkontrastmikroskopie konnte ebenfalls eine Reduktion der Adhäsion enteropathogener *E. coli*-Stämme durch kommerzielle Galaktooligosaccharide an humanen Epithelzellen quantitativ gemessen werden (Shoaf et al., 2006).

Deutliche antiadhäsive Effekte pflanzlicher Substanzen zeigten sich *in vitro* gegenüber uropathogenen *E. coli*-Stämmen, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* und *Propionibacterium acnes* (Guggenbichler et al., 1997; Lee et al., 2004; Lee et al., 2006a; Lee et al., 2006b; Lee et al., 2009). Antiinvasive Effekte konnten auch gegenüber *Campylobacter jejuni* beobachtet werden (Ganan et al., 2010). Die Prüfung pflanzlicher Substanzen auf die

Adhäsion von *Salmonella* Typhimurium führte dagegen zu keinen eindeutigen Resultaten (Naughton et al., 2001; Parkar et al., 2008).

In vielen Studien wurden saure Polysaccharidfraktionen von Pflanzenmaterialien verwendet. Chromatographische Analysen der Einzelfractionen konnten die antiadhäsive Wirksamkeit auf den Anteil an Galakturoniden, Galaktose und Arabinose zurückführen (Guggenbichler et al., 1997; Lee et al., 2004; Lee et al., 2006a; Lee et al., 2006b; Lee et al., 2009). Die Studien zeigten auch, dass zumindest saure Galakturonoide in Abhängigkeit ihres Polymerisationsgrades in ihrer biologischen Aktivität hinsichtlich antiadhäsiver Effekte gegenüber Bakterien stark variieren können (Guggenbichler et al., 1997). In diesem Zusammenhang konnte eine Reduktion der Adhäsion pathogener *E. coli*-Stämme an humanen Uroepithelzellen von bis zu 100% erreicht werden (Guggenbichler et al., 1997). Die in der vorliegenden Studie deutlich geringeren relativen antiadhäsiven Effekte könnten demnach auf eine geringere biologische Aktivität der enthaltenen Inhaltstoffe schließen lassen oder auf einen geringeren Anteil aktiv wirksamer Kohlenhydratfraktionen in der Gesamtmischung. Sollte eine antiadhäsive Wirkung hauptsächlich durch saure Kohlenhydratfraktionen vermittelt werden, könnte die Ausprägung der beobachteten Effekte in der vorliegenden Studie auch auf einen geringen Anteil saurer Kohlenhydratfraktionen in den getesteten Substanzen zurückgeführt werden.

Als möglicher Wirkmechanismus der Blockierung der bakteriellen Adhärenz durch pflanzliche Kohlenhydrate wird die Funktion als „Rezeptoranaloga“ diskutiert. Dieser begründet sich darin, dass die Bindung pathogener Mikroorganismen über Expression lektinartiger Oberflächenmoleküle in Form von Fimbrien an membranständigen Rezeptoren von Epithelzellen erfolgt (Ofek et al., 1977; Neeser et al., 1986; Sharon, 1987; Karlsson, 1995). Dabei zeigen die verschiedenen Fimbrientypen der Bakterien Bindungsspezifitäten gegenüber verschiedenen Oligosaccharidfraktionen an den terminalen Domänen der Rezeptoren auf Wirtszellen (Ofek et al., 1977; Sharon, 1987). So erfolgt eine Bindung von *E. coli* über Typ1-Fimbrien an mannose- und galaktosehaltige Rezeptoren (Ofek et al., 1977; Neeser et al., 1986). Die Molekularstrukturen pflanzlicher Oligosaccharide zeigen diesbezüglich somit große Ähnlichkeit mit den terminalen Oligosaccharidstrukturen zellulärer Rezeptordomänen (Neeser et al., 1986; Sharon, 1987; Shoaf et al., 2006).

In der Pathogenese der Durchfallerkrankungen beim Schwein spielen vor allem *E. coli*-Stämme mit dem Fimbrientyp 4 eine entscheidende Rolle (Osek, 1999; Fairbrother et al., 2005). F4⁺ *E. coli*-Stämme binden an F4-Rezeptoren auf Enterozyten im Jejunum von Schweinen (Van den Broeck et al., 1999). Als F4-Rezeptoren wurden Glykoproteine (Erickson et al., 1994), Transferrin (Grange und Mouricout, 1996) und neutrale Glykosphingolipide (Grange et al., 1999) identifiziert. Dabei zeigten sich die F4-Adhäsine hinsichtlich ihres Phänotypes und ihrer Bindungsaffinitäten gegenüber den Rezeptoren variabel (Choi und Chae, 1999; Verdonck et al., 2004; Fairbrother et al., 2005). Als terminale Oligosaccharidsequenzen mukusständiger Glykoproteine konnte Galaktose im Dünndarm von Mäusen identifiziert werden (Laux et al., 1986).

Pflanzliche Oligosaccharide könnten demnach aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit in der Lage sein, die Bakterien über lektinartige Oberflächenmoleküle (Fimbrien) zu binden und dadurch die Adhäsion an Epithelzellen zu reduzieren. Aufgrund hoher Bindungsaffinität bestimmter F4⁺ *E. coli*-Stämme gegenüber den Rezeptoren stellt sich hinsichtlich der Reproduzierbarkeit im Tier dabei die Frage, welche Konzentrationen bei dem Einsatz pflanzlicher Oligosaccharide notwendig sind, um eine ausreichende Blockierung der Adhäsion zu erreichen. Die biologische Aktivität einzelner Oligosaccharide kann hoch sein,

da schon niedrige Konzentrationen zu einer deutlichen Blockierung der Adhäsion führen können (Guggenbichler et al., 1997). Bei Schweinen scheinen Fruktooligosaccharide zumindest teilweise die Adhäsion von *Salmonella* Typhimurium im Ileum und nichtpathogener *E. coli*-Stämme im Jejunum zu reduzieren (Naughton et al., 2001). Hinsichtlich einer Wirksamkeit pflanzlicher Substanzen zur Blockierung der Adhäsion enteropathogener *E. coli*-Stämme beim Schwein lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie ein Potenzial erkennen. Die Effekte von Bockshornkleesamen könnten aufgrund der Ergebnisse aus vorangegangenen Studien auf eine Bindung der Bakterien durch Oligosaccharide zurückgeführt werden, möglicherweise auf die im Bockshornkleesamen enthaltenen Galaktomannane. Da es sich bei den Pflanzenextrakten um eine Mischung verschiedener Komponenten handelte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere in den Lösungen enthaltene Oligosaccharide zu einer Bindung der Bakterien geführt haben könnten.

In weiteren Untersuchungen könnten Analysen der wässrigen Extrakte Aufschluss über die Anteile bioaktiver Komponenten geben und somit die Aussagekraft der Ergebnisse bezüglich der wirksamen Komponenten erhöhen. Die Differenzen hinsichtlich der Ausprägung der Effekte werden auf die unterschiedliche Zusammensetzung der verwendeten Extrakte zurückgeführt. Andererseits bleibt auch nicht auszuschließen, dass andere Inhaltsstoffe die Adhäsion beeinflusst haben könnten. Neben Poly- und Oligosacchariden scheinen auch Phenole und Flavonoide potenziell antiadhäsive Fähigkeiten zu besitzen (Di Martino et al., 2006; Beil und Kilian, 2007; Parkar et al., 2008). Da im Bockshornkleesamen auch Flavonoide (Apigenin) ermittelt wurden (Laboranalyse Fa. Belan, Wels, Österreich), kann ein möglicher Einfluss nicht ausgeschlossen werden. Welchen Anteil die Flavonoide aufgrund ihres Lösungscharakters in der wässrigen Lösung der Extrakte hatten, ist weiter aufzuklären. Eine Blockierung der Adhäsion enteropathogener *E. coli*-Stämme konnte auch durch den Einsatz anderer Futterzusatzstoffe wie Probiotika beobachtet werden (Bernet et al., 1994; Bogovič Matijašić et al., 2006). Da die Wirkung von Probiotika auf einer Konkurrenz um Nährstoffe und kompetitive Bindungsstellen an Zellrezeptoren beruht, bedarf es einer ausreichenden Konzentration der zugeführten Bakterienstämme zur Erzielung effektiver Ergebnisse (Bernet et al., 1994; Bogovič Matijašić et al., 2006). Dagegen scheinen pflanzliche Zusatzstoffe für Pathogene aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Zellrezeptoren als zusätzliche potente Bindungsstellen zur Verfügung zu stehen. Die Rolle verschiedener Oligosaccharide sollte beim Schwein weiter untersucht werden, da diese offenbar bereits in geringen Konzentrationen ein Wirkpotenzial als „Rezeptoranaloga“ zu besitzen scheinen.

5.2.2. Bindungskapazität pflanzlicher Substanzen gegenüber dem enteropathogenen *E. coli*-Stamm

Die Ergebnisse zeigen nach der Inkubation eine deutliche Zunahme der Extinktion in den jeweiligen Testansätzen, was auf ein Wachstum der Bakterien zurückgeführt wurde. Für den geprüften *E. coli*-Stamm kann damit eine deutliche Bindung an die pflanzlichen Testmaterialien vermutet werden.

In Abhängigkeit der beschichteten Pflanzenmaterialien konnten während der Inkubation deutliche quantitative Unterschiede für die Extinktionen ermittelt werden, die nach acht Stunden die größten Differenzen aufwiesen. Dies wurde auch in den Darstellungen der Wachstumskurven deutlich. Während in der Positivkontrolle nach acht Stunden eine

Extinktion von 0,49 gemessen wurde, lag diese bei 0,32 für FRESTA® F, bei 0,37 für Bockshornkleesamen und bei 0,26 für Süßholzwurzel. Die Werte waren allerdings quantitativ nicht signifikant unterschiedlich. Die unterschiedlich ermittelten Extinktionswerte für die einzelnen Pflanzenextrakte könnten auf verschiedene Bindungskapazitäten hinweisend sein. Höhere Extinktionswerte könnten für eine größere Bindungskapazität stehen. Unter dieser Annahme schien demnach Bockshornkleesamen eine größere Bindungskapazität gegenüber dem *E. coli*-Stamm zu erreichen als FRESTA® F und Süßholzwurzel.

Mit dem Hintergrund, dass die Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen durch Kohlenhydrate an Rezeptoren vermittelt wird und sich pflanzliche Kohlenhydrate als geeignete Substanzen hinsichtlich alternativer Bindungsstellen für die Bakterien anbieten, lassen sich die Ergebnisse der Studie mit einer vorausgegangenen Studie vergleichen, in der Bindungskapazitäten verschiedener pflanzlicher Extrakte aus Karottentrester, Palmkernen, Sojabohnen und Bio-Mos® gegenüber *Salmonella* spp. untersucht wurden (Becker et al., 2007). In anderen Studien wurde auch eine Bindung von *E. coli*-Stämmen durch pflanzliche Oligosaccharide beschrieben (Neeser et al., 1986; Kastner et al., 2002).

Die in der vorliegenden Studie beobachteten Bindungskapazitäten der eingesetzten Pflanzenextrakte gegenüber einem enteropathogenen *E. coli*-Stamm könnten durch Oligosaccharide wie Galaktomannane des Bockshornkleesamens vermittelt worden sein. Die Extinktionswerte von FRESTA® F und der Süßholzwurzel lassen vermuten, dass die Bindungskapazität gegenüber dem eingesetzten *E. coli*-Stamm geringer ist. Aufgrund der verschiedenen Bindungsaffinitäten bakterieller Oberflächenmoleküle gegenüber Kohlenhydraten könnten sich für andere Bakterienstämme möglicherweise andere Bindungskapazitäten der Pflanzenextrakte abzeichnen. Dieses wäre in weiterführenden Untersuchungen zu klären.

5.2.3. Einfluss verschiedener Konzentrationen der pflanzlichen Substanzen auf das bakterielle Wachstum des *E. coli*-Stamms

Die Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen auf das Wachstum des *E. coli*-Stamms erfolgten mit Hintergrund der Ermittlung möglicher antimikrobieller Wirkmechanismen. Es konnten keine wachstumshemmenden Effekte der Pflanzenextrakte auf den untersuchten *E. coli*-Stamm ermittelt werden.

Andere *in vitro*-Studien zeigten teils deutliche antimikrobielle Effekte pflanzlicher Extrakte gegenüber verschiedenen Bakterienarten (Hammer et al., 1999; Dorman und Deans, 2000; Burt und Reinders, 2003; Penalver et al., 2005; Si et al., 2006). In der Literatur werden antimikrobielle Effekte hauptsächlich auf die Wirkung der in Pflanzen enthaltenen ätherischen Öle und Saponine zurückgeführt (Sen et al., 1998; Hammer et al., 1999; Burt, 2004; Penalver et al., 2005). Da für das Bockshornkleesamen- und Süßholzwurzelpulver keine ätherischen Öle als Inhaltsstoffe angegeben wurden und der Gehalt der Mischung ätherischer Öle in FRESTA® F (Firmenangaben) im Vergleich zu den anderen Inhaltsstoffen sehr gering ist, könnten die ausbleibenden antimikrobiell wirksamen Effekte wahrscheinlich auf eine zu niedrige Konzentration an ätherischen Ölen zurückgeführt werden.

Eine ähnliche Vermutung gilt auch für das Süßholzwurzelextrakt unter der Annahme, dass auch Saponine in Abhängigkeit ihres chemisches Grundgerüsts und verschiedener aktiv wirksamer Kohlenhydratgruppen ein antimikrobielles Potenzial besitzen (Sen et al., 1998). In anderen *in vitro*-Studien wurden durch den Einsatz isolierter ätherischer Öle und Saponine Effekte beobachtet, die allerdings erst bei Konzentrationen von bis zu 4% erreicht wurden

(Peñalver et al., 2005). In der vorliegenden Studie wurde dagegen mit Pflanzenextrakten gearbeitet. Zusätzlich kann man bei den eingesetzten wässrigen Extrakten davon ausgehen, dass sich ätherische Öle als hydrophobe Substanzen nur schwer in Wasser lösen.

5.2.4. Hämatologische und immunologische Parameter der Ferkel

5.2.4.1. Hämatologie und Differenzialblutbild

Die im Rahmen der Studie ermittelten Blutparameter lagen im Referenzbereich der für Ferkel dieser Altersgruppe vorliegenden Daten (Nerbas, 2008). Der Einsatz der pflanzlichen Zusatzstoffe zeigte keinen Einfluss auf die Zellzahlen der Erythrozyten und Thrombozyten sowie die Hämatokritkonzentration und den Hämoglobinwert. Ebenfalls zeigten sich in den Fütterungsgruppen keine Veränderungen der Zellzahlen des weißen Blutbildes. Umwelteinflüsse sowie tierindividuelle und altersbedingte Faktoren hatten vermutlich einen größeren Einfluss als der Einsatz der Zusatzstoffe.

5.2.4.2. Phänotypisierung der Leukozyten im Blut der Ferkel

Bei der Phänotypisierung der peripheren Blutzellen zeigten sich insgesamt hohe tierindividuelle Schwankungen. Obwohl sich zahlreiche Studien mit der phänotypischen Identifizierung porciner Immunzellen beschäftigten, liegen nur wenig Referenzdaten für Ferkel dieser Altersklasse vor (Charentantanakul und Roth, 2007; Piriou-Guzylack und Salmon, 2008; Paßlack, 2010). Ausgehend von einer gruppenvergleichenden Betrachtung zeigte sich durch den Einsatz der pflanzlichen Zusatzstoffe für den relativen Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen ($CD8\alpha TCR1^+$) in der Versuchsgruppe D eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während der Anteil in der Kontrollgruppe bei 9,4% lag, wurde in der Versuchsgruppe D ein Anteil von 17,2% ermittelt.

Außerdem nahm in der gleichen Versuchsgruppe der Anteil antigenpräsentierender Zellen ($MHCII^+CD5^-$) mit 20,9% verglichen mit dem in der Kontrollgruppe (30,5%) ab und eine tendenzielle Erhöhung des Anteils an $CD2^-CD5^+$ -Zellen konnte beobachtet werden. Während es sich bei den ermittelten $\gamma\delta$ -T-Zellen aufgrund der fehlenden $CD8\alpha$ -Expression wahrscheinlich um zytotoxisch inaktive Zellen handelt (Yang und Parkhouse, 1996), könnte die Erhöhung der $CD2^-CD5^+$ Zellpopulation auf $CD2^- \gamma\delta$ -T-Zellen hinweisend sein, da für $CD2^- \gamma\delta$ -T-Zellen eine $CD5^{low}$ -Expression beschrieben wurde (Binns, 1994; Saalmüller et al., 1994). Ob es sich bei der $CD2^-CD5^+$ Zellpopulation aber nur um $CD2^-CD5^{low}$ Zellen handelt, konnte in der Studie nicht weiter differenziert werden. Demzufolge bleibt zu vermuten, dass es sich bei dieser Zellpopulation nur um $CD2^- \gamma\delta$ -T-Zellen handelt. Da sich $CD2^- \gamma\delta$ -T-Zellen aber auch durch fehlende $CD4$ - und $CD8$ -Expression charakterisieren, könnte der hohe Anteil $CD8\alpha^- \gamma\delta$ -T-Zellen die Annahme unterstützen (Binns, 1994; Saalmüller et al., 1994; Yang und Parkhouse, 1996).

Der reduzierte Anteil $MHCII^+$ -Zellen in der Versuchsgruppe D, bei denen es sich um eine heterogene Gruppe antigenpräsentierender Zellen handelt, könnte durch die tendenzielle Senkung des Anteils an Monozyten (11,3% in der Kontrollgruppe, 6,3% in Versuchsgruppe D) vermittelt worden sein, womit sich die Gesamtzellzahl antigenpräsentierender Zellen reduziert. Für die anderen antigenpräsentierenden Zellarten konnten keine Schwankungen ermittelt werden, die auf diesen Abfall hinweisend sein könnten. Eine andere Überlegung für den Abfall der antigenpräsentierenden Zellpopulation wäre, dass es sich bei der betroffenen Zellsubpopulation um eine Gruppe handelt, die durch die verwendeten Antikörper nicht näher

identifiziert werden konnte. Es wäre vorstellbar, dass es sich dabei um dendritische Zellen handeln könnte. In der Literatur finden sich zum derzeitigen Zeitpunkt keine Hinweise, die einen fütterungsbedingten Abfall der Zellzahl antigenpräsentierender Zellen erklären könnten. Möglicherweise könnte es sich hier um konzentrationsabhängige Effekte auf spezifische Zellpopulationen handeln. Andererseits bleibt zu überdenken, inwieweit der Abfall antigenpräsentierender Zellen mit dem Anstieg der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Zusammenhang steht. Da auch für $\gamma\delta$ -T-Zellen antigenpräsentierende Eigenschaften beschrieben wurden, könnte der Anstieg funktioneller antigenpräsentierender $\gamma\delta$ -T-Zellen möglicherweise zu einem Abfall anderer antigenpräsentierender Zellpopulationen geführt haben.

Alle anderen Zellpopulationen blieben durch den Einsatz der Zusatzstoffe unbeeinflusst.

Der Anstieg der $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Versuchsgruppe D könnte durch eine Aktivierung der Proliferation der Zellen durch Bockshornkleesamen erklärt werden. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Aktivierung porciner $\gamma\delta$ -T-Zellen durch pflanzliche Substanzen erfolgten bisher nur *in vitro* unter der Ermittlung der Proliferationsrate als Wachstumsparameter (Summerfield und Saalmüller, 1998). Dabei wurde der Einfluss der tropischen Pflanze *Acanthospermum (A.) hispidum* auf die Proliferation von Lymphozyten untersucht. Es zeigte sich durch den Zusatz von *A. hispidum* eine dosisabhängige Zunahme der Proliferationsrate mit Con A kostimulierter CD2⁺CD4⁺CD8⁺CD5^{low}CD25⁺- $\gamma\delta$ -T-Zellen. Der Effekt wurde auf eine direkte Interaktion der Lymphozyten mit pflanzlichen Kohlenhydraten zurückgeführt. Eine Steigerung der Proliferationsrate muriner und humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen zeigte sich *in vitro* auch unter dem Einfluss eines Extraktes aus *Funtumia elastica* (Graff et al., 2009). Auch hier wurde ein Einfluss kohlenhydrathaltiger Verbindungen des Präparates für die Effekte vermutet.

Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen ergaben, dass diese in der Lage sind, verschiedene Antigene über zelleigene Oberflächenmoleküle wie Toll-like Rezeptoren (TLR), Scavenger-Rezeptoren und mannanbindende Lektine zu erkennen (Takamatsu et al., 2006; Charerntantanakul und Roth, 2007; Juul-Madsen et al., 2010). Mannanbindende Lektine erkennen mannanhaltige Kohlenhydratstrukturen von Antigenen (Juul-Madsen et al., 2010). Mannanhaltige Kohlenhydrate pflanzlichen Ursprungs könnten somit als Antigen erkannt werden und eine Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen induzieren. Die Bindung eines Antigens an mannanbindende Lektine führt vermutlich zu einer Aktivierung des Komplementsystems und der Phagozytose sowie zu einer Proliferation von T-Zellen (Juul-Madsen et al., 2010). Demnach scheint eine Aktivierung von Immunzellen durch pflanzliche Kohlenhydratfraktionen aufgrund einer Interaktion mit membranständigen Rezeptoren möglich zu sein. Vermutlich scheinen pflanzliche Kohlenhydrate aber nicht nur $\gamma\delta$ -T-Zellen aktivieren zu können. Diese Annahme wurde auch durch *in vivo*-Studien bestätigt, wobei ein Großteil dieser Studien zu humanmedizinischen Fragestellungen durchgeführt wurde (Lo et al., 2005; Lo et al., 2006; Nantz et al., 2006; Nofrarías et al., 2006; Rowe et al., 2007; Percival, 2009). Durch den Einsatz von Weintraubensaft (*Vitis labrusca*) und verschiedener Frucht- und Gemüsesaftpulverkonzentrate konnte eine Aktivierung der Proliferation und Zellzahlzunahme von $\gamma\delta$ -T-Zellen beim Menschen beobachtet werden (Nantz et al., 2006; Rowe et al., 2007; Percival, 2009). Ebenfalls konnte durch den Einsatz eines Zuckerrohrextraktes sowie einer Pflanzenmischung unter dem Zusatz ätherischer Öle eine erhöhte Zytotoxizität von NK-Zellen und T-Zellen bei Schweinen erreicht werden (Lo et al., 2005; Lo et al., 2006; Nofrarías et al., 2006). Hinsichtlich der Einflüsse auf $\gamma\delta$ -T-Zellen liegen beim Schwein derzeit nur wenige Daten vor.

Dies liegt wohl auch darin begründet, dass die Funktionen von $\gamma\delta$ -T-Zellen beim Schwein noch nicht geklärt sind. Allerdings scheinen sie eine wichtige Funktion im Sinne eines Vermittlers zwischen angeborenen und erworbenen Immunmechanismen zu erfüllen. Dies begründet sich nicht nur aus ihrem relativ hohen Anteil bei Jungtieren (Charerntantanakul und Roth, 2007) sondern auch daher, dass für $CD8^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen antigenunspezifische zytotoxische Aktivitäten (Yang und Parkhouse, 1996) und für $MHCII^+$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen antigenpräsentierende Eigenschaften gegenüber $\alpha\beta$ -T-Zellen nachgewiesen werden konnten (Takamatsu et al., 2002; Šinkora et al., 2005). Damit lassen sie sich funktionell mit NK-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen vergleichen, deren Anteil bei jungen Tieren ebenfalls höher ist (Yang und Parkhouse, 1996). Da beide Zellpopulationen mit zunehmendem Alter quantitativ absinken, lassen die altersbedingten Besonderheiten der Verteilung von natürlichen Killerzellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen vermuten, dass die zelluläre Immunität bei jungen Tieren stärker an unspezifische Mechanismen gebunden ist, die an $\gamma\delta$ -T-Zellen und natürliche Killerzellen gekoppelt sind (Yang und Parkhouse, 1996).

Die Zunahme der $\gamma\delta$ -T-Zellen der Ferkel unter dem Einfluss von Bockshornkleesamen lässt auf eine Aktivierung unspezifischer zellulärer Immunmechanismen schließen, welche auf eine Interaktion membranständiger Rezeptoren mit pflanzlichen Kohlenhydratfraktionen des Bockshornkleesamens zurückzuführen sein könnte.

5.2.4.3. Phänotypisierung der intraepithelialen Leukozyten im proximalen Jejunum der Ferkel

Die Ergebnisse der durchflusszytometrisch ermittelten intraepithelialen Immunzellpopulationen des proximalen Jejunums konnten keinen Einfluss der eingesetzten Pflanzenpräparate auf die relative Verteilung der einzelnen Zellpopulationen zeigen.

Im Hinblick auf die beobachteten Effekte im Blut kann vermutet werden, dass es durch Bockshornkleesamen zu einer Stimulation des Immunsystems gekommen ist.

Eine mögliche Erklärung der Ergebnisse könnte darin liegen, dass aktivierte Immunzellen aus dem Darmepithel in die intestinalen Lymphknoten ausgewandert sind und der Zeitpunkt der Probennahme möglicherweise vor ihrer endgültigen Zielfindung (Homing) erfolgte. In anderen Studien zeigte sich bei Verabreichung aktiver Substanzen ätherischer Öle bei Schweinen eine unterschiedliche Präsenz von Immunzellen in den Kompartimenten des Darms (Nofrarías et al., 2006). Während sich die Zellzahl der B-Lymphozyten in den ilealen Lymphknoten reduzierte, steigerte sich durch die Verabreichung einer Mischung aus Carvacrol (5%), Zimtaldehyd (3%) und Capsicum-Oleoresin (2%) die lymphozytäre Infiltration in der *Lamina propria* des Ileums und Kolons. Die Zellzahlen der Makrophagen und $\gamma\delta$ -T-Zellen in den ilealen Lymphknoten blieben dagegen unbeeinflusst.

Durch die Bestimmung anderer intestinaler Immunparameter konnte ein immunmodulatorischer Einfluss pflanzlicher Substanzen im Darm von Hühnern (Guo et al., 2004; Hikosaka et al., 2007) und Mäusen (Sakurai et al., 1999) ermittelt werden. Dabei konnte durch die Ermittlung von Antikörpern auf eine Aktivierung von Plasmazellen in der *Lamina epithelialis* des Jejunums und im Zäkumgewebe durch Zuckerrohrextrakt und einen *Ascophyllum nodosum*-Extrakt geschlossen werden (Guo et al., 2004; Hikosaka et al., 2007).

Bei Mäusen ließ sich eine erhöhte Anzahl proliferierter B-Zellen in den Peyer'schen Platten des Jejunums durch Pektine aus der Wurzel des Sichelhasenohrs (*Bupleurum falcatum*) beobachten (Sakurai et al., 1999). Die unterschiedlichen Studien zeigen, dass es durch pflanzliche Substanzen zu einer Beeinflussung darmassoziierter Immunparameter kommen

kann. Für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten mehrere Ursachen in Frage kommen. Neben der Wahl der eingesetzten Pflanzenpräparate und damit verbundenen bioaktiven Substanzen spielt auch die Dosierung eine entscheidende Rolle für die beobachteten Effekte. Immunstimulierende Effekte wurden unter anderem auf die Anwesenheit pflanzlicher Polysaccharide zurückgeführt (Sakurai et al., 1999; Guo et al., 2004; Hikosaka et al., 2007). Dagegen scheinen ätherische Öle vermutlich dosisabhängig die Proliferation bestimmter Immunzellpopulationen zu hemmen und damit die Differenzierung anderer Immunzellpopulationen zu modulieren (Nofrarías et al., 2006).

Die in der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnisse sind bezüglich ihrer Aussagekraft zu immunologischen Effekten der eingesetzten Pflanzenpräparate im Darm noch nicht ausreichend. Eine mögliche Ursache könnte auch die im Vergleich zum Blut und zu den Epithelzellen des Darms insgesamt geringe Zellzahl an Leukozyten sein (Yang und Parkhouse, 1996). Die zusätzliche Phänotypisierung der Immunzellen aus den jejunalen Lymphknoten oder Peyer'schen Platten des Jejunums sowie die Bestimmung von Immunglobulinen aus isolierten B-Zellen oder Mukus hätte möglicherweise mehr Aufschluss über mögliche Effekte der Zusätze gegeben.

5.2.4.4. Proliferation peripherer Lymphozyten im Blut der Ferkel

Die mitogenstimulierte Proliferation der Lymphozyten aus dem Blut der Ferkel führte unter dem Einfluss der Pflanzenpräparate zu keinen Unterschieden in den Fütterungsgruppen. Das Prinzip des Proliferationstests beruht darauf, dass zuvor aktivierte Lymphozyten bei erneuter Stimulation zur klonalen Expansion aktiviert werden und somit eine Bestimmung der Lymphozytenfunktion möglich wird. Die eingesetzten Mitogene induzierten in allen Fütterungsgruppen eine Proliferation der Lymphozyten. Im Hinblick auf die Beurteilung der Lymphozytenfunktion bedeutet das, dass der Anteil aktivierter Lymphozyten vor der Mitogenstimulation in allen Gruppen annähernd gleich hoch war.

Dabei wurde die stärkste Proliferation durch Con A induziert, gefolgt von PHA-M und PWM. Die unterschiedliche Stimulierbarkeit der Lymphozyten in Abhängigkeit von den eingesetzten Mitogenen erklärt sich in einer Affinität verschiedener Subpopulationen gegenüber den Mitogenen. Während PWM zu einer Stimulaltung von B-Zellen und T-Zellen führt, erfolgt durch Con A und PHA-M eine ausschliessliche Stimulation von T-Zellen. In der Literatur liegen kontroverse Ergebnisse zu einer Beeinflussung pflanzlicher Zusätze auf die Proliferation von Lymphozyten vor, die sowohl stimulierende als auch ausbleibende Effekte beschreiben (Sakurai et al., 1999; Guo et al., 2004; Maass et al., 2005; Lo et al., 2006). Dabei scheinen stimulierende Effekte auch hier wieder aus einer Interaktion der Zellen mit Poly- und Oligosacchariden in den Pflanzenpräparaten zu resultieren (Ramesh et al., 2002). Möglicherweise erfolgt durch sie eine Erhöhung der DNA-Synthese in Lymphozyten mittels Regulierung der DNA-Polymerase (Guo et al., 2004).

Vermutlich erfolgte in der vorliegenden Studie keine systematische Stimulation der Lymphozyten durch die verabreichten Zusatzstoffe, was auf konzentrationsabhängige Einflüsse schließen lassen könnte. Ein nicht unerheblicher Einfluss der Konzentration auf proliferative Effekte von Lymphozyten ist in der Literatur belegt worden (Bin-Hafeez et al., 2003; Lo et al., 2005; Nofrarías et al., 2006; Serafino et al., 2008).

5.2.4.5. Phagozytoseaktivität peripherer Granulozyten und Monozyten im Blut der Ferkel

Das Testprinzip zur Ermittlung der Phagozytoseaktivität beruht auf einer Induktion der Phagozytose durch Anwesenheit eines Antigens. In diesem Falle wurde eine opsonierte *E. coli*-Suspension verwendet. Polymorphkernige Granulozyten und Monozyten sind phagozytierende Zellen und spielen eine wichtige regulatorische Rolle sowohl für die angeborenen als auch erworbenen Immunmechanismen (Kantari et al., 2008). Zu ihren Hauptaufgaben gehören die Präsentation von Antigenen gegenüber anderen Immunzellpopulationen, Phagozytose von Antigenen und Immunmodulation durch Expression verschiedener Zytokine (Dale et al., 2008). Die Phagozytose dient sowohl der Elimination von Zelldebris als auch der Zerstörung invasiver pathogener Keime (Dale et al., 2008). Zur Phagozytose befähigte Zellen exprimieren eine Vielzahl an Oberflächenrezeptoren (Dale et al., 2008). Während einige dieser Rezeptoren in der Lage sind, über intrazelluläre Signale die Phagozytoseaktivität zu vermitteln, erfolgt über andere Rezeptoren die Bindung von Antigenen (Kantari et al., 2008). Monozyten sind zusätzlich in der Lage, als antigenpräsentierende Zellen zu agieren, indem sie Teile von Antigenen MHCII-vermittelt an T-Zellen präsentieren (Kantari et al., 2008). Im Rahmen der Ermittlung der Phagozytoseaktivität peripherer Monozyten und Granulozyten aus dem Blut konnten keine fütterungsbedingten Einflüsse ermittelt werden.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu anderen Studien bei Schweinen, in denen die Phagozytoseaktivität von Monozyten und Neutrophilen durch den Einsatz von Zuckerrohrextrakt (Lo et al., 2005; Lo et al., 2006) und einer Mischung eines *Schizandra chinensis* und *Eleutherococcus senticosus*-Extraktes (Siwicki et al., 2004) deutlich erhöht werden konnte.

Pflanzliche Zusätze führten auch bei Mäusen (Tomoda et al., 1994; Bin-Hafeez et al., 2003), Ratten (Ramesh et al., 2002; Serafino et al., 2008), Hühnern (El-Abasy et al., 2002; Hikosaka et al., 2007) und Fischen (Nya und Austin, 2009; Sahu et al., 2007) zu einer Steigerung der Aktivität von phagozytierenden Zellen.

Dabei scheint sich eine Induktion der Phagozytoseaktivität durch pflanzliche Zusätze unabhängig vom Gesundheitsstatus der Tiere zu zeigen, da sowohl bei gesunden Tieren (Tomoda et al., 1994; Ramesh et al., 2002; Siwicki et al., 2004; Serafino et al., 2008), bei experimentell infizierten Tieren (El-Abasy et al., 2002; Lo et al., 2005; Lo et al., 2006; Hikosaka et al., 2007; Sahu et al., 2007; Nya und Austin, 2009) als auch bei immunsupprimierten Tieren (Serafino et al., 2008) eine deutliche Aktivitätszunahme beobachtet werden konnte. Eine Steigerung der Phagozytoseaktivität konnte *in vitro* an humanen Makrophagen durch den Zusatz von Eukalyptusöl erzielt werden (Serafino et al., 2008). Ebenfalls scheint die Aktivierung der Phagozytose durch mehrere Mechanismen und verschiedene aktiv wirksame Pflanzeninhaltsstoffe induziert zu werden. Durch Polyphenole wird neben einer direkten Interaktion mit membranständigen Rezeptoren auch eine indirekte Aktivierung über Interferon- γ -produzierende T-Zellen und andere Zytokine diskutiert (El-Abasy et al., 2002; Lo et al., 2005; Lo et al., 2006; Serafino et al., 2008). Ein Einfluss anderer pflanzlich wirksamen Inhaltsstoffe auf die Phagozytoseaktivität wie Poly- und Oligosaccharide wird allerdings nicht ausgeschlossen (Lo et al., 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien könnten wiederum auf konzentrationsabhängige Effekte zurückgeführt werden, da für die aktiv wirksamen Komponenten in den Zusatzstoffen (insbesondere Oligosaccharide) Effekte in der Literatur beschrieben wurden. Möglicherweise könnte sich die für eine Induktion der Phagozytoseaktivität effektiv wirksame Konzentration

für FRESTA® F zwischen 0,04% und 0,2% bzw. über 0,2% befinden. Die gleiche Überlegung gilt für die Konzentration des Bockshornkleesamenpulvers. Aufgrund der Bindungsaffinität zu mannanbindenden Lektinen auf Immunzellen ist eine kompetitive Hemmung bei zu hohen Mannankonzentrationen pflanzlicher Substanzen beobachtet worden, wodurch es zu einer Herabregulierung bzw. Hemmung der Phagozytoseaktivität kam (Konopski et al., 1993; Shibata et al., 1997; Lo et al., 2005). Unter diesen Aspekten könnten Effekte der eingesetzten Zusatzstoffe auf die Phagozytoseaktivität von polymorphkernigen Immunzellen künftig unter der Einwirkung anderer Konzentrationen beobachtet werden.

5.2.4.6. Konzentration von Haptoglobin im Serum der Ferkel

Die Haptoglobinkonzentration im Serum der Ferkel wurde durch die Futterzusätze nicht beeinflusst. Außerdem zeigten sich starke tierindividuelle Schwankungen. Die Serumkonzentration des Haptoglobins befand sich im Bereich anderer Studien (Gymnich et al., 2003).

Haptoglobin zählt neben C-reaktivem Protein (CRP) und Pig-MAP (Pig Major Acute Phase Protein) zu den Akute-Phase-Proteinen beim Schwein, die in der Leber gebildet und in das Blut sezerniert werden (Chen et al., 2003). Dabei handelt es sich um eine unspezifische, physiologische Reaktion des Organismus auf Störungen der Homöostase, die durch Infektionen, Gewebsverletzungen, Entzündungen oder Neoplasien verursacht werden können (Chen et al., 2003; Pallarés et al., 2008; Gómez-Laguna et al., 2010).

Haptoglobin bindet Hämoglobin, das aus zerstörten Erythrozyten freigesetzt wird und wirkt als Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex sowohl bakteriostatisch auf eisenabhängige Bakterien als auch antioxidativ (Knura-Deszczka, 2000; Dickhöfer, 2002). Eine Akute-Phase-Reaktion ist im Rahmen einer akuten Infektion und zum Teil auch als Impfreaktion zu erwarten. Mit diesem Hintergrund stellt sich die Frage, inwieweit eine Stimulation oder Reduktion der Synthese von Haptoglobin durch die Verabreichung von Zusatzstoffen sinnvoll ist. Im Rahmen der Prophylaxe von Herzinfarkten führte eine Langzeitverabreichung von Heidelbeersaft an Probanden mit erhöhtem Herzinfarktisiko zu einer signifikanten Reduktion der Konzentration von C-reaktivem Protein (Karlsen et al., 2010). Dieser Effekt wurde auf verschiedene pflanzliche Polyphenolverbindungen zurückgeführt, die über eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-kappa B (*nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B cells*) entzündliche Prozesse zu modulieren scheinen. Die Senkung des CRP-Spiegels wurde im Zusammenhang mit einem geringeren Infarktisiko positiv bewertet. Diese Aspekte spielen in der Tiermedizin allerdings keine relevante Rolle.

In Infektionsstudien mit *Salmonella* Typhimurium wurden deutlich erhöhte Haptoglobinwerte im Serum von Schweinen ermittelt, die als eine akute unspezifische Immunreaktion bewertet wurden (Turner et al., 2002a; Turner et al., 2002b). Der Einsatz der dabei zu untersuchenden Pflanzenextrakte *Ascophyllum nodosum* und *Quillaja saponaria* zeigte keine Effekte auf die Haptoglobinkonzentration.

Mit dem Hintergrund, dass Haptoglobin im Vergleich zu dem C-reaktiven Protein als sensitiver Parameter zur Ermittlung akuter Entzündungsreaktionen beim Schwein gilt, könnte eine mögliche Aktivierung durch pflanzliche Zusätze im Rahmen einer schnelleren Diagnostik sinnvoll sein, da erhöhte Werte auch bei klinisch unauffälligen Tieren nachzuweisen sind (Gymnich et al., 2003).

5.2.4.7. Konzentration spezifischer Antikörper gegen *Salmonella* Typhimurium im Serum der Ferkel

Für die Ermittlung spezifischer Antikörper erfolgte die Detektion der spezifischen Immunglobuline vom Isotyp G, M und A im Serum der Ferkel.

Für die spezifischen Immunglobulingehalte konnten keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen aufgezeigt werden. Unabhängig von den Futterzusätzen zeigten sich jedoch in allen Fütterungsgruppen erhöhte IgM-Gehalte, die als Impfreaktion gewertet wurden. Da naive B-Zellen nach Antigenkontakt zunächst IgM exprimieren, werden im Frühstadium einer Immunantwort vorrangig Immunglobuline der Klasse M im Plasma nachgewiesen (Butler et al., 2006). Infolge eines zytokinvermittelten Klassenwechsels in der Synthese der Immunglobulinisotypen von Plasmazellen werden im Verlaufe einer Immunantwort vermehrt Immunglobuline der Isotypen G und A gebildet. Die Ausbildung von Antikörpern unterliegt dabei starken tierindividuellen Varianzen (Nielsen et al., 1995; Szabó, 2008). Spezifische Salmonellen-Antikörper können bereits nach sieben Tagen im Serum von Schweinen nachgewiesen werden (Peternel, 2006; Ullrich et al., 2007; Szabó, 2008). Dabei scheinen zuerst IgM und IgG zu konvertieren, gefolgt von IgA nach 14 bis 21 Tagen (Nielsen et al., 1995; Szabó, 2008). Während die Serumspiegel von IgM und IgA im Anschluss allmählich wieder fallen, können erhöhte IgG-Werte über einen längeren Zeitraum persistieren (Peternel, 2006; Ullrich et al., 2007).

Eine signifikante Erhöhung des Isotyps IgG konnte nur bei vereinzelt Tieren im SALMOTYPE® Pig Screen ELISA ermittelt werden. Dagegen zeigten sich keine erhöhten IgG Werte im ELISA, der am Institut für Tier- und Umwelthygiene der Freien Universität Berlin unter Verwendung des Phagentyps DT104 von *Salmonella enteritidis* Typhimurium durchgeführt wurde. Diese Meßdifferenzen sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Sensitivitäten und Spezifitäten der Testsysteme zurückzuführen. Der Nachweis von Antikörpern des Isotyps IgG bei Einzeltieren ist vermutlich auf individuelle Effekte hinsichtlich des Zeitpunktes der Serokonversion zurückzuführen. Für die Antikörperkonzentration des Isotyps IgA konnten am 23. Tag nach der Erstimpfung keine Veränderungen im Vergleich zu den Werten vor der Impfung ermittelt werden.

In einem ähnlichen Impfversuch mit Schweinen unter der Verwendung des Lebendimpfstoffes SALMOPORC® erfolgten unter verschiedenen Impfreimen Messungen der Antikörper vom Isotyp IgG, M und A (Ullrich et al., 2007). Dabei zeigten sich drei Tage nach der zweiten oralen Impfung ansteigende IgG- und IgA-Antikörperkonzentrationen im Serum der Tiere, die sich nach 21 Tagen auf einem hohen Niveau einpegelten.

In der vorliegenden Studie erfolgte die Probenentnahme neun Tage nach der zweiten Impfung beziehungsweise 23 Tage nach der Erstimpfung. Der Zeitpunkt der Probenentnahme reichte daher möglicherweise nur für den Nachweis einer Serokonversion des Isotyps M, der sowohl durch die erste als auch durch die zweite Impfung erfolgen konnte. Wahrscheinlich war der Zeitabstand von der zweiten Impfung bis zur Probenentnahme für den Nachweis einer Serokonversion der Isotypen IgG und IgA zu kurz. Da es sich nur um eine Ein-Punkt-Messung handelt, müssen die vorliegenden Ergebnisse der Konzentrationen von IgG und IgA nicht dafür sprechen, dass eine Serokonversion ausgeblieben ist. Die positiven Ergebnisse der Antikörperkonzentration von IgG einzelner Tiere könnten für eine beginnende Serokonversion sprechen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch die orale Immunisierung gegen *Salmonella* Typhimurium eine systemische Immunantwort erfolgte und spezifische Antikörper gebildet wurden. Somit muss eine Interaktion zwischen dem lokalen und systemischen Immunsystem

stattgefunden haben. Inwieweit eine humorale Immunität im Gastrointestinaltrakt bestand, wurde in der Studie nicht untersucht. Sekretorisches IgA stellt den wichtigsten schützenden humoralen Faktor im Darm dar. Nach erfolgter Serokonversion lassen sich IgA-Moleküle vermehrt an Schleimhäuten nachweisen. Möglicherweise könnten im Darm erhöhte Antikörperwerte des Isotyps IgA für eine humorale Immunität nach oraler Impfung sprechen, da der erste Antigenkontakt auf den Schleimhäuten des Darms erfolgte. Dazu wären Untersuchungen von Kot oder Digesta notwendig gewesen.

Inwieweit die pflanzlichen Zusätze einen Einfluss auf die Antikörpertiter der Isotypen IgG und IgA haben, kann in der Studie anhand der vorliegenden Ergebnisse somit nicht eindeutig beurteilt werden. Diese Effekte könnten unter den Bedingungen einer zeitlich länger andauernden Studie von sechs Wochen und höher frequentierter Probenentnahmen sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Impfung erneut untersucht werden.

In der Literatur liegen unterschiedliche Ergebnisse zum Einfluss pflanzlicher Zusätze auf die Antikörperbildung bei Tieren vor. Positive Effekte durch den Einsatz pflanzlicher Präparate auf die spezifische Antikörperbildung im Serum und der Digesta nach Vakzination oder Infektion mit verschiedenen Pathogenen zeigten sich bei Mäusen (Chavali et al., 1988), Hühnern (Guo et al., 2004; Hikosaka et al., 2007) und Schweinen (Böhmer, 2005; Ilsley et al., 2005). Bei den eingesetzten Präparaten handelte es sich sowohl um polyphenol- (Hikosaka et al., 2007), polysaccharid- (Guo et al., 2004) oder saponinreiche (Ilsley et al., 2005) Fraktionen verschiedener Pflanzenteile als auch um komplexe verarbeitete Pflanzenteile (Böhmer, 2005).

In anderen Studien wurden durch den Einsatz pflanzlicher Substanzen wie ätherischer Öle (Basmacioğlu Malayoğlu et al., 2010) oder Extrakte von *Ascophyllum nodosum* (Turner et al., 2002b) und *Quillaja saponaria* (Turner et al., 2002a) keine Effekte beschrieben. Mögliche Erklärungen könnten auch hier wieder konzentrations- und wirkstoffabhängige Einflüsse liefern.

Immunmodulatorische Effekte liessen sich auch durch die Verabreichung anderer Futterzusatzstoffe wie Probiotika und Präbiotika beobachten. Die immunmodulatorischen Wirkungen von Probiotika scheinen durch die verschiedenen immunogenen Eigenschaften der eingesetzten Bakterienstämme induziert zu werden (Scharek et al., 2007). Allerdings scheint die Ausprägung der Effekte aber ähnlich wie bei pflanzlichen Substanzen von der Art des Bakterienstammes und der verwendeten Konzentrationen abhängig zu sein. Bei den Probiotika geht man davon aus, dass Bakterienstämme, die nicht zu der kommensalen Intestinalflora des Wirtes gehören, eine stärkere Immunantwort induzieren als Stämme, mit denen der Wirt in einer Symbiose lebt (Scharek et al., 2007). Pflanzliche Zusatzstoffe induzieren im Vergleich dazu in Abhängigkeit ihrer aktiv wirksamen Inhaltsstoffe verschiedene Immunreaktionen.

Effekte auf spezifische zelluläre Immunreaktionen wie die Zellzahlerhöhung der CD8⁺-Lymphozyten der *Lamina propria* und die von CD4⁺-T-Zellen im Blut zeigten sich durch den Einsatz der Probiotikastämme *Bacillus cereus*, *Lactobacillus fermentum* und *Pediococcus acidilactici* (Scharek et al., 2007; Lessard et al., 2009; Wang et al., 2009). Verschiedene Laktobazillusstämme steigerten sowohl die Zellzahl der Leukozyten bei Ratten (Flore et al., 2010) als auch die Phagozytoseaktivität und Immunglobulin A-Konzentration im Jejunum von Schweinen nach intranasaler Immunisierung gegen Salmonellen (Letellier et al., 2001). Erhöhte Immunglobulin A- und G-Konzentrationen im Serum konnten auch durch die

Verabreichung von *Enterococcus faecium* bei Hunden nach Immunisierung gegen Staupe beobachtet werden (Benyacoub et al., 2003).

Allerdings konnten auch bei Probiotika ausbleibende Effekte auf spezifische Immunreaktionen beobachtet werden. So zeigte die Verabreichung eines *Enterococcus faecium*-Stammes an Schweine weder eine Beeinflussung der IgA-Konzentration im Darm noch Effekte auf die IgG-Gehalte im Serum der Tiere (Scharek et al., 2005; Broom et al., 2006). Ebenfalls zeigten sich keine Effekte auf zelluläre intestinale Immunparameter (Scharek et al., 2005). *Enterococcus faecium* zeigte auch keinen Einfluss auf unspezifische Immunparameter bei Hunden, die zu Studienbeginn schon mit Giardien infiziert waren (Simpson et al., 2009). Dagegen scheint die Verabreichung von Probiotika vor einer Infektion zur Stimulation des Immunsystems sinnvoller. Dadurch konnte sowohl die spezifische Antikörperbildung als auch die Widerstandskraft gegen virale und bakterielle Infektionen bei Hühnern und Fischen erhöht werden (Li et al., 2009; Sharifuzzaman und Austin, 2009; Son et al., 2009).

Hinsichtlich eines Vergleiches pflanzlicher Futterzusätze mit Präbiotika in Bezug auf eine mögliche Kausalität immunmodulatorischer Wirkungen scheinen Ähnlichkeiten vorzuliegen. Diese Tatsache begründet sich darin, dass Präbiotika oft pflanzlichen Ursprungs sind und ein immunmodulatorischer Einfluss vermutlich auch über eine Interaktion mit Kohlenhydratrezeptoren auf Immunzellen induziert wird (Ryz et al., 2009). Daneben wird für Präbiotika auch ein indirekter immunmodulatorischer Einfluss beschrieben, indem sie die Proliferation nutzbringender Bakterien im Darm induzieren und damit immunologische Effekte positiv zu beeinflussen scheinen (Li et al., 2007; Ryz et al., 2009). In Studien mit Präbiotika konnte ein Anstieg der Populationsdichte intestinaler Milchsäurebakterien beobachtet werden (Castillo et al., 2006; Nofrarías et al., 2006). Immunmodulatorische Einflüsse durch die Verabreichung von Präbiotika in Form von kurzkettigen oder langkettigen Oligosacchariden konnten unter anderem bei Fischen (Li et al., 2007), Mäusen (Mizubuchi et al., 2005), Ratten (Ryz et al., 2009) und Hühnern (Li et al., 2009) erzielt werden. Während die Effekte von Präbiotika hauptsächlich auf pflanzliche Kohlenhydrate zurückgeführt werden, scheinen die immunmodulatorischen Effekte pflanzlicher Zusatzstoffe neben pflanzlichen Kohlenhydratverbindungen auch durch andere aktiv wirksame Inhaltsstoffe verursacht zu werden und damit auch in ihrem Wirkungsspektrum komplexer zu sein.

Die verschiedenen Studien zeigen aber auch, dass die beobachteten immunologischen Effekte durch Pro- und Präbiotika sowie durch pflanzliche Zusätze immer wieder entscheidend durch die eingesetzten Konzentrationen beeinflusst werden. Zusammenfassend zeigt sich auch, dass es im Darm zu einer gegenseitigen Beeinflussung verschiedenen Futterzusätze kommen kann und sich dadurch synergistische Effekte zu ergeben scheinen (Li et al. 2009).

5.2.5. Leistungen und verdauungsphysiologische Parameter der Ferkel

5.2.5.1. Lebendmasse und Tageszunahmen

Die durchschnittliche Lebendmasseentwicklung und mittleren Tageszunahmen der Ferkel wurden durch die Futterzusätze nicht beeinflusst. Am Ende des Versuchszeitraumes lag die durchschnittliche Lebendmasse in der Kontrollgruppe bei 16,7 kg ($\pm 0,78$), in der Versuchsgruppe B bei 16,5 kg ($\pm 1,83$), in der Versuchsgruppe C bei 16,2 kg ($\pm 1,09$) und in der Versuchsgruppe D bei 17,4 kg ($\pm 1,30$). Die Lebendmasse der Einzeltiere zeigte bei

Versuchsbeginn eine große Streuung (5,32 kg-13,0 kg), wodurch die Betrachtung der Durchschnittswerte nur wenig Aussagekraft besitzt, da die Tiere mit niedrigen Startgewichten auch zum Ende des Versuches die geringsten Lebendmassezunahmen zeigten. Da die Ferkel aber anhand ihrer Lebendmasse gleichmäßig auf alle Fütterungsgruppen aufgeteilt wurden und über einen gleichlangen Fütterungszeitraum unter gleichen Bedingungen gehalten wurden, ist eine eingeschränkte Beurteilung der durchschnittlichen Leistungsparameter möglich. In der ersten Woche zeigten die Tiere eine niedrige Futterraufnahme, die sich auf die Lebendmasseentwicklung nach sieben Tagen als Körpermasseverlust oder –stagnation auswirkte. Diese Beobachtungen stehen in einem engen Zusammenhang mit der Adaption der Ferkel an die nach dem Absetzen auftretenden Veränderungen wie Futterumstellung und Umweltbedingungen (Pluske et al., 1997; Le Dividich und Séve, 2000; Weary et al., 2008). Aufgrund der geringen Tierzahl, die in die statistische Auswertung aufgenommen wurden, kann nur eine eingeschränkte Interpretation der Leistungsparameter erfolgen. Daneben ist der Fütterungszeitraum ebenfalls als Kriterium zur Beurteilung der Ergebnisse zu betrachten.

Da die erste Woche als Anpassungswoche gewertet werden muss und somit keine Aussage zu leistungsbezogenen Parametern zulässt, konnte eine Erhebung leistungsbezogener Daten nur in dem verbleibenden Zeitraum von 21 Tagen erfolgen. Es konnte kein signifikanter Einfluss von FRESTA® F und Bockshornkleesamen auf die Entwicklung der Lebendmassezunahme festgestellt werden. Eine tendenzielle Erhöhung der Lebendmassezunahme durch den Einsatz pflanzlicher Substanzen konnte in mehreren Studien beobachtet werden, jedoch führten Studien zu Einflüssen pflanzlicher Substanzen auf Leistungsparameter bei Tieren oft zu kontroversen Ergebnissen.

Während in der vorliegenden Studie die Versuchsgruppe D im Vergleich zur Kontrollgruppe eine tendenziell erhöhte Lebendmasse (6,1%) am Ende des Versuchszeitraumes zeigte, konnten allerdings keine Einflüsse von Bockshornkleesamen auf die Tageszunahmen beobachtet werden. Durch den Einsatz von FRESTA® F wurden weder eine erhöhte Lebendmasse noch erhöhte Tageszunahmen erzielt. Dagegen zeigten sich in einer anderen Studie durch den Einsatz von FRESTA® F in der Ferkelaufzucht erhöhte Tageszunahmen von 4% (Wetscherek, 2005). Möglicherweise ist dieser Effekt im Vergleich zur vorliegenden Studie durch einen längeren Fütterungszeitraum zu erklären. Durch den Einsatz einer pflanzlichen Mischung aus *Andrographis paniculata*, *Boerhaavia diffusa* und *Eclipta alba* und einer Mischung aus Oregano, Anis, Zitronengras und Fruktooligosacchariden konnten die Tageszunahmen und die Lebendmassezunahmen bei Schweinen erhöht werden (Wetscherek, 2002; Wetscherek et al., 2005; Kroismayr et al., 2006). Diese Effekte scheinen eng korreliert mit einer effizienteren Futtermittelverwertung, was von verschiedenen Autoren auf die Zusammensetzung und den Anteil aktiv wirksamer Substanzen in den Pflanzenpräparaten zurückgeführt wird (Wetscherek, 2005; Wetscherek et al., 2005; Kroismayr et al., 2006). Daneben scheint auch der Verabreichungszeitraum einen entscheidenden Einfluss auf die erwünschten Effekte zu zeigen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch beim Geflügel gemacht. Dort führte der Einsatz von Ingwer bei Legehennen zu einem verbesserten Futtermittelverzehr und die Verabreichung von Anissaat bei Broilern zu erhöhten Lebendmassezunahmen (El-Deek et al., 2002; Wenk, 2005). Dagegen zeigte der Einsatz von *Echinacea purpurea* bei Schweinen, Legehennen und Broilern sowie einer Pflanzenmischung aus Inulin und ätherischen Ölen bei Schweinen keine Effekte auf die Leistungsparameter Lebendmasse, Tageszunahmen, Geburtsgewicht, Futtermittelverwertung und Legeleistung (Böhmer, 2005; Muhl und Liebert, 2007).

5.2.5.2. Futteraufnahme der Ferkel

Der Einsatz der Futterzusätze zeigte keine Unterschiede auf die Futteraufnahme zwischen den Fütterungsgruppen.

In der Versuchsgruppe D konnte eine tendenzielle Erhöhung (6,8%) der Futteraufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden, was vermuten lässt, dass sich der Geruch oder der Geschmack von Bockshornkleesamen möglicherweise positiv auf die Futteraufnahme auswirkten. Eine erhöhte Futteraufnahme durch den Einsatz pflanzlicher Substanzen bei Schwein und Geflügel wurde in anderen Studien beschrieben und sowohl mit der Schmackhaftigkeit einzelner bioaktiver Inhaltsstoffe als auch durch die Förderung der Sekretion von Verdauungsenzymen begründet (El-Deek et al., 2002; Wenk, 2005; Kroismayr et al., 2006; Westendarp, 2006; Franz et al., 2010). Da in vielen Studien gezeigt werden konnte, dass die Konzentration der eingesetzten pflanzlichen Futterzusätze einen entscheidenden Einfluß auf die Futteraufnahme besonders im Hinblick auf die Schmackhaftigkeit hat, sollte dieser Aspekt bei der Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse für alle Versuchsgruppen berücksichtigt werden (Wetscherek, 2002; Wenk, 2005; Windisch et al., 2008; Franz et al., 2010). Möglicherweise könnte sich die Futteraufnahme durch die Wahl anderer Konzentrationen der pflanzlichen Futterzusätze ändern.

5.2.5.3. Futteraufwand

Für den Futteraufwand konnten keine Einflüsse der Futterzusätze in den Versuchsgruppen beobachtet werden.

Etliche Studien zeigen, dass der Einsatz pflanzlicher Futterzusätze zu kontroversen Ergebnissen bezüglich des Futteraufwandes führt (Wenk, 2005; Wetscherek, 2005; Chrastinová et al., 2007; Muhl und Liebert, 2007; Oswald und Wetscherek, 2007; Franz et al., 2010). Die unterschiedlichen Ergebnisse werden auf die Wahl und Konzentration der eingesetzten Pflanzenmaterialien zurückgeführt (Yang et al., 2009; Franz et al., 2010). Ein geringerer Futteraufwand wurde in einigen Studien durch eine Aktivitätssteigerung von Verdauungsenzymen durch Bitterstoffe und ätherische Öle postuliert (Schmidt et al., 2002; Thieme, 2005). Damit könnte es zu einer Verbesserung der Absorption von Nährstoffen kommen (Franz et al., 2010).

5.2.5.4. Scheinbare Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins

Für die scheinbare Gesamtverdaulichkeit des Rohproteins konnten zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede durch den Zusatz von FRESTA® F und Bockshornkleesamen beobachtet werden. Auf den reduzierten Probenumfang ist hier nochmals hinzuweisen. In anderen Studien konnte durch den Zusatz ätherischer Öle (Carvacrol, Anethol, Limonen) und von Mannanligosacchariden die Rohprotein- und Aminonsäurenverdaulichkeit bei Schweinen verbessert werden (Stoni, 2005; Nochta et al., 2009). Der Zusatz eines mannanligosaccharidreichen Produktes verbesserte die ileale Verdaulichkeit von Lysin, Methionin, Cystin und Threonin (Nochta et al., 2009). Eine verbesserte Nährstoffverdaulichkeit wird oft dadurch begründet, dass bioaktive Komponenten pflanzlicher Zusätze sowohl erwünschte Darmbakterien fördern als auch einen Effekt auf Verdauungsenzyme haben könnten (Platel und Srinivasan, 2000; Platel et al., 2002; Platel und Srinivasan, 2004; Stoni, 2005).

5.2.5.5. pH-Wert in der Digesta der Ferkel

Für die pH-Werte im Duodenum, proximalen Jejunum und Kot konnten keine fütterungsbedingten Einflüsse aufgezeigt werden.

Im distalen Jejunum, Ileum, Zäkum und Kolon zeigten sich dagegen pH-Wert senkende Einflüsse in den Versuchsgruppen. Durch die Verabreichung von 0,04% FRESTA® F konnte in der Versuchsgruppe B eine pH-Wertsenkung im Ileum erreicht werden. Durch den Einsatz einer höheren Konzentration von FRESTA® F (0,2%) wurde neben einer pH-Wertsenkung im Ileum auch eine Senkung im Zäkum beobachtet. Die Verabreichung von 0,15% Bockshornkleesamen führte zu einer Senkung des pH-Wertes im distalen Jejunum, Zäkum und Kolon.

Diese Ergebnisse beruhen vermutlich auf präbiotischen Effekten, die auf den Anteil fermentierbarer Kohlenhydrate in den Zusätzen zurückgeführt werden könnten. Die Konzentration scheint dabei die Verfügbarkeit für die Bakterien in distalen Bereichen des Darms zu beeinflussen, da durch eine höhere Konzentration von FRESTA® F eine zusätzliche pH-Wertsenkung im Zäkum beobachtet wurde. Diese Beobachtung könnte vermutlich auf unterschiedliche Verfügbarkeiten der Kohlenhydrate für einzelne Bakterienpopulationen zurückgeführt werden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in Studien durch den Einsatz von Inulin (pflanzliche Oligosaccharide aus der Chicoreepflanze) gemacht werden (Rehman et al., 2008; Mair et al., 2010). Dabei führte die Verabreichung von Inulin bei Schweinen zu einer pH-Wertsenkung im Ileum (Mair et al., 2010). Bei Broilern wurde durch die Verabreichung von Inulin eine pH-Wertsenkung im Zäkum erzielt (Rehman et al., 2008). Durch den Einsatz anderer aktiv wirksamer Pflanzeninhaltsstoffe wie ätherische Öle konnte dagegen kein Einfluss auf den pH-Wert im Ileum und Zäkum von Schweinen erreicht werden (Manzanilla et al., 2004; Manzanilla et al., 2009).

In Studien konnte durch den Zusatz verschiedener pflanzlicher Oligosaccharide ein höheres Wachstum von Bifidobakterien und Laktobazillen gezeigt werden. Der daraus resultierende Anstieg bakterieller Stoffwechselprodukte kann zu einer pH-Wertsenkung im Chymus führen (Mitsuoka et al., 1987; Wang und Gibson, 1993; Gibson und Roberfroid, 1995; Rehman et al., 2008; Mair et al., 2010). Während niedrige pH-Werte das Wachstum von Bifidobakterien und Laktobazillen positiv zu beeinflussen scheinen, gibt es Hinweise auf eine Hemmung des Wachstums von *E. coli* und Clostridien (Mitsuoka et al., 1987; Wang und Gibson, 1993; Yang et al., 2008). Zusätzlich scheint die Fermentierung pflanzlicher Oligosaccharide von laktatbildenden Bakterien bevorzugt zu werden (Mitsuoka et al., 1987; Rehman et al., 2008). Aufgrund unterschiedlicher Fermentationskapazitäten der intestinalen Mikrobiota zeigen sich Differenzen in den Profilen ihrer Stoffwechselmetaboliten (Mitsuoka et al., 1987; Gibson und Roberfroid, 1995; Rehman et al., 2008). Als Stoffwechselendprodukte des bakteriellen Kohlenhydrat- und Proteinabbaus entstehen Gase wie Methan und Kohlendioxid, kurzkettige Fettsäuren, Laktat, Ammoniak, biogene Amine, Phenole und Indole (Gibson und Roberfroid, 1995). Anhand der Fermentationsprofile können somit Rückschlüsse auf den Einfluss des Futters auf die Intestinalflora gezogen werden (Manzanilla et al., 2004; Rehman et al., 2008). Die bakteriellen Metaboliten stellen einen oft genutzten Parameter zur Charakterisierung bakterieller Aktivitäten im Darm dar (Rehman et al., 2008).

Die pH-Wertsenkung in der Digesta des distalen Jejunums, Ileums, Zäkums und Kolons durch FRESTA® F und Bockshornkleesamen ist möglicherweise auf einen Anstieg der Zahl oder der Stoffwechselaktivität von laktatbildenden Bakterien zurückzuführen. Dieser Effekt könnte durch enthaltene Oligosaccharide (Galaktomannane) verursacht worden sein, die als

Nicht-Stärke-Polysaccharide den Bakterien im Darm als Nährstoffquelle dienen und somit präbiotische Eigenschaften zeigen.

Metaboliten des bakteriellen Stoffwechsels im Chymus

5.2.5.6. D-/L-Laktat

Die im Rahmen der Studie ermittelten Konzentrationen für D- und L-Laktat im Dünndarm und Dickdarm der Ferkel wurden durch die Zusatzstoffe nicht signifikant beeinflusst. Die Laktatkonzentrationen in der Digesta des distalen Jejunums und des Ileums lagen allerdings in allen drei Versuchsgruppen über denen der Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Auch in der Digesta des Zäkums konnte für die Versuchsgruppen C (FRESTA[®] F 0,2%) und D (Bockshornkleesamen 0,15%) im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine tendenzielle Erhöhung der Laktatkonzentration beobachtet werden.

Da die Bildung von Laktat im Rahmen der bakteriellen Fermentation erfolgt, ist der Anstieg der Laktatkonzentration vermutlich auf eine Zunahme laktatbildender Bakterien zurückzuführen (Mair et al., 2010). Eine Erhöhung der Laktatkonzentration konnte auch in anderen Studien durch den Einsatz von Inulin bei Schweinen im Kolon und bei Broilern im Ileum und Zäkum beobachtet werden (Rehman et al., 2008; Mair et al., 2010). Die Ergebnisse wurden auf die in Inulin enthaltenen Oligosaccharide zurückgeführt. Diese scheinen sich positiv auf das Wachstum laktatbildender Bakterien auszuwirken (Gibson et al., 2004), da sie den Bakterien als Nährstoffquelle zur Verfügung stehen. Neben der erhöhten Laktatkonzentration konnte auch eine tendenzielle Erhöhung der Anzahl an Bifidobakterien und Laktobazillen im Kolon von Schweinen ermittelt werden (Mair et al., 2010). Eine Fermentation von Oligosacchariden ist beim Schwein auch schon im Ileum möglich (Mair et al., 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können diese Befunde stützen, da zumindest in zwei Versuchsgruppen ein Anstieg der Laktatkonzentration im distalen Jejunum und Ileum durch die Futterzusätze erreicht wurde. Außerdem konnte durch den Einsatz einer höheren Konzentration von FRESTA[®] F auch noch ein Einfluss auf die Laktatkonzentration im Zäkum beobachtet werden, während dieser bei der geringeren Dosierung nur auf das Ileum beschränkt war. Durch den Einsatz höherer Konzentrationen scheint trotz der präzökalen Fermentationsprozesse eine höhere Menge an fermentierbaren Nährstoffen für die Bakterien im Zäkum zur Verfügung zu stehen. Die erhöhte Konzentration an Laktat könnte auch durch eine Veränderung der metabolischen Aktivität laktatbildender Bakterien verursacht worden sein. Demnach wäre die Konzentrationserhöhung auf eine von den Bakterien ausschließliche Metabolisierung zu Laktat erfolgt und nicht durch ein vermehrtes Wachstum (Mair et al., 2010). Um diese Verschiebung charakterisieren zu können, wären allerdings quantitative Analysen der Bakterienpopulation aus der Digesta der einzelnen Darmabschnitte notwendig gewesen. Dieser Aspekt könnte in weiterführenden Studien untersucht werden.

5.2.5.7. Kurzkettige Fettsäuren

Für die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren konnten im proximalen Dünndarm und im gesamten Dickdarm keine fütterungsbedingten Einflüsse ermittelt werden. Allerdings konnte im Ileum ein signifikanter Anstieg der Azetatkonzentration in der 0,2%igen FRESTA[®] F-Gruppe beobachtet werden, die zu einem Anstieg der Gesamtkonzentration kurzkettiger Fettsäuren im Ileum führte. Dagegen zeigte sich in der Bockshornkleesamengruppe eine signifikante Senkung des relativen Anteils von Azetat, die allerdings keine Auswirkungen auf

die Gesamtkonzentration zeigte. Im Vergleich zu den anderen Fütterungsgruppen konnte durch Bockshornkleesamen eine Veränderung des Fermentationsprofils im Ileum beobachtet werden mit einem Anstieg der Propionat-, i-Butyrat- und i-Valeriansäurekonzentrationen. Allerdings zeigten sich wiederum starke tierindividuelle Schwankungen, die damit zu einer Einschränkung der Aussagekraft einer vergleichenden Interpretation führen.

Die Fettsäuremuster resultieren aus dem qualitativen Angebot fermentierbarer Substanzen, insbesondere der Kohlenhydrate (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Erhöhte Azetatkonzentrationen weisen darauf hin, dass mehr fermentierbare Kohlenhydrate den Dickdarm erreicht haben (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Die erhöhte Azetatkonzentration in der Versuchsgruppe C lässt auf eine erhöhte bakterielle metabolische Aktivität schließen. Unter dem Aspekt, dass Azetat einen Hauptmetaboliten heterofermentativer laktatbildender Bakterien darstellt (Macfarlane und Macfarlane, 2003), könnte das pflanzliche Testprodukt insbesondere diese Bakterienarten beeinflussen. Diese Annahme wird durch den gleichzeitig ermittelten Anstieg der Laktatkonzentration im Ileum und Zäkum gestützt. Eine Zunahme der Azetatkonzentration im Dickdarm von Schweinen konnte auch durch die Verabreichung von Galaktooligosacchariden und Inulin erreicht werden (Tzortzis et al., 2005).

Die Veränderungen des Fettsäureprofils durch Bockshornkleesamen könnten möglicherweise auf eine eingeschränkte ileale Verfügbarkeit fermentierbarer Kohlenhydrate für die Azetatsynthese hinweisen, wodurch die Synthese anderer Fettsäuren erhöht wird (Macfarlane and Macfarlane, 2003). In diesem Zusammenhang wäre die Betrachtung der Verteilung der Bakterienpopulationen und pH-Werte im Ileum interessant, um die kausalen Zusammenhänge genauer einordnen zu können.

5.3. Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit ergibt Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen pflanzlicher Zusatzstoffe bzw. komplexer phytogener Mischungen beim Schwein. Die *in vitro* festgestellte Reduktion der Adhäsion eines enteropathogenen *E. coli*-Stamms an eine intestinale Epithelzelllinie wäre in weitergehenden Untersuchungen, z.B. Infektionsversuchen, zu charakterisieren. Die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen lassen keine eindeutigen Schlussfolgerungen hinsichtlich einer immunmodulatorischen Wirkung zu. Neben der Erhöhung des Anteils von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut konnte gleichzeitig eine Senkung des Anteils antigenpräsentierender Zellen durch den Einfluss von Bockshornkleesamen im Futter ermittelt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Stefanie Gärtner: **Untersuchungen zum Einfluss pflanzlicher Futterzusatzstoffe auf verdauungsphysiologische, mikrobiologische und immunologische Parameter bei Absetzferkeln**

Die vorliegende Studie wurde zur Evaluierung möglicher Effekte eines auf einer Pflanzenmischung basierenden Futterzusatzstoffes und zwei weiteren pflanzlichen Komponenten (Bockshornkleesamen und Süßholzwurzel) auf einen enteropathogenen *Escherichia (E.) coli*-Stamm durchgeführt. Des Weiteren sollten mögliche Effekte auf die intestinale Mikrobiota und das Immunsystem bei abgesetzten Ferkeln überprüft werden.

Zur Ermittlung möglicher antiadhäsiver Effekte gegenüber einem enteropathogenen *E. coli*-Stamm erfolgten durchflusszytometrische Untersuchungen in einem *in vitro*-Infektionsmodell mit einer IPEC-J2-Zelllinie. Ergänzend wurden Untersuchungen zur Bindungskapazität der Pflanzenmaterialien an den *E. coli*-Stamm durch Ermittlung des bakteriellen Wachstums der an die auf einer Mikrotiterplatte beschichteten Pflanzenmaterialien gebundenen Bakterien durchgeführt. Für die Ermittlung antimikrobieller Effekte gegenüber dem *E. coli*-Stamm wurde das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen der Pflanzenmaterialien ermittelt. Anschließend wurde ein Fütterungsversuch mit insgesamt 48 männlichen kastrierten Ferkeln in drei Versuchsdurchgängen durchgeführt. Die Ferkel wurden in jedem Durchgang gleichmäßig auf vier Fütterungsgruppen aufgeteilt, sodass pro Versuchsdurchgang jeder Fütterungsgruppe vier Ferkel zugeordnet werden konnten. Alle Tiere erhielten ein bedarfsdeckend zusammengesetztes Alleinfutter für Ferkel, dem in der Versuchsgruppe B 0,04% FRESTA® F zugesetzt wurden, Versuchsgruppe C erhielt 0,2% FRESTA® F und Versuchsgruppe D 0,15% Bockshornkleesamenpulver. Am fünften und 19. Versuchstag wurden die Ferkel oral mit einem Lebendimpfstoff (SALMOPORC®, Firma IDT) gegen *Salmonella* Typhimurium vakziniert, um einen möglichen Einfluss auf die Ausbildung spezifischer Antikörper im Serum zu ermitteln. Am 28. und 29. Versuchstag wurden Blut- und Darmproben sowie Digestaproben aus dem Duodenum, proximalen und distalen Jejunum, Ileum, Zäkum und Kolon entnommen. Neben zootecnischen Daten (Lebendmasse, Tageszunahmen, Futteraufnahme und Futteraufwand) wurden die scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins, der intestinale pH-Wert und der Trockensubstanzgehalt der Digesta untersucht. Einflüsse der pflanzlichen Zusatzstoffe auf die intestinale Mikrobiota wurden anhand der bakteriellen Metaboliten (Laktat, kurzkettige Fettsäuren) bestimmt. Zur Ermittlung immunmodulatorischer Einflüsse erfolgten durchflusszytometrische Bestimmungen zur Phänotypisierung der Leukozyten aus dem Blut und der Lamina epithelialis des proximalen Jejunums. Des Weiteren wurde die Phagozytoseaktivität isolierter peripherer Mono- und Granulozyten mittels opsonierter *E. coli* (Phagotest®) im Durchflusszytometer gemessen. Zur Beurteilung der Proliferationsleistung der Lymphozyten aus dem Blut der Tiere wurden diese mit den Mitogenen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phythämagglutinin M (PHA-M) stimuliert. Die Haptoglobingehalte und spezifischen Immunglobulingehalte gegen *Salmonella* Typhimurium im Serum wurden mit Hilfe von Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) ermittelt.

In den *in vitro*-Untersuchungen konnte eine verminderte Adhäsion eines enteropathogenen *Escherichia coli*-Stamms an eine intestinale Epithelzelllinie (IPEC-J2) durch den Einsatz der Pflanzenmaterialien ermittelt werden. Dabei reduzierte sich die relative Fluoreszenzintensität

der markierten adhärennten *E. coli* an den Epithelzellen unter dem Einfluss von FRESTA® F um 52,7%, unter dem Einfluss von Bockshornkleesamen um 57,6%. Außerdem zeigten sich Bindungskapazitäten der pflanzlichen Substanzen gegenüber dem *E. coli*-Stamm Antimikrobielle Effekte der eingesetzten Pflanzenmaterialien konnten *in vitro* nicht nachgewiesen werden. In den Fütterungsversuchen zeigten sich keine Effekte von FRESTA® F und Bockshornkleesamen auf die zootechnischen Parameter. Durch den Einsatz der pflanzlichen Zusatzstoffe reduzierte sich der pH-Wert im Bereich des distalen Jejunums, des Ileums, Zäkums und Kolons ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während der Einsatz von 0,2% FRESTA® F zu einer Zunahme der Azetatkonzentration im Ileum führte ($p < 0,05$), konnte durch den Einsatz von Bockshornkleesamen eine Abnahme der Azetatkonzentration ermittelt werden ($p < 0,05$). Gleichzeitig wurden durch den Einsatz von Bockshornkleesamen erhöhte Propionat-, Butyrat- und Valeriansäurekonzentrationen im Ileum gemessen ($p > 0,05$). Es zeigten sich auch numerische Effekte der Zusätze auf die Laktatkonzentration im Dünn- und Dickdarm. Die immunologischen Parameter zeigten einen Einfluss von Bockshornkleesamen auf den relativen Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen ($\text{TCR}^+\text{CD8}\alpha^-$) und der antigenpräsentierenden Zellen ($\text{MHCII}^+\text{CD5}^-$) im Blut der Ferkel ($p < 0,05$). Während der relative Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Kontrollgruppe bei 9,4% (3,92-20,7) lag, erhöhte sich dieser durch den Einsatz von Bockshornkleesamen auf 17,2% (7,28-35,0). Für die antigenpräsentierenden Zellen zeigte sich ein Abfall des relativen Anteils von 30,5% (11,2-43,4) in der Kontrollgruppe auf 20,9% (16,4-36,0) in der Bockshornkleesamen-Gruppe. Alle anderen immunologischen Parameter blieben durch den Einsatz der Zusatzstoffe unbeeinflusst. Es zeigten sich keine Effekte der Futterzusammensetzung auf die Lymphozytenproliferation, die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie die Antikörperbildung nach oraler Vakzinierung gegen Salmonellen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die geprüften Zusätze im Intestinaltrakt von Ferkeln Einfluss auf die Adhäsion pathogener *Escherichia coli*-Stämme an Enterozyten sowie auf die Zusammensetzung und metabolischen Aktivitäten der intestinalen Mikrobiota haben. Es sollten weiterführende Untersuchungen zur Abklärung des antiadhäsiven Potenzials im Tier und zur konkreteren Beurteilung der Bedeutung der ermittelten immunmodulatorischen Einflüsse durchgeführt werden.

7. Summary

Stefanie Gärtner: Investigations on the influence of phytogetic additives on digestive physiological, microbiological and immunological parameters in weaned piglets

The present study was performed to evaluate potential effects of a mixed phytogetic feed additive (FRESTA[®] F) and two further components (fenugreek seeds and liquorice roots) on a porcine enteropathogenic *Escherichia coli*-strain. Furthermore, potential effects on the intestinal microbiota and the immune system of weaned piglets were validated.

To establish possible anti-adhesive effects of the phytogetic additives to an enteropathogenic *E. coli*-strain, porcine jejunal epithelial cells (IPEC-J2) marked by fluorescent dye were examined in a flow cytometry. Additionally the bond capacity of the phytogetic additives towards the *E. coli*-strain was detected by measuring bacterial growth rate. Antimicrobial influences were investigated by incubating the bacteria with the test materials at different concentrations and measuring the bacterial growth rate.

After the *in vitro* investigations a feeding trial with 48 male castrated piglets was performed for 28 days. The piglets were divided into four groups, which all received a standard piglet diet covering the piglets' needs. For control group A no additive was applied, the diet for group B was supplemented with 0.04% FRESTA[®] F, in diet C 0.2% FRESTA[®] F was added and the diet for group D was supplemented with 0.15% fenugreek seeds. The piglets were vaccinated with a live vaccine against *Salmonella* Typhimurium (SALMOPORC[®], IDT) to investigate the influence on development of specific antibody titers.

Blood and tissue samples of the proximal jejunum were taken and the digesta of the duodenum, proximal and distal jejunum, ileum, caecum and colon were collected. Beside zootechnical parameters the apparent digestibility of crude protein, the pH-value and dry matter content of the digesta were measured. The digesta samples were also tested for the impact of FRESTA[®] F and fenugreek seeds on the intestinal bacterial metabolites such as lactate and short chain fatty acids. For immunomodulatory investigations, flow cytometric analyses were realised to characterise various immune cell populations in the blood and in the lamina epithelialis of the proximal jejunum. The phagocytic activity of isolated monocytes and granulocytes was analysed by Phagotest[®]. The proliferation behaviour of peripheral blood lymphocytes was measured after stimulation with pokeweed mitogen, Concanavalin A and Phythaemagglutinin M. Serum concentrations of haptoglobin and Salmonella antibody titers were determined with the help of enzyme linked immunosorbent assays (ELISA).

The *in vitro* investigations could demonstrate potential anti-adhesive effects of the phytogetic feed additives on the enteropathogenic *E. coli*-strain. As a result of this the relative fluorescence intensity of adhered bacteria to the epithelial cells (IPEC-J2) was reduced. Inclusion of FRESTA[®] F resulted in a reduction of 52.7%, whereas the addition of fenugreek seeds led to a reduction of 57.6%. No antimicrobial effects for the utilised phytogetic products could be proved.

Health status and zootechnical parameters of the piglets were not affected by the feed additives in the feeding trials. The pH-values in the distal jejunum, ileum, caecum and colon were significantly reduced by the phytogenics compared to the control group ($p < 0.05$). The addition of 0.2% FRESTA[®] F led to an increase of the acetate concentration in the ileum ($p < 0.05$). In contrast fenugreek seeds reduced the acetate concentration in the ileum significantly ($p < 0.05$) but simultaneously increased slightly the concentrations of propionate,

butyrate and valerian acid. The phytochemicals did not affect the lactate concentration in the intestine significantly. The addition of fenugreek seeds increased the relative amount of the $\gamma\delta$ -T-cell population (TCR1⁺CD8 α ⁻) in the blood with simultaneous reduction of antigen-presenting cells (MHCII⁺CD5⁻) ($p < 0.05$). Additional immunological parameters were not affected by the additives.

The results assume that the phytochemical additives used in this study have anti-adhesive effects towards an enteropathogenic *E. coli*-strain. The phytochemical additives also have an impact on a few immune cell populations in the blood and on metabolites of the intestinal microbiota of piglets. Further investigations should be performed to validate the anti-adhesive potentials in animal and to verify the relevance of the observed outcomes.

8. ZITIERTE LITERATUR

Acheson, D. W. K., Luccioli, S. (2004):

Mucosal immune response.

Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 18, 387-404.

Ahuja, S., Kaack, B., Roberts, J. (1998):

Loss of fimbrial adhesion with the addition of *Vaccinium macrocarpon* to the growth medium of P-fimbriated *Escherichia coli*.

J. Urol. 159, 559-562.

Angulo, F. J., Baker, N. L., Olsen, S. J., Anderson, A., Barrett, T. J. (2004):

Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans.

Ped. Infect. Disease 15, 78-85.

Arriëns, M. A., Summerfield, A., McCullough, K. C. (1998):

Differential adhesion molecule expression on porcine mononuclear cell populations.

Scand. J. Immunol. 47, 487-495.

Bailey, M. (2009):

The mucosal immune system: Recent developments and future directions in the pig.

Dev. Comp. Immunol. 33, 375-383.

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

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

Proc. Nutr. Soc. 64, 451-457.

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

The influence of environment on development of the mucosal immune system.

Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 189-198.

Bailey, M., Plunkett, F. J., Rothkötter, H. J., Vega-Lopez, M. A., Haverson, K.; Stokes, C. R. (2001):

Regulation of mucosal immune responses in effector sites.

Proc. Nutr. Soc. 60, 427-435.

Bailey, M., Stevens, K., Bland, P. W., Stokes, C. R. (1992):

A monoclonal antibody recognizing an epitope associated with pig interleukin-2 receptors.

J. Immunol. Meth. 153, 85-93.

Basmacioğlu Malayoğlu, H., Baysal, Ş., Misirlioğlu, Z., Polat, M., Yilmaz, H., Turan, N. (2010):

Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism, and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets.

Br. Poult. Sci. 51, 67-80.

Bateup, J., Dobbinson, S., Munro, K., McConell, M. A., Tannock, G. W. (1998):

Molecular analysis of the composition of *Lactobacillus* populations inhabiting the stomach and caecum of pigs.

Microb. Ecol. Health Dis. 10, 95-102.

Becker, P. M., Galletti, S., Roubos-van den Hill, P. J., van Wikselaar, P. G. (2007):

Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients.

J. Appl. Microbiol. 103, 2686-2696.

Behboudi, S., Morein, B., Ronnberg, B. (1995):

Isolation and quantification of Quillaja saponaria Molina saponins and lipids in iscom-matrix and iscoms.

Vaccine 13, 1690-1696.

Behboudi, S., Morein, B., Villacres-Eriksson, M. (1997):

In vivo and in vitro induction of IL-6 by *Quillaja Saponaria* Molina triterpenoid formulations.

Cytokine 9, 682-687.

Beil, W., Kilian, P. (2007):

EPs 7630, an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells.

Phytomedicine 14, 5-8.

Belogortseva, N. I., Yoon, J. Y., Kim, K. H. (2000):

Inhibition of *Helicobacter pylori* hemagglutination by polysaccharide fractions from roots of *Panax ginseng*.

Planta Med. 66, 217-220.

Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G. L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R. E., Schiffrin, E. J., von der Weid, T. (2003):

Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs.

J. Nutr. 133, 1158-1162.

Bernet, M. F., Brasart, D., Neeser, J. R., Servin, A. L. (1994):

Lactobacillus acidophilus LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria.

Gut 35, 483-489.

Bin-Hafeez, B., Haque, R., Parvez, S., Pandey, S., Sayeed, I., Raisuddin, S. (2003):

Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice.

Int. Immunopharmacol. 3, 257-265.

Binns, R. M. (1994):

The Null/gamma-deltaTCR⁺ T cell family in the pig.
Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 69-77.

Block, K. I., Mead, M. N. (2003):

Immune system effects of echinacea, ginseng and astragalus: A review.
Integr. Cancer Ther. 2, 247-267.

Bogovič Matijašić, B., Narat, M., Peternel, M. Z., Rogelj, I. (2006):

Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion in vitro on Caco-2 cells and ex vivo on pig's jejunal tissue.
Int. J. Food. Microbiol. 107, 92-96.

Böhmer, B. M. (2005):

Echinacea purpurea als Futterzusatzstoff bei Schwein und Geflügel.
Tagungsband 4. BOKU-Symposium Tierernährung, 120-125.

Bordia, A., Joshi, H.K., Sanadhya, Y.K., Bhu, N. (1981):

Effect of garlic on blood lipids in patients with coronary heart disease.
Am. J. Clin. Nutr. 34, 2100-2103.

Born, W., Cady, C., Jones-Carson, J. (1999):

Immunoregulatory functions of gamma delta T cells.
Adv. Immunol. 71, 77-144.

Boudry, G., Péron, V., Le Huêrou-Luron, I., Lallès, J. P., Sève, B. (2004):

Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine.
J. Nutr. 134, 2256-2262.

Boyaka, P. N., Marinaro, M., Jackson, R.J., van Ginkel, F.W., Cormet-Boyaka, E., Kirk, K.L., Kensil, C.R., McGhee, R.J. (2001):

Oral QS-21 requires early IL-4 help for induction of mucosal and systemic immunity.
J. Immunol. 166, 2283-2290.

Brandtzaeg, P. (2009):

Mucosal immunity: Induction, dissemination, and effector functions.
Scand. J. Immunol. 70, 505-515.

Broom, L. J., Miller, H. M., Kerr, K. G., Knapp, J. S. (2006):

Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned pigs.
Res. Vet. Sci. 80, 45-54.

Bruininx, E. M., Binnendijk, G. P., van der Peet-Schwering, C. M., Schrama, J. W., den Hartog, L. A., Everts, H., Beyen, A. C. (2002):

Effect of creep feed consumption on individual feed intake characteristics and performance of group-housed weanling pigs.

J. Anim. Sci. 80, 1413- 1418.

Burger, O., Ofek, I., Tabak, M., Weiss, E., Sharon, N., Neeman, I. (2000):

A high molecular weight constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus.

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29, 295-301.

Burger, R. A., Warren, R. P., Lawson, L. D., Hughes, B. G. (1993):

Enhancement of in vitro human immune function by *Allium sativum* L. (garlic) fractions.

Int. J. Pharmacog. 31, 169-174.

Burkey, T. E., Skjolaas, K. A., Minton, J. E. (2009):

Board-invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract.

J. Anim. Sci. 87, 1493-1501.

Burt, S. (2004):

Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review.

Int. J. Food Microbiol. 94, 223-253.

Burt, S. A., Reinders, R. D. (2003):

Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7.

Lett. Appl. Microbiol. 36, 162-167.

Butler, J. E., Brown, W. R. (1994):

The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine.

Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 5-12.

Butler, J. E., Sun, J., Wertz, N., Šinkora, M. (2006):

Antibody repertoire development in swine.

Dev. Comp. Immunol. 30, 199-221.

Caragay, A. B. (1992):

Cancer-preventative foods and ingredients.

Food. Technol. 46, 65-68.

Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M., Demengeot, J. (2003):

Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide.

J. Exp. Med. 197, 403-411.

Carroll, J. A., Veum, T. L., Matteri, R. L. (1998):

Endocrine responses to weaning and changes in post-weaning diet in the young pig. Dom.

Anim. Endocrinol. 15, 183- 194.

Cassileth, B. R., Heitzer, M., Weser, K. (2009):

The public health impact of herbs and nutritional supplements.
Pharm. Biol. 47, 761-767.

Castillo, M., Martín-Orúe, S.M., Roca, M., Manzanilla, E. G., Badiola, I., Perez, J. F., Gasa, J. (2006):

The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs.

J. Anim. Sci. 84, 2725-2734.

Chan, T. Y. K., Chan, J. C. N., Tanlinson, B., Critchley, J. A. (1993):

Chinese herbal medicines revisited: a Hong Kong perspective.

Lancet 342, 1532-1534.

Chao, A. C., Nguyen, J. V., Broughall, M., Recchia, J. (1998):

Enhancement of intestinal model compound transport by DS-1, a modified Quillaja Saponin.

J. Pharma. Sci. 87, 5.

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

Biology of porcine T lymphocytes.

Anim. Health. Res. Rev. 7, 81-96.

Chavali, S. R., Barton, L. D., Campell, J. B. (1988):

Immunopotential by orally-administered Quillaja saponins: effects in mice vaccinated intraperitoneally against rabies.

Clin. exp. Immunol. 74, 339-343.

Chen, H. H., Lin, J. H., Fung, H. P., Ho, L. L., Yang, P. C., Lee, W. C., Lee, Y. P., Chu, R. M. (2003):

Serum active phase proteins and swine health status.

Can. J. Vet. Res. 67, 283-290.

Cheroutre, H. (2004):

Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells.

Annu. Rev. Immunol. 22, 217-246.

Choi, C., Chae, C. (1999):

Genotypic prevalence of F4 variants (ab, ac, and ad) in Escherichia coli isolated from diarrheic piglets in Korea.

Vet. Microbiol. 67, 307-310.

Chrastinová, L., Chrenková, M., Lauková, A., Rafay, J., Simonová, M., Vasilková, Z., Szaboová, R., Stropfová, V., Odruská, L., Faix, S., Placha, I. (2007):

Effect of dietary herbal extracts on health and performance of rabbits.

Tagungsband 6. BOKU-Symposium Tierernährung, 144-148.

Craig, W. J. (1999):

Health-promoting properties of common herbs.

Am. J. Clin. Nutr. 70 (suppl), 491S-499S.

Cummings, J. H., Antoine, J. M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P. C., Gibson, G. R., Guanar, F., Isolauri, E., Pannemans, D., Shortt, C., Tuijelaars, S., Watzl, B. (2004):

PASSCLAIM - Gut health and immunity.

Eur. J. Nutr. 43 (Suppl2), II/118-II/173.

Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. (2002):

Gastrointestinal effects of prebiotics.

Brit. J. Nutr. 87 (Suppl. 2), S145-S151.

Dale, D. C., Boxer, L., Liles, W. C. (2008):

The phagocytes: neutrophils and monocytes.

BLOOD 112, 935-945.

Di Martino, P., Agniel, R., David, K., Templer, C., Gaillard, J. L., Denys, P., Botto, H. (2006):

Reduction of *Escherichia coli* adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial.

World. J. Urol. 24, 21-27.

Dickhöfer, D. (2002):

Haptoglobin als Screeningparameter für Atemwegserkrankungen des Schweines.

Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover, 1-144.

Dorman, H. J. D., Deans, S. G. (2000):

Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.

J. Appl. Microbiol. 88, 308-316.

Dréau, D., Lallès, J. P., Philouze-Rome, V., Toullec, R., Salmon, H. (1994):

Local and systemic immune responses to soybean protein ingestion in early-weaned pigs.

J. Anim. Sci. 72, 2090-2098.

Dréau, D., Lallès, J. P., Toullec, R., Salmon, H. (1995):

B and T lymphocytes are enhanced in the gut of piglets fed heat-treated soyabean proteins.

Vet. Immunol. Immunopathol. 47, 69-79.

Duffy, C. F., Killeen, G. F., Connolly, C. D., Power, R. F. (2001):

Effects of dietary supplementation with *Yucca schidigera* Roezl ex Ortgies and its saponin and non-saponin fractions on rat metabolism.

J. Agric. Food Chem. 49, 3408-3413.

du Manoir, J. M., Albrigh, B. N., Stevenson, G., Thompson, S., Mitchell, G. B., Clark, M. E., Caswell, J. L. (2002):

Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine.

Vet. Immunol. Immunopathol. 89, 175-186.

Duncan, I. A., Binns, R. M., Duffus, W. P. H. (1989):
The null T cell in pig blood is not an NK cell.
Immunology 68, 392.

European Food Safety Authority (2011):
Scientific opinion on the safety and efficacy of FRESTA® F for weaned piglets.
EFSA Journal 9, 2139-2140.

Ehrlinger, M. (2007):
Phytogene Zusatzstoffe in der Tierernährung.
Dissertation Ludwig-Maximilian-Universität München, 1-248.

Ekkel, E. D., van Doorn, C. E., Hessing, M. J., Tielen, M. J. (1995):
The specific-stress-free housing system has positive effects on productivity, health and welfare of pigs.
J. Anim. Sci. 73, 1544-1551.

El-Abasy, M., Motobu, M., Shimura, K., Na, K. J., Kang, C. B., Koge, K., Onodera, T., Hirota, Y. (2002):
Immunostimulating and growth-promoting effects of sugar cane extract (SCE) in chickens.
J. Vet. Med. Sci. 64, 1061-1063.

El-Deek, A. A., Attia, Y. A., Hannfy, M. M. (2002):
Effects of anise (*Pimpinella anisum*), ginger (*Zingiber officinale roscoe*) and fennel (*Foeniculum vulgare*) and their mixture on performance of broilers.
Arch. Geflügelk. 67, 92-96.

Elson, C. E., Underbakke, G. L., Hanson, P., Shrago, E., Wainberg, R. H., Qureshi, A. A. (1989):
Impact of lemongrass oil, an essential oil, on serum cholesterol.
Lipids 24, 677-679.

Elson, C. E., Yzu, S. G. (1994):
The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables.
J. Nutr. 124, 607-614.

Erickson, A. K., Baker, D. R., Bosworth, B. T., Casey, T. A., Benfield, D. A., Francis, D. H. (1994):
Characterization of porcine intestinal receptors for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli* as mucin-type sialoglycoproteins.
Infect. Immunol. 62, 5404-5410.

Ezquerro, A., Revilla, C., Alvarez, B., Perez, C., Alomso, F., Dominguez, J. (2009):
Porcine myelomonocytic markers and cell populations.
Dev. Comp. Immunol. 33, 284-298.

- Fairbrother, J. M., Nadeau, E., Gyles, C. L. (2005):
Escherichia coli in postweaning diarrhoe in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies.
Anim. Health. Res. Rev. 6, 17-39.
- Finlay, B. B., Falkow, S. (1997):
Common themes in microbial pathogenicity revisited.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 136-169.
- Flore, T. N. E., Francois, Z. N., Félicité, T. M. (2010):
Immune system stimulation in rats by *Lactobacillus* sp. isolates from raffia wine (*Raffia vinifera*).
Cell. Immunol. 260, 63-65.
- Franz, C., Baser, K. H. C., Windisch, W. (2010):
Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a European perspective. A review.
Flavour Fragr. J. 25, 327-340.
- Funderburke, D. W., Seerley, R. W. (1990):
The effects of postweaning stressors on pig weight change, blood, liver and digestive tract characteristics.
J. Anim. Sci. 68, 155-162.
- Ganan, M., Collins, M., Rastall, R., Hotchkiss, A. T., Chau, H. K., Carrascosa, A. V., Martinez-Rodriguez, A. J. (2010):
Inhibition by pectic oligosaccharides of the invasion of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*.
Int. J. Food Micro. 137, 181-185.
- Gardin, N. E. (2009):
Immunological response to mistletoe (*Viscum album* L.) in cancer patients: a four-case series.
Phytother. Res. 23, 407-411.
- Gaskins, H. R., Collier, C. T., Anderson, D. B. (2002):
Antibiotics as growth promoters: mode of action.
Anim. Biotechnol. 13, 29-42.
- Geller, S. E., Studee, L. (2005):
Botanical and dietary supplements for menopausal symptoms: what works, what doesn't.
J. Womens Health. 14, 634-649.
- Gerner, W., Kaser, T., Saalmüller, A. (2009):
Porcine T lymphocytes and NK cells--an update.
Dev. Comp. Immunol. 33, 310-320.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B. (2004):

Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics.
Nutr. Res. Rev. 17, 259-275.

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

Gizycki v., F. (1954):
Alantopikrin, ein Bitterstoff aus den Blättern des Alant.
Archiv. Pharm. 287, 57-62.

Gómez-Laguna, J., Gutiérrez, A., Pallarés, F. J., Salguero, F. J., Cerón, J. J., Carrasco, L. (2010):
Haptoglobin and C-reactive protein as biomarkers in the serum, saliva and meat juice of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus.
Vet. J. 185, 83-87.

Gößling, A. (2001):
Wirkungen eines Oreganoöl-Zusatzes als Futteradditiv auf die Darmflora von Absetzferkeln.
Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover, 1-137.

Graff, J. C., Kimmel, E. M., Freedman, B., Schepetkin, I. A., Holderness, J., Quinn, M. T., Jutila, M. A., Hedges, J. F. (2009):
Polysaccharides derived from *Yamoa (Funtumia elastica)* prime gamma delta T cells *in vitro* and enhance innate immune response *in vivo*.
Int Immunopharmacol. 9, 1313-1322.

Grange, P. A., Erickson, A. K., Levery, S. B., Francis, D. H. (1999):
Identification of an intestinal neutral glycosphingolipid as a phenotype-specific receptor for the K88ad fimbrial adhesin of *Escherichia coli*.
Infect. Immunol. 67, 165-172.

Grange, P. A., Mouricout, M. A. (1996):
Transferrin associated with the porcine intestinal mucosa is a receptor specific for K88ab fimbriae of *Escherichia coli*.
Infect. Immunol. 64, 606-610.

Großpötl, S., Kroismayr, A., Windisch, W., Plitzner, C. (2007):
Untersuchungen zur Wirkung eines phytobiotischen Zusatzstoffes auf die Entwicklung von Aufzucht-kälbern.
Tagungsband 6. BOKU-Symposium Tierernährung, 152-156.

Guggenbichler, J. P., De Bettignies-Dutz, A., Meissner, P., Schellmoser, S., Jurenitsch, J. (1997):
Acidic oligosaccharides from natural sources block adherence of *Escherichia coli* on uroepithelial cells.
Pharm. Pharmacol. Lett. 7, 35-38.

Guo, F. C., Kwakkel, R. P., Williams, B. A., Parmentier, H. K., Li, W. K., Yang, Z. Q., Verstegen, M. W. A. (2004):
Effects of mushroom and herb polysaccharides on cellular and humoral immune responses of *Eimeria tenella*-infected chickens.
Poult. Sci. 83, 1124-1132.

Gymnich, S., Hiss, S., Knura, S., Petersen, B., Sauerweis, H. (2003):
Haptoglobin als Indikator.
Nutztierpraxis aktuell. Ausgabe 6: 46-51.

Halloran, P. J., Sweeney, S. E., Strohmeier, C. M., Kim, Y. B. (1994):
Molecular cloning and identification of porcine cytolytic trigger molecule G7 as a Fc gamma RIII alpha (CD16) homologue.
J. Immunol. 153, 2631-2641.

Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. (1999):
Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts.
J. Appl. Microbiol. 86, 985-990.

Hannan, J. M. A., Ali, L., Rokeya, B., Khaleque, J., Akther, M., Flatt, P. R., Abdel-Wahab, Y. H. A. (2007):
Soluble dietary fibre fraction of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed improves glucose homeostasis in animal models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action.
Br. J. Nutr. 97, 514-521.

Haverson, K., Bailey, M., Stokes, C. R. (1999):
T-cell populations in the pig intestinal lamina propria: memory cells with unusual phenotypic characteristics.
Immunol. 96, 66-73.

Haverson, K., Singha, S., Stokes, C. R., Bailey, M. (2000):
Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine.
Immunol. 101, 492-500.

Hay, M., Orgeur, P., Lévy, F., Le Dividich, J. L., Concordet, D., Nowak, R., Schaal, B., Mormède, P. (2001):
Neuroendocrine consequences of very early weaning in swine.
Physiol. Behavior. 72, 263-269.

Hayday, A. C. (2000):
Gamma/delta t cells: A right time and a right place for a conserved third way of protection.
Ann. Rev. Immunol. 18, 975-1026.

Hayday, A., Theodoridis, E., Ramsburg, E., Shires, J. (2001):
Intraepithelial lymphocytes: exploring the third way in immunology.

Nat. Immunol. 2, 997-1003.

Head, K. A., Kelly, G. S. (2009):

Nutrients and botanicals for treatment of stress: adrenal fatigue, neurotransmitter imbalance, anxiety, and restless sleep.

Alternat. Med. Rev. 14, 114-140.

Heine, W., Mohr, C., Walther, F., Radke, M. (1993):

Glukose-Elektrolyt-Lösung, Reisschleim oder Möhrensuppe? Mikroökologische Aspekte der Diätbehandlung der Säuglingsenteritis.

Akt. Ernähr. Med. 18, 380-384.

Hermiston, M. L., Zikherman, J., Zhu, J. W. (2009):

CD45, CD148, and Lyp/Pep: Critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells.

Immunol. Rev. 228, 288-311.

Hikosaka, K., El-Abasy, M., Koyama, Y., Motobu, M., Koge, K., Isobe, T., Kang, C.-B., Hayashidani, H., Onodera, T., Wang, P.-C., Matsumura, M., Hirota, Y. (2007):

Immunostimulating effects of the polyphenol-rich fraction of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) extract in chickens.

Phytother Res. 21, 120-125.

Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., Gordon, J. I. (2001):

Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine.

Science 291, 881-884.

Howell, A. B., Leahy, M., Kurowska, E., Guthrie, N. (2001):

In vivo evidence that cranberry proanthocyanidins inhibit adherence of P-fimbriated *E. coli* bacteria to uroepithelial cells.

Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 15, A284.

Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., Polster, J. (2003):

Influence of polyphenoles on bacterial biofilm formation and quorum-sensing.

Z. Naturforsch. C. 58, 879-884.

Ilisley, S. E., Miller, H. M., Kamel, C. (2005):

Effects of dietary quillaja saponin and curcumin on the performance and immune status of weaned piglets.

J. Anim. Sci. 83, 82-88.

Inoue, R., Tsukahara, T., Nakanishi, N., Ushida, K. (2005):

Development of the intestinal microbiota in the piglet.

J. Gen. Appl. Microbiol. 51, 257-265.

Janczyk, P., Pieper, R., Smidt, H., Souffrant, W. B. (2010):

Effect of alginate and inulin on the intestinal microbial ecology of weanling pigs under different husbandry conditions
FEMS Microbiol. Ecol. 72, 132-142.

Janczyk, P., Pieper, R., Souffrant, W. B., Smidt, H. (2007):
Changes in the diversity of pig ileal lactobacilli around weaning determined by means of 16S rRNA-gene amplification and denaturant gradient gel electrophoresis.
FEMS Microbiol. Ecol. 62, 132-140.

Johansson, M., Lovgren-Bengtsson, K. (1999):
Iscoms with different quillaja saponin components differ in their immunomodulating activities.
Vaccine 17, 2894-2900.

Johnson, C. D., Kudsk, K. A. (1999):
Nutrition and intestinal mucosal immunity.
Clin. Nutr. 18, 337-344.

Jugl-Chizzola, M., Chizzola, R., Zitterl-Eglseer, K., Franz, C. (2003):
Funktionelle Pflanzenstoffe: Möglichkeiten ihres Einsatzes in der Nutztierhaltung.
Ländlicher Raum 1, 1-7.

Juul-Madsen, H. R., Jensen, K. H., Nielsen, J., Damgaard, B. M. (2010):
Ontogeny and characterization of blood leukocyte subsets and serum proteins in piglets before and after weaning.
Vet. Immunol. Immunopathol. 133, 95-108.

Kantari, C., Pederzoli-Ribeil, M., Witko-Sarsat, V. (2008):
The role of neutrophils and monocytes in the innate immunity.
Contrib. Microbiol. 15, 118-146.

Karlsen, A., Paur, I., Bahn, S. K., Sakhi, A. K., Borge, G. I., Serafini, M., Erlund, I., Laake, P., Tonstad, S., Blomhoff, R. (2010):
Bilberry juice modulates plasma concentration of NF-kappaB related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD.
Eur. J. Nutr. 49, 345-355.

Karlsson, K. A. (1995):
Microbial recognition of target-cell glycoconjugates.
Curr. Opin. Struct. Biol., 622-635.

Kastner, U., Glasl, S., Follrich, B., Guggenbichler, J. P., Jurenitsch, J. (2002):
(Acid oligosaccharides as the active principle of aqueous carrot extracts for prevention and therapy of gastrointestinal infections) Saure Oligosaccharide als Wirkprinzip von wässrigen Zubereitungen aus der Karotte in der Prophylaxe und Therapie von gastrointestinalen Infektionen.
Wien. Med. Wochenschr. 152, 379-381.

Käser, T. (2005):

Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen beim Schwein.

Diplomarbeit, Fakultät für Biologie: Immunologie, Tübingen

Klinische Immunologie, Wien. Wien/Tübingen, Veterinärmedizinische Universität

Wien/ Eberhard Karls Universität Tübingen.

Kelly, D., Smyth, J. A., McCracken, K. J. (1991):

Digestive development of the early-weaned pig:1. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive-tract and on changes in digestive enzyme-activity during the 1st week post-weaning.

Br. J. Nutr. 65, 169-180.

Knura-Deszczka, S. (2000):

Bewertung von Haptoglobin als Parameter zur Einschätzung des Gesundheitsstatus von Mastschweinen.

Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover, 1-98.

Kondon, H., Pothoulakis, C., Thim, L., Devaney, K., Podolsky, D. K. (1995):

Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein.

Gastroenterol. 109, 516-523.

Konopski, Z., Seljelid, R., Eskeland, T. (1993):

Cytokines and PGE2 modulate the phagocytic function of the beta-glucan receptor in macrophages.

Scand. J. Immunol. 37, 578-592.

Konstantinov, S. R., Favier, C. F., Zhu, W. Y., Williams, B. A., Klüß, J., Souffrant, W. B., De Vos, W. M., Akkermans, A. D. L., Smidt, H. (2004):

Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition.

Anim. Res. 53, 317-324.

Kroismayr, A., Zhang, C., Steiner, T. (2006):

Essential oils as feed additives in weaner piglets nutrition.

Beitrag zum 5. BOKU-Symposium TIERERNÄHRUNG, 201-204.

Lallès, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C. R. (2007):

Weaning -- A challenge to gut physiologists.

Livestock Sci. 108, 82-93.

Langlands, S. J., Hopkins, M. J., Cummings, J. H. (2000):

Inulin and FOS feeding modify colonic mucosal bacteria *in vivo*.

Gastroenterology 118 (Suppl 2), A772.

Larkin, T. (1983):

Herbs are often more toxic than magical.

FDA Consum. 17, 4-11.

Laux, D. C., McSweegan, E. F., Williams, T. J., Wadolowski, E. A., Cohen, P. S. (1986): Identification and characterization of mouse small intestine mucosal receptors for *Escherichia coli* K-12 (K88ab).

Infect. Immunol. 52, 18-25.

Le Dividich, J., Sève, B. (2000):

Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonell adjustments in the piglet.

Dom. Anim. Endocrinol. 19, 63-74.

Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., Lee, Y. K. (2006):

Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota.

Res. Microbiol. 157, 876-884.

Lee, J. H., Shim, J. S., Chung, M. S., Lim, S. T., Kim, K. H. (2009):

In-vitro anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion.

Phytother. Res. 23, 460-466.

Lee, J. H., Park, E. K., Uhm, C. S., Chung, M. S., Kim, K. H. (2004):

Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from *Artemisia capillaris* and *Panax ginseng*.

Planta Med. 70, 615-619.

Lee, J. H., Shim, J. S., Lee, J. S., Kim, J. W., Yang, I. S., Chung, M. S., Kim, K. H. (2006a):

Inhibition of pathogenic bacterial adhesion by acidic polysaccharide from green tea (*Camellia sinensis*).

J. Agri. Food. Chem. 54, 7817-7823.

Lee, J. H., Shim, J. S., Lee, J. S., Kim, M. K., Chung, M. S., Kim, K. H. (2006b):

Pectin-like acidic polysaccharide from *Panax Ginseng* with selective antiadhesive activity against pathogenic bacteria.

Carbohydr. Res. 341, 1154-1163.

Lee, Y. K., Lim, C. Y., Teng, W. L., Ouwehand, A. C., Tuomola, E. M., Salminen, S. (2000):

Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria.

Appl. Environ. Microbiol. 66, 3692-3697.

Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M., Moller, K. (2002):

Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited

Appl. Environ. Microbiol. 68, 673-690.

Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Nadeau, É., Matte, J. J., Goulet, J., Fairbrother, J. M. (2009):

Administration of *Pedococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevesiae bourladii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *E. coli* challenge.

J. Anim. Sci. 87, 922-934.

Letellier, A., Messier, S., Lessard, L., Chénier, S., Quessy, S. (2001):

Host responses to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine.

Can. J. Vet. Res. 65, 168-172.

Li, P., Burr, G. S., Gatlin, G. M., Hume, M. E., Parnaik, S., Castille, F. I., Lawrence, A. L. (2007):

Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system.

J. Nutr. 137, 2763-2768.

Li, S. P., Zhao, X. J., Wang, J. Y. (2009):

Synergy of *Astragalus* polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks.

Poult. Sci. 88, 519-525.

Lo, D.-Y., Chen, C. C., Chien, M.-S., Koge, K., Hosono, A., Kaminogawa, S., Lee, W.-C. (2005):

Effects of sugar cane extract on the modulation of immunity in pigs.

J. Vet. Med. Sci. 67, 591-597.

Lo, D.-Y., Chien, M.-S., Yeh, K.-S., Koge, K., Lin, C.-C., Hsuan, S.-L., Lee, W.-C. (2006):

Effects of sugar cane extract on pseudorabies virus challenge of pigs.

J. Vet. Med. Sci. 68, 219-225.

Logan, R. P. H., Robins, A., Turner, G. A., Cockayne, A., Boriello, S. P., Hawkey, C. J. (1998):

A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells.

J. Immunol. Meth. 213, 19-30.

Lugea, A., Salas, A., Casalot, J., Guarner, F., Malagelada, J. R. (2000):

Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins.

Gut 46, 515-521.

Lunney, J. K., Pescovitz, M. D. (1987):

Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations.

Vet. Immunol. Immunopathol. 17, 135-144.

- Maass, N., Bauer, J., Paulicks, B. R., Bohmer, B. M., Roth-Maier, D. A. (2005):
Efficiency of *Echinacea purpurea* on performance and immune status in pigs.
J. Anim. Physiol. Nutr. 89, 244-252.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G. T. (2003):
Regulation of short chain fatty acid production.
Proc. Nutr. Soc. 62, 67-72.
- Macpherson, A. J., Uhr, U. (2004):
Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria.
Science 303, 1662-1665.
- Madar, Z., Shomer, I. (1990):
Polysaccharide composition of a gel fraction derived from fenugreek and its effect on starch digestion and bile acid absorption in rats.
J. Agric. Food Chem. 38, 1535-1539.
- Mair, C., Plitzner, C., Domig, K. J., Schedle, K., Windisch, W. (2010):
Impact of inulin and a multispecies probiotic formulation on the performance, microbial ecology and concomitant fermentation patterns in newly weaned piglets.
J. Anim. Physiol. Nutr., 1-14.
- Manzanilla, E. G., Pérez, J. F., Martín, M., Blandón, J. C., Baucells, F., Kamel, C., Gasa, J. (2009):
Dietary protein modifies effect of plant extracts in the intestinal ecosystem of the pig at weaning.
J. Anim. Sci. 87, 2029-2037.
- Manzanilla, E. G., Pérez, J. F., Martín, M., Kamel, C., Baucells, F., Gasa, J. (2004):
Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs.
J. Anim. Sci. 82, 3210-3218.
- Martín de la Fuente, A. J., Gutiérrez-Martín, C. B., Rodríguez-Barbosa, J. I., Martínez-Martínez, S., Frandoloso, R., Tejerina, F., Rodríguez-Ferri, E. F. (2009):
Blood cellular immune response in pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*.
Res. Vet. Sci. 86, 230-234.
- Matsuo, K., Ota, H., Akamatsu, T., Sugiyama, A., Katsuyama, T. (1997):
Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon.
Gut 40, 782-789.
- McCracken, B. A., Gaskins, H. R., Ruwe-Kaiser, P. J., Klasing, K. C., Jewell, D. E. (1995):
Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning.
J. Nutr. 125, 2838-2845.

McCracken, B. A., Spurlock, M. E., Roos, M. A., Zuckermann, F. A., Gaskins, H. R. (1999):
Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine.
J. Nutr. 129, 613-619.

McDougald, R. H., Hofacre, C., Mathis, G., Fuller, L., Hargrove, J. L., Greenspan, P., Hartle, D. K. (2008):
Enhancement of resistance to coccidiosis and necrotic enteritis in broiler chickens by dietary muscadine pomace.
Avian. Dis. 52, 646-651.

Mei, J., Xu, R. J. (2005):
Transient changes of transforming growth factor-beta expression in the small intestine of the pig in association with weaning.
Br. J. Nutr. 93, 37-45.

Mitsuoka, T., Hidaka, H., Eida, T. (1987):
Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora.
FOOD/Die Nahrung 31, 427-436.

Mizubuchi, H., Yajima, T., Aoi, N., Tomita, T., Yoshikai, Y. (2005):
Isomalto-Oligosaccharides polarize Th1-like responses in intestinal and systemic immunity in mice.
J. Nutr. 135, 2857-2861.

Montagne, L., Cavaney, F. S., Hampson, D. J., Lallès, J. P., Pluske, J. R. (2004):
Effect of diet composition on postweaning colibacillosis in piglets.
J. Anim Sci. 82, 2364-2374.

Muhl, A., Liebert, F. (2007):
Growth and parameters of microflora in intestinal and faecal samples of piglets due to application of a phytogenic feed additive.
J. Anim. Physiol. Nutr. 91, 411-418.

Murray, R. D., McClung, H. J., Li, B. U., Ailabouni, A. (1987):
Short-chain fatty acid profile in the colon of newborn piglets using fecal water analysis.
Pediatr. Res. 22, 720-724.

Nantz, M. P., Rowe, C. A., Nieves, J., C., Percival, S. S. (2006):
Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate.
J. Nutr. 136, 2606-2610.

Naughton, P. J., Mikkelsen, L. L., Jensen, B. B. (2001):
Effects of nondigestible oligosaccharides on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and nonpathogenic *Escherichia coli* in the pig small intestine.
Appl. Environ. Microbiol. 67, 3391-3395.

- Neeser, J. R., Koellreutter, B., Wuersch, P. (1986):
Oligomannosid-type glycopeptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili: preparation of potent inhibitors from plant glycoproteins.
Inf. Immun. 52, 428-436.
- Nerbas, E. (2008):
Aktualisierung von Bluparamtern beim Schwein.
Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover, 1-238.
- Nielsen, I., Perderson, R. S. (1984):
Life-threatening hypokalaemia caused by liquorice ingestion.
Lancet 1, 1305.
- Nielsen, B., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J., Lind, P. (1995):
The serological response to *Salmonella* serovars *typhimurium* and *infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations.
Vet. Microbiol. 47, 204-218.
- Niers, L. E., Timmermann, H. M., Rijkers, G. T., van Bleek, G. M., van Uden, N. O., Knol, E. F., Kaspenberg, M. L., Kimpen, J. L., Hoekstra, M. O. (2005):
Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines.
Clin. Exp. Allergy. 35, 1481-1489.
- Nochta, I., Halas, V., Tossenberger, J., Babinszky, L. (2009):
Effect of different levels of mannan-oligosaccharide supplementation on the apparent ileal digestibility of nutrients, N-balance and growth performance of weaned piglets.
J. Anim. Physiol. Nutr. 93, 496-504.
- Nofrarías, M., Manzanilla, E. G., Pujols, J., Gibert, X., Majó, N., Segalés, J., Gasa, J. (2006):
Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs.
J. Anim. Sci. 84, 2735-2742.
- Nya, E. J., Austin, B. (2009):
Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).
J. Fish. Dis. 32, 971-977.
- Ofek, I., Mirelman, D., Sharon, N. (1977):
Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors.
Nature 265, 623-625.
- Ofek, I., Sharon, N. (1990):
Adhesins as lectins: specificity and role in infection.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 150, 91-114.

Olin, M. R., Batista, L., Xiao, Z., Dee, S. A., Murtaugh, M. P., Pijoan, C. C., Molitor, T. W. (2005):

Gamma delta lymphocytes response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* 18, 490-499.

Osek, J. (1999):

Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning.

Vet. Microbiol. 68, 209-217.

Oswald, J., Wetscherek, W. (2007):

Wirkung von Oregano auf die Aufzuchtleistung von Ferkeln.

Tagungsband 6. BOKU-Symposium TIERERNÄHRUNG, 174-181.

Ouelette, A. J., Bevins, C. L. (2001):

Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel.

Inflamm. Bowel Dis. 7, 43-50.

Pabst, R., Rothkötter, H. J. (1999):

Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets.

Vet. Immunol. Immunopathol. 72, 291-304.

Pallares, F. J., Martinez-Subiela, S., Seva, J., Ramis, G., Fuentes, P., Bernabe, A., Munoz, A., Ceron, J. J. (2008):

Relationship between serum acute phase protein concentrations and lesions in finishing pigs.

Vet. J. 177, 369-373.

Pandian, R. S., Anuradha, C. V., Viswanathan, P. (2002):

Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) on experimental gastric ulcer in rats.

J. Ethnopharmacol. 81, 393-397.

Park, K. J., Rhee, M. H., Park, K. M., Nam, K. Y., Park, K. H. (1995):

Effect of non saponin fraction from *Panax ginseng* on cGMP and thromboxane A2 in human platelet aggregation.

J. Ethnopharmacol. 49, 157-62.

Parkar, S. G., Stevenson, D. E., Skinner, M. A. (2008):

The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health.

Int. J. Food Micro. 124, 295-298.

Paßlack, N. (2010):

Untersuchungen zum Einfluss von Inulin und thermisch behandelten Ackerbohnen auf immunologische Parameter bei Sauen, Saug- und Absetzferkeln.

Dissertation Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin, 1-130.

Pauly, T., Weiland, E., Hirt, W., Dreyer-Bux, C., Maurer, S., Summerfield, A., Saalmüller, A. (1996):

Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes.

Immunology 88, 236-246.

Peñalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., Perea, A. (2005):

Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family.

APMIS 113, 1-6.

Percival, S. S. (2009):

Grape consumption supports immunity in animals and humans.

J. Nutr. 139, 1801S-1805S.

Pescovitz, M. D., Book, B. K., Aasted, B., Dominguez, J., Bullido, R., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Tomaskovic, M., Nielsen, J., Arn, S., Sachs, D. H., Lunney, J. K., Boyd, P. C., Walker, J., Lee, R., Saalmüller, A. (1998):

Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD5: results from the Second International Swine CD Workshop.

Vet. Immunol. Immunopathol. 60, 269-273.

Peternel, M. (2006):

Untersuchungen zur Verwendbarkeit des Immunglobulinklassen differenzierenden Salmonellen-Antikörper Test SALMOTYPE® Pig STM-WCE ELISA zur Analyse der Salmonellendynamik in Schweinebeständen.

Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover, 1-210.

Pie, S., Lallès, J. P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., Oswald, I. P. (2004):

Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets.

J. Nutr. 134, 641-647.

Pieper, R., Janczyk, P., Zeyner, A., Smidt, H., Gulard, V., Souffrant, W. B. (2008):

Ecophysiology of the developing total bacterial and *Lactobacillus* Communities in the terminal small intestine of weaning pigs.

Microb. Ecol. 56, 474-483.

Pils, S., Schmitter, T., Neske, F., Hauck, C. R. (2006):

Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry.

J. Microbiol. Meth. 65, 301-310.

Piriou-Guzylack, L., Salmon, H. (2008):

Membrane markers of the immune cells in swine: an update.

Vet. Res. 39,39-54.

- Platel, K., Rao, A., Saraswathi, G., Srinivasan, K. (2002):
Digestive stimulant action of three Indian spice mixes in experimental rats.
Nahrung/Food. 46, 394-398.
- Platel, K., Srinivasan, K. (2000):
Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats.
Nahrung/Food. 44, 42-46.
- Platel, K., Srinivasan, K. (2004):
Digestive stimulant action of spices: a myth or reality?
Indian J. Med. Res. 119, 167-179.
- Pluske, J. R., Hampson, D. J., Williams, I. H. (1997):
Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review.
Livestock Product. Sci. 51, 215-236.
- Pluske, J. R., Pethick, D. W., Hopwood, D. E., Hampson, D. J. (2002):
Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs.
Nutr. Res. Rev. 15, 333-371.
- Qiao, I., Braunstein, J., Golling, M., Schurmann, G., Autschbach, F., Moller, P., Meurer, S. (1996):
Differential regulation of human T cells responsiveness by mucosal versus blood monocytes.
Eur. J. Immunol. 26, 922-927.
- Ramesh, H. P., Yamaki, K., Tsushida, T. (2002):
Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells.
Carbohydr. Polym.. 50, 79-83.
- Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D. A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J. M., Cornwell, T., Pastor, I., Fridlender, B. (2002):
Plants and human health in the twenty-first century.
Trends Biotechnol. 20, 522-531.
- Rehman, H., Böhm, J., Zentek, J. (2008):
Effect of different fermentable carbohydrates on the microbial fermentation profile of the gastrointestinal tract of broilers.
J. Anim. Physiol. Nutr. 92, 471-480.
- Renz-Polster, H., Braun, J. (2000):
Immunsystem. Basislehrbuch: Innere Medizin: kompakt, greifbar, verständlich.
München, Urban und Fischer Verlag. 1, 330-353.

- Roesler, U. H. (2007):
Charakterisierung der porcinen *Salmonella* Typhimurium DT104 -Infektion und Maßnahmen zur Salmonellen-Reduktion in Schweinemast- und Schweinezuchtbetrieben
Habilitation, Institut für Tierhygiene und öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig, 2007, 1-215.
- Roesler, U., von Altrock, A., Heller, P., Bremerich, S., Arnold, T., Lehmann, J., Waldmann, K.-H., Truyen, U., Hensel, A. (2005):
Effects of fluorequinolone treatment acidified feed, and improved hygiene measures on the occurrence of *Salmonella* Typhimurium DT104 in an integrated pig breeding herd.
J. Vet. Med. B 52, 69-74.
- Rothkötter, H. J., Möllhoff, S., 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.
- Rothkötter, H. J. (2009):
Anatomical particularities of the porcine immune system--A physician's view.
Dev. Comp. Immunol. 33, 267-272.
- Rothkötter, H. J., Kirchhoff, T., Pabst, R. (1994):
Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs.
Gut 35, 1582-1589.
- Rowe, C. A., Nantz, M. P., Bukowski, J. F., Percival, S. S. (2007):
Specific formulation of *Camellia sinensis* prevents cold and flu symptoms and enhances gamma/delta T cell function: A randomized, double-blind, placebo-controlled study.
J. Am. Coll. Nut. 26, 445-452.
- Ruth, G. J., Jonathan, C. C. (2007):
A systematic review of the evidence for cranberries and blueberries in UTI prevention.
Mol. Nutr. Food Res. 51, 738-745.
- Ryz, N. R., Meddings, J. B., Taylor, C. G. (2009):
Long-chain inulin increases dendritic cells in the peyer's patches and increases ex vivo cytokines secretion in the spleen and mesenteric lymph nodes of growing female rats, independent of zinc status.
Br. J. Nutr. 101, 1653- 1663.
- Saalmüller, A. (2006):
New understanding of immunological mechanisms.
Vet. Microbiol. 117, 32-38.
- Saalmüller, A., Weiland, F., Reddehase, M. J.. (1991):

Resting porcine T lymphocytes expressing class II major histocompatibility complex.
Immunobiology 183, 102-114.

Saalmüller, A., Bryant, J. (1994):
Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines.
Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 45-52.

Saalmüller, A., Hirt, W., Maurer, S., Weiland, E. (1994):
Discrimination between two subsets of porcine CD8⁺ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen.
Immunol. 81, 578-583.

Saalmüller, A., Pauly, T., Höhlich, B. J., Pfaff, E. (1999):
Characterization of porcine T lymphocytes and their immune response against viral antigens.
J. Biotechnol. 73, 223-233.

Saalmüller, A., Werner, T., Fachinger, V. (2002):
T-helper cells from naive to committed.
Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 137-145.

Sahu, S., Kumar, D., Pradhan, J., Mohapatra, B. C., Mishra, B. K., Sarangi, N. (2007):
Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings.
Fish Shellfish Immunol. 23, 109-118.

Sakurai, M. H., Matsumoto, T., Kiyohara, H., Yamada, H. (1999):
B-cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. and its structural requirement.
Immunology 97, 540-547.

Saxe, T. G. (1987):
Toxicity of medicinal herbal preparations.
Am. Fam. Physician. 35, 135-142.

Scharek, L., Altherr, B. J., Tölke, C., Schmidt, M. F. G. (2007):
Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the intestinal immunity of piglets.
Vet. Immunol. Immunopathol. 120, 136-147.

Scharek, L., Guth, J., Reiter, K., Weyrauch, K. D., Taras, D., Schwerk, P., Schierack, P., Schmidt, M. F. G., Wieler, L. H., Tedin, K. (2005):
Influence of probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets.
Vet. Immunol. Immunopathol. 105, 151-161.

Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K. D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., Tedin, K., Wieler, L. H. (2006):

Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine.

Histochem. Cell Biol. 125, 293-305.

Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., Raskin, I. (2008):

A natural history of botanical therapeutics.

Metabolism 57 (Supplement 1), S3-S9.

Schmidt, B., Schuhmacher, A., Boldt, E. (2002):

Garlic: Influence on growth and health of poultry.

Proc. Soc. Nutr. Physiol. 11, 114.

Schmidt, L. D., Korth, L. J., Brown, D. R. (2008):

Comparison of growth phase on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion an epithelial cell line (IPEC-J2) and mucosal explants from porcine small intestine.

Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 31, 63-69.

Sen, S., Makkar, H. P. S., Muetzel, S., Becker, K. (1998):

Effect of Quillaja saponaria saponins and Yucca schidigera plant extract on growth of Escherichia coli.

Lett. Appl. Microbiol. 27, 35-38.

Serafino, A., Vallebona, P. S., Andreola, F., Zonfrillo, M., Mercuri, L., Federici, M., Rasi, G., Garaci, E., Pierimarchi, P. (2008):

Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response.

BMC Immunol. 9:17.

Sethman, C. R., Doyle, R. J., Cowan, M. M. (2002):

Flow cytometric evaluation of adhesion of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells.

J. Microbiol. Meth. 51, 35-42.

Sharifuzzaman, S. M., Austin, B. (2009):

Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout.

Fish Shellfish Immunol. 27, 440-445.

Sharma, R. D., Raghuram, T. C. (1990):

Hypoglycaemic effect of fenugreek seeds in non-insulin dependent diabetic subjects.

Nutr. Res. 10, 731-739.

Sharon, N. (1987):

Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease.

FEBS Lett. 217, 145-157.

Shibata, Y., Metzger, W. J., Myrvik, Q. N. (1997):

Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan.

J. Immunol. 159, 2462-2467.

- Shoaf, K., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., Hutkins, R. W. (2006):
Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells.
Inf. Immun. 74, 6920-6928.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., Johnson, R., Du, Z. (2006):
Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria.
J. Appl. Microbiol. 100, 296-305.
- Simpson, K. W., Rishniw, M., Bellosa, M., Liotta, J., Lucio, A., Baumgart, M., Czarnecki-Maulden, G. L., Benyacoub, J., Bowman, D. (2009):
Influence of *Enterococcus faecium* SF68 probiotic on giardiasis in dogs.
J. Vet. Intern. Med. 23, 476-481.
- Šinkora, M.; Šinkorová, J.; Butler, J. E. (2002):
B cell development and VDJ rearrangement in the fetal pig.
Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 341-346.
- Šinkora, M., Šinkorová, J., Holtmeier, W. (2005):
Development of gamma delta thymocyte subsets during prenatal and postnatal ontogeny.
Immunology 115, 544-555.
- Siwicki, A. K., Zielonka, Ł., Skopińska-Róźdzewska, E., Gajęcki, M., Małazcewska, J., Wójcik, R., Trapkowska, S. (2004):
The influence of immunostim plus a standardized fixed combination of *Schizandra chinensis* with *Eleutherococcus senticosus* extracts on blood phagocytes and lysozyme activity in pigs.
Polish J. Food Nutr. Sci. 46, 55-58.
- Sjolander, A., van 't Land, B., Bengtsson, K. L. (1997):
Iscoms Containing Purified Quillaja Saponins Upregulate both Th1-like and Th2-like Immune Responses.
Cell. Immunol. 177, 69-76.
- Skjolaas, K. A., Burkey, T. E., Dritz, S. S., Minton, J. E. (2006):
Effects of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium (ST) and Cholerasius (SC) on chemokine and cytokine expression in swine ileum and jejunal epithelial cells.
Vet. Immunol. Immunopathol. 111, 199-209.
- Sokurenko, E. V., McMakin, V. A., Hasty, D. L. (1995):
Bacterial adhesion measured by growth of adhered organism.
Meth. Enzymol. 253, 519-528.
- Son, V. M., Chang, C. C., Wu, M. C., Guu, Y. K., Chiu, C. H., Cheng, W. (2009):
Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*.

Fish Shellfish Immunol. 26, 691-698.

Sprecher, D. L., Harris, B. V., Goldberg, A. C. (1993):
Efficacy of psyllium in reducing serum cholesterol levels in hypercholesterolemic patients on high- or low-fat diets.
Ann. Intern. Med. 119, 545-554.

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 lock feed intake at weaning.
J. Nutr. 131, 1520-1527.

Srichamroen, A., Thomson, A. B. R., Field, C. J., Basu, T. K. (2009):
In vitro intestinal glucose uptake is inhibited by galactomannan from Canadian fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum* L.) in genetically lean and obese rats.
Nutr. Res. 29, 49-54.

Srivastava, M., Kapoor, V. P. (2005):
Seed galactomannans: an overview.
Chem. Biodivers. 2, 295-317.

Steinmetz, K. A., Potter, J. D. (1991):
Vegetables, fruit, and cancer. II Mechanism.
Canc. Caus. Contr. 2, 427-442.

Stokes, C. R., Bailey, M. (2000):
The porcine gastrointestinal lamina propria: an appropriate target for mucosal immunisation?
J. Biotechnol. 83, 51-55.

Stokes, C. R. B., 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 intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning.
Anim. Res. 53, 325-334.

Stoni, A., Zitterl-Eglseer, K., Kroismayr, A., Wetscherek, W., Windisch, W. (2005):
Ätherische Öle in der Ferkelfütterung: Effekt auf die Nährstoffverdaulichkeit und die Wiederfindung im Gewebe.
Tagungsband 4. BOKU-Symposium Tierernährung, 147-153.

Straus, D. S. (1994):
Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth.
FASEB J. 8, 6-12.

Summerfield, A., McCullough, K. C. (2009):
The porcine dendritic cell family.
Dev. Comp. Immunol. 33, 299-309.

Summerfield, A., Saalmüller, A. (1998):

Interleukin-2 dependent selective activation of porcine gamma delta T lymphocytes by an extract from the leaves of *Acanthospermum hispidum*.

Int. J. Immunopharmacol. 20, 85-98.

Szabó, I. (2008):

Einfluss von *Enterococcus faecium* als Probiotikum auf *Salmonella* Typhimurium DT104 am Infektionsmodell Schwein.

Dissertation Freie Universität Berlin, 1-121.

Takamatsu, H. H., Denyer, M. S., Stirling, C., Cox, S., Aggarwal, N., Dash, P., Wileman, T. E., Barnett, P. V. (2006):

Porcine gammadelta T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection.

Vet. Immunol. Immunopathol. 112, 49-61.

Takamatsu, H. H., Denyer, M. S., Wileman, T. E. (2002):

A sub-population of circulating porcine gammadelta T cells can act as professional antigen presenting cells.

Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 223-224.

Tamura, A., Soga, H., Yaguchi, K. (2003):

Distribution of two types of lymphocytes (intraepithelial and lamina-propria-associated) in the murine small intestine.

Cell Tissue Res. 313, 47-53.

Thielke, K.-H., Hoffman-Moujahid, A., Weisser, C., Waldkich, E., Pabst, R., Holtmeier, W., Rothkötter, H. J. (2003):

Proliferating intestinal gamma delta T cells recirculate rapidly and are a major source of the gamma delta T cell pool in the peripheral blood.

Eur. J. Immunol. 33, 1649-1656.

Thieme, R. K., W. (2005):

Einfluss phytogener Stoffe auf die Futteraufnahme unter Berücksichtigung der metabolischen Umsetzung.

Tagungsband 4. BOKU-Symposium Tierernährung, 107-113.

Tomoda, M., Matsumo, K., Shimizu, N., Gonda, R., Ohara, N., Hirabayashi, K. (1994):

An acidic polysaccharide with immunological activities from the root of *Paeonia lactiflora*.

Biol. Pharm. Bull. 17, 1161-1164.

Turner, J. L., Dritz, S. S., Higgins, J. J., Herkelman, K. L., Minton, J. E. (2002a):

Effects of *Quillaja saponaria* extract on growth performance and immune function of weanling pigs challenged with *Salmonella* Typhimurium.

J. Anim. Sci. 80, 1939-1946.

- Turner, J. L., Dritz, S. S., Higgins, J. J., Minton, J. E. (2002b):
Effects of *Ascophyllum nodosum* extract on growth performance and immune function of young pigs challenged with *Salmonella* Typhimurium.
J. Anim. Sci. 80, 1947-1953.
- Tzortzis, G., Goulas, A. K., Gee, J. M., Gibson, G. R. (2005):
A novel galactooligosaccharid mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous *in vitro* Fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*.
J. Nutr. 135, 1726-1731.
- Ullrich, E., Bergfeld, U., Wirkner, P., Brabetz, W., Trtebnau, D., Lehmann, J. (2007):
Dauerbrenner oder Dauerausscheider Salmonella?
Fachinformation zur Tierhaltung Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft.
- Valdivia, R. H., Falkow, S. (1998):
Flow cytometry and bacterial pathogenesis.
Curr. Opin. Microbiol. 1, 359-363.
- Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B. M. (1999):
Receptor-specific binding of purified F4 to isolated villi.
Vet. Microbiol. 68, 255-263.
- Vandenbergh, P. A. (1993):
Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth.
FEMS Microbiol. Rev. 12, 221-237.
- Verdonck, F., Cox, E., Vancaeneghem, S., Goddeeris, B. M. (2004):
The interaction of F4 fimbriae with porcine enterocytes as analysed by surface plasmon resonance.
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 41, 243-248.
- Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., Ouwehand, A. C. (2005):
Measurement of bacterial adhesion - in vitro evaluation of different methods.
J. Microbiol. Meth. 60, 225-233.
- Wald, C. (2003):
Gewürze und Co. - eine Übersicht.
Lohmann-Information Juli-September (3), 1-5.
- Wald, C. (2004):
Die Wirkung phytogener Zusatzstoffe in der Tierernährung.
Lohmann-Information. April-Juni 2004 (2), 1-4.
- Wang, A., Yu, H., Gao, X., Li, X., Quiao, S. (2009):
Influence of *Lactobacillus fermentum* 15007 on the intestinal and systemic immune responses of healthy and *E. coli* challenged pigs.
Antonie van Leeuwenhoek. 96, 89-98.

- Wang, X., Gibson, G. R. (1993):
Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine.
J. Appl. Bacteriol. 75, 373-380.
- Wang, Y., Han, F., Xu, Z. (2006):
Developmental gene expression of lactoferrin in the duodenum and effect of weaning age on gene expression of lactoferrin in piglets.
Arch. Anim. Nutr. 60, 1-9.
- Warshafsky, S., Kramer, R. S., Sivak, S. L. (1993):
Effect of garlic on total serum cholesterol: a meta-analysis.
Ann. Intern. Med. 119, 599-605.
- Watt, K., Christofi, N., Young, R. (2007):
The Detection of antibacterial actions of whole herb tinctures using luminescent *Escherichia coli*.
Phytother. Res. 21, 1193-1199.
- Watzl (2001):
Saponine: Charakteristik, Vorkommen, Aufnahme, Stoffwechsel, Wirkungen.
Ernährungs-Umschau 48, 251-253.
- Weary, D. M., Jasper, J., Hötzel, M. J. (2008):
Understanding weaning distress.
Appl. Anim. Behav. Sci. 110, 24-41.
- Wells, C. L., Jechorek, R. P., Kinneberg, K. M., Debol, S. M., Erlansen, S. L. (1999):
The isoflavone genistein inhibits internalization of enteric bacteria by cultured Caco-2 and HT-29 enterocytes.
J. Nutr. 129, 634-640.
- Wendler, K. R., Perner, J., Asamer, A. (2008):
Performance improvement in weaned piglets by the phytogetic feed additive FRESTA®
Conc.
Tagungsband 7. BOKU-Symposium Tierernährung, 72-75.
- Wenk, C. (2005):
Einsatz von Kräutern und deren Extrakte in der Tierernährung: Erwartungen und Möglichkeiten.
Tagungsband 4. BOKU-Symposium Tierernährung, 17-27.
- Wershil, B. K., Furuta, G. T. (2008):
4. Gastrointestinal mucosal immunity.
J. Allergy Clin. Immunol. 121, S380-S383.

-
- Westendarp, H. (2006):
Einsatz und Wirkung phytogener Futterzusatzstoffe beim Geflügel.
Übers. Tierernährung 34, 1-26.
- Wetscherek, W. (1995):
Erfolgreiche Ferkelaufzucht ohne antibiotische Leistungsförderer.
Blick ins Land 5, 11-12.
- Wetscherek, W. (1998):
Phytogene Futterzusatzstoffe.
Feed Magazine 81, 466-467.
- Wetscherek, W. (2002):
Phytogene Futterzusatzstoffe für Schwein und Geflügel.
Tagungsband 1. BOKU-Symposium Tierernährung, 18-23.
- Wetscherek, W. (2005):
Einsatz von ätherischen Ölen (Fresta F) in der Ferkelaufzucht.
Tagungsband 4. BOKU-Symposium Tierernährung, 132-139.
- Wetscherek, W., Dobretsberger, M., Leeb, C. (2005):
"Effekte eines phyto generen Zusatzstoffes (IHPO43) auf die Leistung von Absetzferkeln".
Tagungsband 4. BOKU-Symposium Tierernährung, 126-131.
- Williams, N. (1998):
T cells on the mucosal frontline.
Science 280, 198-200.
- Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., Kroismayr, A. (2008):
Use of phyto genic products as feed additives for swine and poultry.
J. Anim. Sci. 86 (14 suppl), E140-148.
- Yang, Y., Iji, P. A., Choct, M. (2009):
Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics.
World's Poultr. Sci. J. 65, 97-114.
- Yang, H., Parkhouse, R. M. (1996):
Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues.
Immunology 89, 76-83.
- Yang, H., Parkhouse, R. M. (1997):
Differential expression of CD8 epitopes amongst porcine CD8-positive functional lymphocytes subsets.
Immunology 92, 45-52.

Yang, Y., Iji, P. A., Kocher, A., Mikkelsen, L. L., Choct, M. (2008):
Effect of dietary mannanoligosaccharide on growth performance, nutrient digestibility and gut development of broilers given different cereal-based diets.
J. Anim. Physiol. Nutr. 92, 650-659.

Youinou, P., Durand, V., Renaudineau, Y., Pennec, Y.-L., Saraux, A., Jamin, C. (2002):
Pathogenic effects of anti-Fc gamma receptor IIIb (CD16) on polymorphonuclear neutrophils in non-organ-specific autoimmune diseases.
Autoimmun. Rev. 1, 13-19.

Zuckermann, F. A., Peavey, C., Schnitzlein, W. M., Schabacker, D., Husmann, R. J., Yang, H., Saalmüller, A., Lunney, J. K. (1998):
Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD45R: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop.
Vet. Immunol. Immunopathol. 60, 367-387.

9. ANHANG

Tabelle 25: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien für die *In vitro*-Untersuchungen

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| Albumin aus Rinderserum lyophilisiert/ rein >92% | SERUA Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland) |
| BSA (Bovines Serum Albumin, >92%), gefriergetrocknet | SIGMA ALDRICH (Steinheim, Deutschland) |
| CFDA-SE (Carboxyfluorescein- Diacetat-Succinimidyl- Ester) | FLUKA SIGMA ALDRICH (Steinheim, Deutschland) |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) HYBRI-MAX® | SIGMA ALDRICH (Steinheim, Deutschland) |
| FACS Clean | Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| FACS Flow™ | Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| FACS Rinse | Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Natriumazid reinst | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| PBS Dulbecco, low endotoxin (Phosphate Buffer Saline), 9,55g/l | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| Trypsin-EDTA-Lösung | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| Trypan-Blau 0,5% (w/v) | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |

Tabelle 26: Übersicht der verwendeten Zusätze für die Zellkultur und die Zellkulturmedien für die *In vitro*-Untersuchungen

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| Agar-Agar granuliert | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| EGF 500µg <rh> (Epidermal Growth Factor) 1mg/ml | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| Hefeextrakt pulv. f. d. Bakteriologie | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| ITS (Insulin- Transferrin- Selenit- Natrium) Liquid Media Supplement | Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |
| L-Glutamine, 200mM Stock, low endotoxin | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| MegaCell™ Dulbecco`s | Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |
| NaCl (Natriumchlorid) | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Penicillin/ Streptomycin (1000Units/ml / 1000µg/ml) | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |

| Bezeichnung | Hersteller |
|------------------|----------------------------|
| Tryptone LP 0042 | OXOID (Hampshire, U.K.) |

Tabelle 27: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien für die *In vivo*-/*Ex vivo*-Untersuchungen

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| Albumin aus Rinderserum lyophilisiert/ rein >92% | SERUA Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland) |
| BSA (Bovines Serum Albumin, >92%), gefriergetrocknet | SIGMA ALDRICH (Steinheim, Deutschland) |
| BrdU (Bromdesoxyuridin), 97% | SIGMA ALDRICH (Steinheim, Deutschland) |
| CaCl ₂ (Calciumchlorid) | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Coomassie Brilliant Blue G250 | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| DNase Deoxyribonuklease I from bovine pancreas (10mg/ml) | SIGMA ALDRICH (Steinheim, Deutschland) |
| EDTA >99% (Ethyldiamintetraessigsäure) | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ethanol 99% | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| FACS Clean | Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| FACS Flow™ | Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| FACS™ Permeabilizing Solution 2 PERM2 | Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| FACS Rinse | Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Ficoll | SIGMA ALDRICH (Steinheim, Deutschland) |
| Formaldehyd | SIGMA ALDRICH (Steinheim, Deutschland) |
| HCl (Salzsäure) | J.T. Baker (Deventer, Niederlande) |
| KBrO ₃ (Kaliumbromat) | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat) | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| MgCl ₂ (Magnesiumchlorid) | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| MnSO ₄ (Mangansulfat) | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| NaCl (Natriumchlorid) | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Natriumazid reinst | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| NH ₃ (Ammoniak) p. A. | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| (NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ *4H ₂ O (Ammoniumheptamolybdat) | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| NH ₄ VO ₃ (Ammoniummetavanadat) | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| PBS Dulbecco, low endotoxin (Phosphate Buffer Saline), 9,55g/l | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| Paraformaldehyd, reinst | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| Petrolether | Fisher Chemical (Schwerte, Deutschland) |
| Salpetersäure, w = 65% | FLUKA - SIGMA-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |
| Trypsin-EDTA-Lösung | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| Trypan-Blau 0,5% (w/v) | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| TWEEN 20 | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |

Tabelle 28: Übersicht der verwendeten Zusätze für die Zellkultur und die Zellkulturmedien für die *In vivo*- /*Ex vivo*-Untersuchungen

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| Agar-Agar granuliert | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| Biocoll Separating Solution | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| EGF 500µg <rh> (Epidermal Growth Factor) 1mg/ml | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| Hefeextrakt pulv. f. d. Bakteriologie | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| HEPES-BUFFER (1M) | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| ITS (Insulin- Transferrin- Selenit- Natrium) Liquid Media Supplement | Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |
| L-Glutamine, 200mM Stock, low endotoxin | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| MegaCell™ Dulbecco`s | Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |
| MegaCell Dulbecco's Modified Eagle`s Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham | Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |
| NaCl (Natriumchlorid) | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| Penicillin/ Streptomycin (1000Units/ml / 1000µg/ml) RPMI 1640 Medium | BIOCHROM (Berlin, Deutschland) BIOCHROM (Berlin, Deutschland) |
| Tryptone LP 0042 | OXOID (Hampshire, U.K.) |

Puffer und Lösungen

| | |
|------------------------------|---|
| PBS: | Dulbecco, low endotoxin (Phosphate Buffer Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung), 9,55g/l Die Pufferlösung enthält 137mM Natriumchlorid, 2,7mM Kaliumchlorid und 12mM Dihydrogenphosphat bei einem pH Wert von 7,4. |
| Stop-Lösung: | Zur Herstellung von 200ml Lösung wurden 2g BSA und 1g Natriumazid in 200ml PBS gelöst. |
| Ammoniummolybdat-Lösung: | 100 g Ammoniummolybdat in warmem Ultrapureinstwasser lösen. Nach dem Abkühlen 10 ml Ammoniak (w = 25%) hinzugeben und auf 1000 ml (Ultrapureinstwasser) auffüllen. |
| Ammoniummetavanadat-Lösung: | 2,35 g Ammoniummetavanadat in 400 ml warmem Ultrapureinstwasser lösen, unter Rühren langsam 7 ml Salpetersäure (w= 65%) und 13 ml H ₂ O zugeben. Anschließend auf 1000 ml (Ultrapureinstwasser) auffüllen. |
| DNase Puffer: | Anlösen von 4,383g NaCl (MW=58,44), 0,427g MgCl ₂ (MW= 203.3) und 5µl HCL (1M) in Aqua bidest. Lösung auf 500ml Aqua bidest. auffüllen. Lagerung bei 4°C. |
| Ethanol-Lösung: | 240ml Ethanol (99%) mit 10ml Aqua bidest mischen. Lagerung bei -30°C. |
| FACS Puffer: | 5g BSA wurden im Messzylinder abgewogen, 800ml Aqua bidest. zugefügt und mit dem Magnetrührer gelöst. Anschließend wurde mit einer Einmalpipette 100ml 10x PBS zugefügt und alles auf 1000ml aufgefüllt. Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert und bei 4°C kühl gelagert. |
| Fixierlösung: | 0,5g Paraformaldehyd wurden in einem Becherglas abgewogen und nach Zugabe von 30ml Aqua dest. unter Erhitzen auf einem Magnetrührer gelöst. Nach Abkühlung wurde die Lösung in 50ml Messzylinder überführt 5ml 10x PBS und 5µl TWEEN 20 hinzugefügt und auf 50ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C für 24 Stunden. |
| Formalin-Lösung: | 0,4g Natriumdihydrogenphosphat und 0,65g Dinatriumhydrogenphosphat wurden 90ml Aqua bidest. gelöst, anschließend mit 10ml Formalin auf 100ml aufgefüllt. |
| HBSS-DTT: | HBSS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺), 2mM Dithiotreitol (DTT), 0,01M HEPES |
| HBSS- EDTA: | HBSS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺), 1mM EDTA, 1mM HEPES |
| Lyse- Puffer: | 155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 100 mM EDTA |
| Nitrovanadatmolybdat-Lösung: | Unter Rühren 200 ml Ammoniummolybdat- Lösung mit 200 ml Ammoniummetavanadat- Lösung versetzen. Langsam 134 ml |

Salpetersäure (w = 65%) zugeben und auf 1000 ml (Ultrareinstwasser) auffüllen.

Zellkulturmedium: Einer Flasche VLE RPMI 1640 mit (w/o) Glutamin werden 50ml FCS (fetal calves serum) standardisiert, 5ml Penicillin/Streptomycin und 5ml HEPES unter der sterilen Arbeitsbank zugefügt und gut vermischt. Haltbarkeit 4 Wochen, gelagert bei 4°C.

Tabelle 29: Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| CELLSTAR® 12 Well Cell Culture Plate | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |
| CELLSTAR® U-shape with lid, TC-plate 96 Well sterile | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |
| ELISA plate MICROLON F-shape | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |
| Entsorgungsbeutel SEKUROKA® | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Eppendorf – Pipette Typ Reference 0,5- 10µl | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Eppendorf–Pipette Typ Research1- 10ml | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Eppendorf – Pipette Typ Research 1- 5000µl | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Eppendorf – Pipette Typ Research 10- 100µl | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Eppendorf – Pipette Typ Research 100- 1000µl | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Eppendorf- Gefäße–REACTION TUBES 1,5ml, graduated, attached cap, natural, non-pyrogenic, human DNA- free, RNase und DNase free | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |
| Eppendorf Multipipette® plus | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| FACS Röhrchen FALCON® 5ml Polystyrene Round Bottom Tube, non-sterile | Becton Dickinson (N.J., USA) |
| Greiner-Röhrchen 15ml, CELLSTAR® PP test tubes | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |
| Greiner-Röhrchen 50ml, CELLSTAR® PP test tubes | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |
| Kanülen BD microlance 3 (1,2x40mm) | BD (Schwechat, Österreich) |
| Kanülen BOVI-VET (2,1x80mm) | Kruuse (Langeskov, Dänemark) |
| Kanülen Neolus 0,9x40mm | BSN Medical (Hamburg, Deutschland) |
| Kanülen SUPRA (1,2x100mm) | Ehrhardt Medizinprodukte GmbH (Geislingen, Deutschland) |

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| Kryoröhrchen Roti®- Store | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Mikrotiterplatte 96 Well, U-shape | VWR International (Darmstadt, Deutschland) |
| Monovette® 9ml SERUM | SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland) |
| Multiadapter lang | SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland) |
| Passageflaschen CELLSTAR® Tissue Culture Flasks | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |
| Petrischalen | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |
| Pipettenspitzen 1000µl (blau) | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Pipettenspitzen 100µl SafeSeal- Tips® PreCision | Biozym (Oldendorf, Deutschland) |
| Pipettenspitzen 10ml ep T.I.P.S. Standard Bulk 1-10ml | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Pipettenspitzen 10µl SafeSeal- Tips® PreCision | Biozym (Oldendorf, Deutschland) |
| Pipettenspitzen 1250µl SafeSeal- Tips® Professional | Biozym (Oldendorf, Deutschland) |
| Pipettenspitzen 200 µl (gelb) | SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland) |
| Pipettenspitzen 5ml ep T.I.P.S. Standard Bulk 1000-5000µl | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Serologische Pipetten CELLSTAR® 5ml-25ml | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |
| S-Monovette® 2,7ml EDTA | SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland) |
| S-Monovette® 7,5ml LH | SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland) |
| Spritze 10ml Terumo syringe steril | BSN Medical (Hamburg, Deutschland) |
| Spritze 20ml Terumo syringe steril | BSN Medical (Hamburg, Deutschland) |
| Sterile Skalpellklingen Nr.22 Aesculap Division | BRAUN (Tuttlingen, Deutschland) |
| Steriler Spritzen-Vorsatzfilter 0,2µm | VWR International (Darmstadt, Deutschland) |
| Steriler Spritzen-Vorsatzfilter 0,45µm | VWR International (Darmstadt, Deutschland) |
| VWR Light- Duty- Tissue Wipers | VWR International (Darmstadt, Deutschland) |
| VWR Standard Weigh Boats Medium, Einwaageschälchen | VWR International (Darmstadt, Deutschland) |

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| VWR Standard Weigh Boats Mikro, Einwaageschälchen | VWR International (Darmstadt, Deutschland) |
| Zellschaber DISPENSER 24cm, drehbare Klinge, gammasterilisiert, RNA/DNA frei, RNase/DNase frei | TPP (Schweiz) |

Tabelle 30: Geräte

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| Abflamngerät gasprofi 1 WLD-TEC | Wartewig Labor- und Dentaltechnik (Göttingen, Deutschland) |
| Atomabsorptionsspektrometer AAS vario 6 | Firma Analytik Jena AG (Jena, Deutschland) |
| Durchflusszytometer BD FACS Calibur | Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) |
| Gaschromatograph Agilent Technologies 6890N mit Autosampler G2614A und Injektionsturm G2613A | Agilent (Böblingen, Deutschland) |
| Gefrierschrank Biomedical Freezer (-30°C) Modell MDF-U 333 | SANYO (München, Deutschland) |
| HPLC Anlage Agilent 1100 | Firma Agilent (Santa Clara, CA, USA) |
| HPLC – Säule Phenomenex Chirex 3126 (D)-penicillamine 150 x 4,6mm | Firma phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) |
| HPLC- Vorsäule Phenomenex C18 4.0 L mm x 2.0 ID mm | phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) |
| Inkubator biocenter salvis lab | Renggli AG (Rotkreuz, Schweiz) |
| Inkubator | BINDER (Camarillo, CA, USA) |
| Kapillarsäule Agilent 19095N-123 HP-INNOWAX Polyethylen Glycol | Agilent (Waldbronn, Deutschland) |
| Kühlschrank LIEBHERR Profiline | LIEBHERR (Biberach, Deutschland) |
| Magnetrührer IKA-RH-HAT/C | IKA Werke (Staufen, Deutschland) |
| Magnetrührer IKAMAG® RH | Jahnke& Kunkel IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland) |
| Magnetrührer Magnetic Stirrer R1000 | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Magnetrührer Mini-MR-standard | IKA Werke (Staufen, Deutschland) |
| Makro-Elementaranalysator vario MAX CN elementar | Elementar Analysensysteme GmbH (Hanau, Deutschland) |

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| Mikroskop Axiostar plus | Carl Zeiss (Jena, Deutschland) |
| Messzylinder 10-1000ml | Brand (Wertheim, Deutschland) |
| Neubauer- Kammer, depth 0,1mm | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| pH Meter seven Multi METTLER TOLEDO | METTLER TOLEDO (Schwerzenbach, Schweiz) |
| Photometer sunrise | Tecan (Crailsheim, Deutschland) |
| Rohfaser-Analysator Ankom 2000 | Ankom Technology (Macedon, N.Y., USA) |
| Rührer IKAMAG® RH | Jahnke& Kunkel IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland) |
| Schüttelinkubator Modell 3033 GFL® | GFL (Burgwedel, Deutschland) |
| Schüttler Heidolph Multireax | Heidolph (Kelheim, Deutschland) |
| Sandbad | Harry Gestigkeit GmbH (Düsseldorf, Deutschland) |
| Schott-Flaschen 100-1000ml | Schott (Mainz, Deutschland) |
| Soxhlet- Apparat Extraktionssystem B-811 | Büchi Labortechnik GmbH (Essen, Deutschland) |
| Spektralphotometer Ultrospec 2000 pharmacia biotech | Biochrom Ltd. (Cambridge, UK) |
| Sterile Arbeitsbank-Flow Herasafe | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| Sterile Arbeitsbank LAMINAR AIR FLOW | Faster (Ferrara, Italien) |
| Stoppuhr DIGI-LOCK-TIMER | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Thoma-Kammer, depth 0,02mm | ROTH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Veraschungsöfen thermicon P Heraeus | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries (N.Y., USA) |
| Waage Genius sartorius | sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Waage Modell Atilon Acculab | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Waage Sartorius WP110S | Sartorius AG (Göttingen, Deutschland) |
| Zentrifuge Heraeus Biofuge 13 | Heraeus (Hanau, Deutschland) |

| Bezeichnung | Hersteller |
|------------------------------|---------------------------------|
| Zentrifuge Heraeus Fresco 17 | Heraeus (Hanau, Deutschland) |
| Zentrifuge Megafuge 1.0R | Heraeus (Hanau, Deutschland) |

Tabelle 31: Übersicht der für die Phänotypisierung der Immunzellen verwendeten primären Antikörper

| Primärer Antikörper | Bezeichnung, Hersteller |
|-------------------------------|---|
| CD2 | MSA4, α CD2 pig, Institut für Immunologie VU Wien, Österreich |
| CD5 | b53b7, α CD5 pig, Institut für Immunologie VU Wien, Österreich |
| CD5 | α CD5 (9G12), Fa. VMRD (Pullman, USA) |
| CD4 | Mouse Anti-porcine CD4a FITC (74-12-4), Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA) |
| CD8α | Mouse Anti-porcine CD8a RPE (76-2-11), Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA) |
| CD8β | Mouse Anti-porcine CD8 (PG 164A), Fa. VMRD (Pullman, USA) |
| CD14 | α porcine CD14 (MCA1218), Fa. Serotech (Toronto, Kanada) |
| CD16 | α porcine CD16 (SM1732), Fa. Acris (Herford, Deutschland) |
| CD21 | Mouse Anti-porcine CD21 (BB6-11C9.6), Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA) |
| CD25 | α porcine CD25 (K231.3B2), Fa. Acris (Herford, Deutschland) |
| CD45 | CD45 (K252-1E4), Fa. Serotech (Toronto, Kanada) |
| CD45RC | CD45RC (3a56), Institut für Immunologie VU Wien, Österreich |
| MHCII | α -MHCII (MSA3), Fa. VMRD (Pullman, USA) |
| SWC3a | Purified mouse Anti-porcine monocyte/granulocyte SWC3a (74-22-15A), Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) |
| TCR1 | α -po- TCR1-N4 (PGBL22-A), Fa. VMRD (Pullman, USA) |

Tabelle 32: Übersicht der für die Phänotypisierung der Immunzellen verwendeten sekundären Antikörper

| Sekundäre Antikörper | Bezeichnung, Hersteller |
|--------------------------------------|--|
| Goat-anti-mouse IgG1 RPE (1072-09) | Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA) |
| Goat-anti-mouse IgG1 FITC (1070-02) | Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA) |
| Goat-anti-mouse IgG2a FITC (1080-02) | Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA) |
| Goat-anti-mouse IgG2b FITC (1090-02) | Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA) |
| Goat-anti-mouse IgG2a RPE (1080-09S) | Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA) |

Tabelle 33: Übersicht der verwendeten Reagenzien des ELISA SALMOTYPE® Pig Screen (Labordiagnostik, Leipzig)

| Reagenzien |
|---|
| Verdünnungspuffer, 1:10 verdünnt |
| Negativkontrolle, <i>Salmonella</i> -negatives Serum vom Schwein in Puffer, gebrauchsfertig |
| Positivkontrolle, <i>Salmonella</i> -positives Serum vom Schwein in Puffer, gebrauchsfertig |
| Waschpuffer, Pufferlösung mit Tween und Konservierungsstoffen, gebrauchsfertig |
| Anti-IgG-HRP, anti-Schwein-IgG-Meerrettichperoxidasekonjugat in Puffer, gebrauchsfertig |
| TMB-(Tetramethylbenzidin) Substratlösung, gebrauchsfertig |
| Stopplösung, 0,5M Schwefelsäure, gebrauchsfertig |

Tabelle 34: Übersicht der verwendeten Reagenzien des ELISA zur Bestimmung spezifischer Salmonellenantikörper

| Reagenzien |
|--|
| Verdünnungspuffer, 1:10 verdünnt (aus SALMOTYPE® Pig Screen Test-Kit) |
| Negativkontrolle, <i>Salmonella</i> -negatives Serum vom Schwein in Puffer, getestet von LDL |
| Positivkontrolle, <i>Salmonella</i> -positives Serum vom Schwein in Puffer, getestet von LDL |
| Waschpuffer, (aus SALMOTYPE® Pig Screen Test-Kit) |
| Goat anti-pig IgG-Fc-HrPO, 1:50 vorverdünnt, Fa. Bethyl Laboratories (Montgomery, USA) |
| Goat anti-pig IgA HRP conjugated, 1:50 vorverdünnt, Fa. Bethyl Laboratories (Montgomery, USA) |
| Goat anti-pig IgM HRP conjugated (1mg/ml), Fa. Bethyl Laboratories (Montgomery, USA) |
| TMB-(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) Substratlösung, Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) |
| Stopplösung, 0,5M Schwefelsäure, Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland) |

LDL = Labordiagnostik, Leipzig

Tabelle 35: Übersicht der verwendeten Reagenzien des Pig Haptoglobin ELISA (Dunn Labortechnik, Asbach)

| Reagenzien |
|--|
| Verdünnungspuffer, 1:5 verdünnt |
| Waschpuffer, Pufferlösung mit Tween und Konservierungsstoffen, 1:20 verdünnt |
| purified anti-Pig-Haptoglobin-Meerrettichperoxidaekonjugat in Puffer, 1:100 verdünnt |
| 3,3',5,5'-TMB-(Tetramethylbenzidin) Substratlösung, pH 3,3, gebrauchsfertig |
| Stopplösung, 0,3M Schwefelsäure, gebrauchsfertig |
| Anti-Pig Haptoglobin beschichtete ELISA Mikrotiterplatte |
| Pig HP-(Haptoglobin) Kalibrator |

Tabelle 36: Verdünnung der Standardansätze zur Bestimmung der Haptoglobinkonzentration im Serum der Schweine

| Standard | Konzentration der Standardlösung (ng/ml) | Menge der Referenzlösung | Menge der ELISA-Verdünnungslösung |
|---------------|--|--------------------------|-----------------------------------|
| 7 | 400 | 5µl Pig HP Kalibrator | 687µl |
| 6 | 200 | 300µl von Standard 7 | 300µl |
| 5 | 100 | 300µl von Standard 6 | 300µl |
| 4 | 50 | 300µl von Standard 5 | 300µl |
| 3 | 25 | 300µl von Standard 4 | 300µl |
| 2 | 12,5 | 300µl von Standard 3 | 300µl |
| 1 | 6,25 | 300µl von Standard 2 | 300µl |
| 0 (Kontrolle) | 0 | - | 500µl |

Tabelle 37: Übersicht der verwendeten Reagenzien des Phagotest®

| Reagenzien |
|--|
| Waschlösung, Instamed-Salze in 1000ml destilliertem Wasser gelöst |
| opsonisierte FITC-markierte <i>E.coli</i> Bakterien (2×10^9 /ml) |
| Quenchlösung, gebrauchsfertig |
| Lyselösung, 1:10 verdünnt |
| DNA-Färbelösung, gebrauchsfertig |

Tabelle 38: Übersicht der für die Lymphozytenproliferation eingesetzten Mitogene

| Mitogen | Hersteller |
|-------------------------------------|---|
| Pokeweed Mitogen (PWM) | Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Steinheim, Deutschland) |
| Concanavalin A (Con A) | Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Steinheim, Deutschland) |
| Phytohämagglutinin M (PHA-M) | Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Steinheim, Deutschland) |

Tabelle 39: Übersicht der für die Lymphozytenproliferation verwendeten primären und sekundären Antikörper

| Antikörper | Hersteller |
|---|---|
| Primärer | |
| aCD5 pig b53b7 | Institut für Immunologie VU Wien, Österreich |
| aCD5 (9G12) | Fa. VMRD (Pullman, USA) |
| Sekundärer | |
| Goat-anti-mouse IgG1 RPE (1072-09) | Fa. Southern Biotech (Birmingham, USA) |
| Mouse-anti BrdU FITC | BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) |

| A1/09 | Durchgang | Ohrmarken-Nr. | Tag : Gewicht in kg | Datum: Temp. rekt. in °C | Kot- konsistenz | Kotfarbe | FA in g | Habitus | EZ | Verhalten | Bemerkungen |
|-----------------|--------------------|---------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------|----------|------------|---------|----|-----------|-------------|
| Gruppe 1 | Kontrolle=A | | | | | | | | | | |
| Bucht 1 | Tier 1 | | | | | | | | | | |
| | Tier 2 | | | | | | | | | | |
| Bucht 2 | Tier 3 | | | | | | | | | | |
| | Tier 4 | | | | | | | | | | |
| Gruppe 2 | F 0,04=B | | | | | | | | | | |
| Bucht 4 | Tier 1 | | | | | | | | | | |
| | Tier 2 | | | | | | | | | | |
| Bucht 5 | Tier 3 | | | | | | | | | | |
| | Tier 4 | | | | | | | | | | |
| Gruppe 3 | F 0,2 =C | | | | | | | | | | |
| Bucht 7 | Tier 1 | | | | | | | | | | |
| | Tier 2 | | | | | | | | | | |
| Bucht 8 | Tier 3 | | | | | | | | | | |
| | Tier 4 | | | | | | | | | | |
| Gruppe 4 | BKS 0,15 =D | | | | | | | | | | |
| Bucht 11 | Tier 1 | | | | | | | | | | |
| | Tier 2 | | | | | | | | | | |
| Bucht 12 | Tier 3 | | | | | | | | | | |
| | Tier 4 | | | | | | | | | | |

Abbildung 29: Bewertungsschema zur Beurteilung des Gesundheitszustandes der Ferkel

Legende: A= Kontrollgruppe, B= FRESTA® F 0,04%, C= FRESTA® F 0,2%, D= Bockshornkleesamen 0,15%

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf Tagungen als Poster oder als Vortrag vorgestellt.

Poster:

Gärtner, S., Zentek, J.:

Untersuchungen zur Wirkung eines pflanzlichen Futterzusatzes auf einen enteropathogenen *Escherichia coli* –Stamm.

8. BOKU-Symposium Tierernährung 2009, 01.10.2009

„Mineralstoffe in der Tierernährung: Leistung – Gesundheit - Umweltschutz“

Tagungsband 2009, S.160.

Eigenverlag: Abteilung Tierische Lebensmittel, Tierernährung und Ernährungsphysiologie

Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie der BOKU Wien

ISBN 978-3-900962-81-4

Gärtner, S., Tedin, L., Zentek, J.:

Interactions between pathogenic *Escherichia coli*, porcine intestinal cells, and a phytogetic feed additive and its main active substance.

7th Tannin Conference and 58th International Congress of the CA

Berlin, 29.08.-02.09.2010

Planta Medica (Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research)

Stuttgart, Thieme 2010, S.1309.

Vortrag:

Gärtner, S., Tedin, L., Zentek, J.:

Effects of phytogetic additives on the adhesion of pathogenic *E.coli* to porcine intestinal cells and on immunological parameters in piglets.

DELACON – Performing Nature Symposium

01.-03.11.2009, Kreta, Griechenland

DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. J. Zentek danke ich dafür, dass ich meine Dissertation am Institut für Tierernährung durchführen konnte und er mir mit Hilfe der Firma DELACON ein Stipendium für diese Zeit ermöglichte.

Der Firma Delacon danke ich für die gute Zusammenarbeit und die netten Zusammentreffen im Rahmen der Dissertation.

Petra Huck danke ich für ihre umfangreiche Hilfe und große Unterstützung während meiner Zellkultur- und Fütterungsversuche sowie für die sehr gute Beantwortung aller Fragen zur Durchflusszytometrie.

Anett Kriesten und Marita Eitinger möchte ich für die Unterstützung und Zuverlässigkeit bei den Messungen der verdauungsphysiologischen Parameter sowie für ihr stets „offenes Ohr“ bezüglich labortechnischer Fragen danken.

Für die Unterstützung bei der Isolierung der Immunzellen aus dem Darm sowie der Hilfe bei der Interpretation der immunologischen Ergebnisse möchte ich Frau Dr. L. Tedin herzlich danken.

Frau Dr. Arndt und den Mitarbeitern des Institutes für Biometrie danke ich für die statistische Beratung.

Ein großer Dank gilt auch den Tierpflegerinnen Frau Corinna Schmidt und Frau Ines Berber, die mir während des Fütterungsversuchs stets zur Seite standen. Corinna Schmidt möchte ich an dieser Stelle besonders für ihre aufmunternde Art danken.

In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank auch Sandra Böttche und Evelyn Ramelow für ihre liebevolle und unterstützende Hilfe während meiner gesamten Promotion. Ich werde gern an diese Zeit zurückdenken.

Meinem Freund Sebastian danke ich für die unendliche Geduld, die er mir in den letzten Monaten entgegengebracht hat.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, die den von mir eingeschlagenen Weg stets unterstützt haben, obwohl dieser nicht immer einfach für sie war.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

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, 19.06.2011

Stefanie Gärtner