

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

Larvenmehl von *Hermetia illucens* als Proteinträger im Futter für Hunde

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

vorgelegt von
Carolin Heide
Tierärztin
aus Rostock

Berlin 2017

Journal-Nr. 3984

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Susanne Hartmann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Corinna Eule

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dogs; hermetia illucens; immunology; chitin; chitinase; protein sources;
digestibility

Tag der Promotion: 20.07.2017

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: 978-3-86387-835-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017

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 2017

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literatur	2
2.1	Insekten als alternative Proteinquelle	2
2.1.1	Insekten als Nahrungsquelle	2
2.1.2	Insektenproduktion	2
2.1.3	Insekten als Futtermittel	6
2.1.4	Nährstoffgehalt.....	8
2.1.5	<i>Hermetia illucens</i> als Futtermittel.....	13
2.1.5.1	Nährstoff- und Aminosäuregehalt von <i>Hermetia illucens</i>	13
2.1.5.2	Fütterung und Verdaulichkeit von <i>Hermetia illucens</i>	17
2.2	Futtermittelunverträglichkeit	20
2.2.1	Futtermittelintoleranz.....	20
2.2.1.1	Pharmakologische Reaktionen.....	20
2.2.1.2	Metabolische Reaktionen	21
2.2.1.3	Idiosynkratische Reaktionen.....	21
2.2.1.4	Toxische Mechanismen.....	21
2.2.2	Futtermittelallergie.....	22
2.2.2.1	Ursachen.....	23
2.2.2.1.1	Proteine	23
2.2.2.1.2	Zusatzstoffe	24
2.2.2.1.3	Sonstige.....	24
2.2.2.2	Diagnostik	24
2.2.2.3	Eliminationsdiät.....	26
2.2.2.3.1	Selbstgekochte Diät	26
2.2.2.3.2	Kommerzielle Diätfuttermittel	27
2.3	Zusammenfassung der Literatur.....	28
3	Material und Methoden.....	30
3.1	Versuchsziel.....	30
3.2	Versuchstiere	30
3.3	Versuchsfutter	30
3.4	Versuchsplan	31
3.4.1	Zeitliche Abfolge durchgeführter Untersuchungen.....	31
3.5	Untersuchungen.....	32
3.5.1	Allgemeinuntersuchung.....	32

3.5.2	Körpermasse.....	32
3.5.3	Kotkonsistenz und Trockensubstanz des Kotes	32
3.5.4	Gesamtkotmenge.....	33
3.6	Blutabnahme.....	33
3.7	Proteinextraktion und Proteinbestimmung im <i>Hermetia illucens</i>	
	Larvenmehl nach Bradford	34
3.7.1	Durchführung der Proteinextraktion.....	34
3.7.2	Proteinbestimmung nach Bradford	34
3.7.2.1	Prinzip.....	34
3.7.2.2	Durchführung	34
3.8	Durchflusszytometrie der mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	37
3.8.1	Prinzip.....	37
3.8.2	Isolierung der mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation... 38	
3.8.2.1	Prinzip und Durchführung.....	38
3.8.3	Phänotypisierung der mononukleären Zellen	39
3.8.3.1	Prinzip.....	39
3.8.3.2	Durchführung	40
3.8.4	Mitogen- und futtermittelantigeninduzierter Lymphozytenproliferationstest..... 43	
3.8.4.1	Prinzip.....	43
3.8.4.2	Durchführung des mitogeninduzierten Lymphozytenproliferationstest 43	
3.8.4.3	Durchführung des futtermittelantigeninduzierten	
	Lymphozytenproliferationstest	44
3.9	Bestimmung der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit.....	46
3.9.1	Prinzip.....	46
3.9.2	Durchführung	47
3.9.2.1	Rohnährstoffbestimmung	47
3.9.2.1.1	Trockensubstanz.....	47
3.9.2.1.2	Rohprotein	47
3.9.2.1.3	Rohasche.....	47
3.9.2.1.4	Rohfett.....	48
3.9.2.1.5	Rohfaser	48
3.9.2.2	Bestimmung der Mengen- und Spurenelemente	48
3.9.2.2.1	Vorbereitung der Proben.....	48
3.9.2.2.2	Messung der Mengen- und Spurenelemente	48
3.9.2.2.3	Messung von Phosphor	49
3.9.2.3	Titandioxidbestimmung	49
3.10	Bestimmung der bakteriellen Metaboliten in Kotproben.....	52

3.10.1	Kurzkettige Fettsäuren	52
3.10.1.1	Prinzip	52
3.10.1.2	Durchführung	53
3.10.2	D- und L-Laktat	53
3.10.2.1	Prinzip	53
3.10.2.2	Durchführung	53
3.10.3	Ammonium	54
3.10.3.1	Prinzip	54
3.10.3.2	Durchführung	54
3.11	Bestimmung der Chitinaseaktivität in Kotproben	59
3.11.1	Prinzip	59
3.11.2	Durchführung	59
3.12	Bestimmung des Chitingehalts in Futter- und Kotproben	62
3.12.1	Prinzip	62
3.12.2	Durchführung	62
3.12.2.1	Vorbereitung Glucosaminkalibrierreihe	62
3.12.2.2	Vorbereitung der Futter- und Kotproben	62
3.13	Statistische Auswertung der Ergebnisse	64
4	Ergebnisse	65
4.1	Versuchsdiäten	65
4.2	Gesundheitszustand und Körpermasse	66
4.3	Gesamtkotmenge, Trockensubstanz des Kotes und Kotkonsistenz	66
4.4	Blutbild und Differentialblutbild	67
4.5	Lymphozytenphänotypisierung	68
4.6	Mitogeninduzierter Lymphozytenproliferationstest	68
4.7	Futtermittelantigeninduzierter Lymphozytenproliferationstest	71
4.8	Scheinbare Gesamtverdaulichkeit des Kontroll- und Versuchsfutters	76
4.9	Kurzkettige Fettsäuren in den Kotproben	76
4.10	D- und L-Laktat in den Kotproben	77
4.11	Ammonium in den Kotproben	78
4.12	Aktivität der Chitinase in den Kotproben	78
4.13	Chitingehalt in Futter- und Kotproben	79
5	Diskussion	80
5.1	Versuchsdesign	80
5.2	Versuchstiere und Versuchsfutter	80
5.3	Kotkonsistenz und tägliche Kotmenge	80
5.4	Blutbild und Differentialblutbild	81

5.5	Lymphozytenphänotypisierung	81
5.6	Mitogeninduzierter Lymphozytenproliferationstest.....	83
5.7	Futtermittelinduzierter Lymphozytenproliferationstest.....	84
5.8	Scheinbare Gesamtverdaulichkeit der beiden Futtermittel.....	84
5.9	Bakterielle Metaboliten in den Kotproben	89
5.9.1	Kurzkettige Fettsäuren in den Kotproben	89
5.9.2	Ammonium in den Kotproben	91
5.10	Chitinaseaktivität in den Kotproben	92
5.11	Chitingehalt in Futter- und Kotproben.....	93
5.12	Schlussfolgerung und Ausblick.....	94
6	Zusammenfassung.....	95
7	Summary.....	97
8	Literaturverzeichnis	98
9	Anhang.....	113
9.1	Publikationsverzeichnis	114
9.2	Danksagung.....	115
9.3	Selbständigkeitserklärung	116

Abkürzungsverzeichnis

MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
Abb.	Abbildung
AMCase	acidic mammalian chitinase
α	Alpha
β	Beta
BSA	Bovine Serum Albumin
BrdU	Bromodesoxyuridin
CD	Cluster of Differentiation
Con A	Concanavalin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EW-S	Entwicklungsstadium
et al.	et alii
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FM	Fischmehl
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FSC	Forward Scatter
γ	Gamma
GFM	Geflügelfleischmehl
ggr.	geringgradig
°C	Grad Celsius
g	Gramm
HI	<i>Hermetia illucens</i>
hgr.	hochgradig
Ig	Immunoglobulin
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IL	Interleukin
IE	Internationale Einheit
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
l	Liter

MHC	Major Histocompatibility Complex
m	männlich
mk	männlich kastriert
mM	Millimolar
min	Minute
mgr.	mittelgradig
Mw	Mittelwert
mol	Mol
nm	Nanometer
ω	Omega
ppm	parts per million
PBS	Phosphate buffered saline
P	Phosphor
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PWM	Pokeweed Mitogen
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ra	Rohasche
Rfa	Rohfaser
Rfe	Rohfett
Rp	Rohprotein
sV	scheinbare Verdaulichkeit
segm.	segmentkernig
sek.	Sekunden
stabk.	stabkernig
SE	Sojaextraktionsschrot
SD	Standardabweichung
NfE	Stickstofffreie Extraktstoffe
SI	Stimulationsindex
SSC	Side Scatter
H	Stunde
Tab.	Tabelle
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TiO ₂	Titandioxid
TGF	Transforming Growth Factor
TS	Trockensubstanz
UV	Ultraviolett

U	Unit
uS	ursprüngliche Substanz
VIS	visible
H ₂ O	Wasser
W	weiblich
x g	x-fache Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$

Tabellen und Abbildungsverzeichnis

Tab. 1: Als Nahrungs- bzw. Futtermittel gezüchtete Insekten (Leppä, 2009)	3
Tab. 2: Verarbeitungsschritte und -methoden der Insekten	4
Tab. 3: Durchschnittliche Nährstoffgehalte (% der Trockensubstanz) von verschiedenen Insektenspezies.....	9
Tab. 4: Nährstoffgehalte (in %) von <i>Hermetia illucens</i> als Larve, Vorpuppe und Puppe.....	13
Tab. 5: Vergleich der Nährstoff- und Aminosäuregehalte (in %) von <i>Hermetia illucens</i> Larve bzw. Puppe, Fischmehl und Sojaextraktionsschrot (Barroso et al., 2014).....	14
Tab. 6: Vergleich der Nährstoff- und Aminosäuregehalte von <i>Hermetia illucens</i> Larve bzw. Puppe, Geflügelfleischmehl, Fischmehl und Sojaextraktionsschrot	16
Tab. 7: Scheinbare Verdaulichkeiten (in %) von der Test ¹ - und Kontrolldiät ² bei Steinbutten (Kroeckel et al., 2012).....	18
Tab. 8: Scheinbare Verdaulichkeiten (in %) von der Kontroll ¹ - und Testdiät ² bei Schweinen (Newton et al., 1977)	19
Tab. 9: <i>In vitro</i> Verdaulichkeiten (%) von <i>Hermetia illucens</i> Larve bzw. Puppe, Geflügelfleischmehl, Fischmehl und Sojaextraktionsschrot (Bosch et al., 2014).....	19
Tab. 10: Gruppeneinteilung, Name, Geburtsdatum und Geschlecht der Hunde.....	30
Tab. 11: Zusammensetzung des Versuchs- und Kontrollfutters	31
Tab. 12: Zusatzstoffe des Versuchs- und Kontrollfutters pro kg im Futter	31
Tab. 13: Scoring System zur Beurteilung der Kotkonsistenz (Middelbos et al., 2007).....	33
Tab. 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Blutabnahme.....	33
Tab. 15: Mischtablette Rinderserumalbumin-Kalibrierreihe	35
Tab. 16: 1. Schritt: Herstellung der Lösungen für den 20 mM Sörensen-Natriumphosphat-Puffer	36
Tab. 17: 2. Schritt: Zusammenfügen der Lösungen für die Zusammensetzung des 20 mM Sörensen-Natriumphosphat-Puffers (pH 7,4).....	36
Tab. 18: Zusammensetzung des Bradford Reagenz.....	36
Tab. 19: Verwendete Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Proteinextraktion und Proteinbestimmung nach Bradford	36
Tab. 20: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Durchflusszytometrie	40
Tab. 21: Zusammensetzung der Erythrozyten-Lyse-Puffer-Lösung	41
Tab. 22: Zusammensetzung des FACS Puffers.....	41
Tab. 23: Zusammensetzung des Zellkulturmediums.....	41

Tab. 24: Primäre Antikörper für den ersten Inkubationsschritt bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der mononukleären Zellen	42
Tab. 25: Sekundäre Antikörper für den zweiten Inkubationsschritt bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der mononukleären Zellen	42
Tab. 26: Verwendete Mitogene für den Lymphozytenproliferationstest.....	45
Tab. 27: Zusammensetzung des DNase I Puffers	45
Tab. 28: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Lymphozytenproliferationstests	45
Tab. 29: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit.....	49
Tab. 30: Zusammensetzung der Nitrovanadatmolydat-Lösung für die Phosphorbestimmung - Herstellung der Lösung A: Ammoniummolybdat-Lösung.....	51
Tab. 31: Zusammensetzung der Nitrovanadatmolydat-Lösung für die Phosphorbestimmung - Herstellung der Lösung B: Ammoniummetavanadat-Lösung.....	51
Tab. 32: Zusammensetzung der Nitrovanadatmolydat-Lösung für die Phosphorbestimmung - Herstellung der Nitrovanadatmolybdat-Lösung	51
Tab. 33: Herstellung der Kalibrierlösung 1 mg/ml β Phosphor für die Phosphorbestimmung.....	52
Tab. 34: Pipettierschema der Standardreihe in der Makroküvette für die Phosphorbestimmung.....	52
Tab. 35: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Analyse der bakteriellen Metabolite.....	55
Tab. 36: Zusammensetzung der Standardlösung (0,5 mM) zur Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren	56
Tab. 37: Zusammensetzung der Verdünnungslösung für die Proben zur Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren	56
Tab. 38: Herstellung der Lösungen für die Laktat-Analyse - Herstellung der Lösung A: 2,5 mM Kupfer-II-Sulfat-Lösung mit 2-Propanol.....	56
Tab. 39: Herstellung der Lösungen für die Laktat-Analyse - Herstellung der Lösung B: 0,5 mM Kupfer-II-Sulfat-Lösung.....	57
Tab. 40: Herstellung der Lösungen für die Laktat-Analyse - Herstellung der Lösung C: Carrez I	57
Tab. 41: Herstellung der Lösungen für die Laktat-Analyse - Herstellung der Lösung D: Carrez II	57
Tab. 42: Herstellung der Standardreihe für die Laktat-Analyse - Herstellung der Stammlösung (10 mmol/l).....	57

Tab. 43: Herstellung der Standardreihe für die Laktat-Analyse - Herstellung der 1 mmol/l Lösung	57
Tab. 44: Herstellung der Standardreihe für die Laktat-Analyse - Herstellung der 0,1 mmol/l Lösung	57
Tab. 45: Herstellung von 100 mM MOPS pH 7 für die Ammoniumbestimmung	58
Tab. 46: Herstellung von 0,2 % Natriumhypochloritlösung in 1 M Natriumhydroxid für die Ammoniumbestimmung	58
Tab. 47: Herstellung von 1000 $\mu\text{M NH}_4^+$ in 100 mM MOPS pH 7 für die Ammoniumbestimmung	58
Tab. 48: Standardreihe für die Ammoniumbestimmung	58
Tab. 49: Herstellung der Standardreihe zur Bestimmung der Chitinaseaktivität	60
Tab. 50: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Analyse der Chitinaseaktivität	60
Tab. 51: 1. Schritt, Zusammensetzung des 0,1 M Sörensen-Natriumphosphat-Puffer (pH 6)	61
Tab. 52: 2. Schritt, Zusammensetzung des 0,1 M Sörensen-Natriumphosphat-Puffer (pH 6)	61
Tab. 53: Herstellung der Glucosaminkalibrierreihe für die Chitingehaltbestimmung	63
Tab. 54: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung des Chitingehaltes	63
Tab. 55: Analytische Bestandteile des Kontroll- und Versuchsfutter	65
Tab. 56: Analytische Bestandteile des Larvenmehls von <i>Hermetia illucens</i>	66
Tab. 57: Durchschnittliche tägliche Kotmenge, Trockensubstanz des Kotes und Kotkonsistenz der Fäzes der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw \pm SD); n = 12	67
Tab. 58: Ergebnisse des Blutbildes inkl. Differentialblutbildes der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw \pm SD); n = 12	67
Tab. 59: Phänotypisierung der peripheren mononukleären Lymphozyten (in %) der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw \pm SD); n = 12	68
Tab. 60: Vergleich der Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten (Stimulationsindex) durch die Mitogene Pokeweed Mitogen, Concanavalin A und Phytohämagglutinin der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw \pm SD); n = 12	68
Tab. 61: Vergleich der Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten (Stimulationsindex) mit dem Proteinextrakt (<i>Hermetia illucens</i> Larvenmehl) in verschiedenen Konzentrationen (30, 75, 125, 250 und 500 $\mu\text{g/ml}$) der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw \pm SD); n = 12	71
Tab. 62: Scheinbare Gesamtverdaulichkeit (in %) nach Kontroll- und Versuchsfütterung	

(Mw ± SD); n = 12	76
Tab. 63: Absolute Konzentrationen (µmol/g ursprünglicher Substanz) der kurzkettigen Fettsäuren und der Gesamtfettsäuren in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12.....	77
Tab. 64: Prozentuale Verteilung (Mol. %) der kurzkettigen Fettsäuren in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12.....	77
Tab. 65: D-Laktat- und L-Laktatkonzentrationen (µmol/g ursprünglicher Substanz) in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 11	78
Tab. 66: Ammoniumkonzentrationen (µmol/g ursprünglicher Substanz) in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12	78
Tab. 67: Enzymaktivität (Unit ¹) der Chitinase in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12.....	78
Tab. 68: Chitinkonzentration (in g/kg TS) im Kontroll- und Versuchsfutter	79
Tab. 69: Chitinkonzentration (in g/kg TS) in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12.....	79
Tab. 70: Prozentualer Anteil der Lymphozytenuntergruppen (Mw ± SD) (Bokemeyer, 2003).....	81
Tab. 71: Prozentualer Anteil der Lymphozyten bei der Rasse Beagle (Mw ± SD).....	82
Tab. 72: Vergleich der scheinbaren Gesamtverdaulichkeiten verschiedener Proteinquellen in der Hundefütterung	86
Tab. 73: Scoring System mit Abbruchkriterien zur Beurteilung des Allgemeinbefindens...	113
Abb. 1: Versuchsplan mit Probennahme.....	32
Abb. 2: Streulicht-Density-Plot Darstellung mit gekennzeichnete Lymphozytenpopulation .	38
Abb. 3: Darstellung der verschiedenen Zellschichten nach der Dichtegradientenzentrifugation	39
Abb. 4: Prolifizierte Lymphozyten durch das Mitogen Con A am Beispiel eines Hundes nach Fütterung des Kontrollfutters	69
Abb. 5: Prolifizierte Lymphozyten durch das Mitogen PHA am Beispiel eines Hundes nach Fütterung des Kontrollfutters	70
Abb. 6: : Prolifizierte Lymphozyten durch das Mitogen PWM am Beispiel eines Hundes nach Fütterung des Kontrollfutters	70
Abb. 7: Antigenkonzentration von 500 µg/ml im futtermittelinduzierten Lymphozytenproliferationstest von Fee nach Kontrollfutterfütterung.....	72
Abb. 8: Antigenkonzentration von 500 µg/ml im futtermittelinduzierten Lymphozytenproliferationstest von Fee nach Kontrollfutterfütterung ohne BrdU Zusatz	72

Abb. 9: Antigenkonzentration von 500 µg/ml im futtermittelinduzierten
Lymphozytenproliferationstest von Mojo nach Versuchsfutterfütterung 73

Abb. 10: Antigenkonzentration von 500 µg/ml im futtermittelinduzierten
Lymphozytenproliferationstest von Mojo nach Versuchsfutterfütterung ohne BrdU Zusatz .. 74

Abb. 11: Antigenkonzentration von 500 µg/ml im futtermittelinduzierten
Lymphozytenproliferationstest von Fee nach Versuchsfutterfütterung 75

Abb. 12: Antigenkonzentration von 500 µg/ml im futtermittelinduzierten
Lymphozytenproliferationstest von Fee nach Versuchsfutterfütterung ohne Anti-BrdU-
Antikörper 75

1 Einleitung

In den letzten Jahren wurde vermehrt über ein Auftreten von Futtermittelunverträglichkeiten gegen Futtermittelantigene bei Hunden berichtet. Bei diesen Antigenen handelt es sich hauptsächlich um Proteine. Daher ist es notwendig, neue Proteinquellen für Hunde ausfindig zu machen. Insektenprotein wird im Humanbereich schon seit Jahren als Alternative zu anderen Proteinquellen diskutiert und gelangt auch jetzt in den Fokus der Tiermedizin. Bisher liegen wissenschaftliche Studien zum Einsatz von Insektenprotein nur im Nutztierbereich vor, während der Einsatz in der Heimtierernährung noch nicht tiefergehend betrachtet wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Hermetia illucens* Larve als tierische Proteinquelle in einem Trockenfutter für Hunde eingesetzt, welches perspektivisch auch als Proteinträger für Eliminationsdiäten für Hunde geeignet wäre. Es wurde im Hinblick auf verdauungsphysiologische und immunologische Parameter mit einem Trockenfutter, welches als Proteinquelle Lamm enthielt, verglichen.

Die Verdaulichkeit der Nährstoffe wurde anhand der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit mit Hilfe der Marker methode bestimmt. Zudem wurden der Chitingehalt und die geschätzte Verdaulichkeit des Chitins bestimmt. Ob der Chitingehalt im Futter Auswirkung auf enzymatische Vorgänge, speziell auf die Chitinaseaktivität im Verdauungstrakt des Hundes haben kann, wurde ebenfalls untersucht.

Um mögliche Reaktionen des Immunsystems durch die Fütterung zu erfassen, wurden Methoden ausgewählt, welche Aufschluss auf die Immunantwort geben könnten. Dazu zählte zum einen die Analyse der Lymphozytensubpopulationen, die Reaktion der Lymphozyten auf Mitogene und die Reaktion der Lymphozyten auf einen ausgewählten Proteinextrakt im Lymphozytenproliferationstest.

2 Literatur

2.1 Insekten als alternative Proteinquelle

2.1.1 Insekten als Nahrungsquelle

Es gibt ca. 2.000 essbare Insekten weltweit (Ramos Elorduy, 1997). In der traditionellen Ernährung der Menschen gehören Insekten zu den wertvollen Nahrungsmitteln. Die Ernährung stellt nicht nur eine Notwendigkeit dar, sondern die Ernährungsgewohnheiten werden durch Religion, regionale Unterschiede, Sozialstatus, Tradition und Erziehung geprägt. In vielen Teilen von Asien, Afrika, Südamerika oder Australien sind Insekten Teil der Ernährungskultur. Besonders Heuschrecken, Raupen, Termiten, Käfer, Grashüpfer und Ameisen sind beliebte Nahrungsmittel (Bukkens, 1997).

2.1.2 Insektenproduktion

Die Produktion und Nutzung der essbaren Insekten als Nahrungsquelle ist aufgrund mehrerer Vorteile interessant. Die Fruchtbarkeit von Insekten ist hoch und sie verwerten ihr Futter effizient und schnell (Veldkamp et al., 2012). Sie brauchen wenig Trinkwasser und die Platzanforderungen sind als gering einzustufen (Rumpold and Schlueter, 2013). Damit sind die Produktionskosten geringer, im Vergleich zu der konventionellen Tierhaltung.

Besonders die niedrigen Treibhausgase stellen einen entscheidenden ökologischen Vorteil dar. In der Studie von Oonincx et al. (2010) wurde die Kohlenstoffdioxidbildung und die Ammoniakbildung gemessen. Die Werte der Kohlenstoffdioxidbildung bei der Insektenproduktion waren im Vergleich zu der konventionellen Tierhaltung ähnlich und bei einigen Insektenarten deutlich niedriger. Die Ammoniakbildung fiel bei allen Insektenarten geringer aus, im Vergleich zu der konventionellen Tierhaltung. In der Studie von Hackstein and Stumm (1994) produzierten keine der drei getesteten Zweiflügler Methan.

Laut Leppla (2009) kann die Zucht von Insekten aber auch schwierig sein, da die Insekten spezifische Anforderungen an die Umwelt, wie z. B. Temperatur, Feuchtigkeit und Fütterung haben.

Die Zucht von Insekten kann sich entweder auf einzelne Entwicklungsschritte der Insekten beziehen, z. B. vom Ei zur Larve, von der Nymphe zum adulten Tier oder alle Entwicklungsschritte durchmachen (von Ei zu Ei) (Leppla, 2009). In Tab. 1 sind alle gegenwärtig gezüchteten Insekten dargestellt.

Tab. 1: Als Nahrungs- bzw. Futtermittel gezüchtete Insekten (Leppla, 2009)

Name	Ordnung	Menge
Schmetterlinge und Falter	Leptidoptera	> 300 Spezies
Käfer	Coleoptera	> 200 Spezies
Fliegen und Mücken	Diptera	ca. 200 Spezies
Wanzen	Heteroptera	< 100 Spezies
Bienen und Wespen	Hymenoptera	< 100 Spezies
Grillen und Grashüpfer	Orthoptera	ca. 10-20 Spezies
Florfliegen	Neuroptera	ca. 10-20 Spezies
Schaben	Blattodea	ca. 10-20 Spezies
Termiten	Isoptera	ca. 10-20 Spezies
Flöhe	Siphonaptera	ca. 10-20 Spezies

Einen ökologischen und ökonomischen Vorteil der Insektenproduktion stellt die Möglichkeit dar, organischen Abfall zu verwerten (Ramos Elorduy, 1997). Die Produktion kann auf unterschiedlichen organischen Materialien, u. a. Exkrementen aus der Tierhaltung, Fischabfall, Fäkalien oder Hausmüll erfolgen. Durch die unterschiedlichen Nahrungsquellen der Insekten kann die Nährstoffzusammensetzung der Insekten bzw. deren Larven verändert werden.

Werden die Larven im Larvenstadium mit einer Mischung aus Fischabfall und Kuhdung gefüttert, sind sie im Stadium kurz vor der Verpuppung schwerer, als wenn sie nur mit Kuhdung gefüttert wurden (St-Hilaire et al., 2007a). Der Fettgehalt der Schwarzen Soldatenfliege (*Hermetia illucens*) steigt von 21 % auf 30 % an, wenn Fischabfall, unabhängig von der eingesetzten Menge, im Futter enthalten ist (St-Hilaire et al., 2007a). Ebenso steigt der Gehalt an n-3 Fettsäuren, wie Linolensäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure an.

Finke (2002) sieht den Nährstoffgehalt von in Gefangenschaft lebenden Insekten, z. B. in Zuchtstationen, generell als minderwertiger an, als von Insekten, die in freier Wildbahn leben. Grund dafür ist das Substrat, auf dem diese gehalten werden bzw. die Nahrungsbestandteile des Futters, da diese in der Regel nicht so vielfältig sind wie in freier Natur.

Neben dem Einfluss des Substrats auf die Zusammensetzung, scheint es auch einen Einfluss auf das Wachstum der Larven zu haben. Die Entwicklungsphase vom Ei zum Verpuppungsstadium von *Hermetia illucens* kann unterschiedlich lang sein. Nach Fütterung mit Kuhdung und Fischabfällen dauerte diese Phase 2 Monate (St-Hilaire et al., 2007a), wohingegen dieselbe Entwicklungsphase bei einer Fütterung mit einer Mischung aus

Geflügeldung und diversen pflanzlichen Komponenten (Luzernemehl, Maismehl, Weizenkleie und Biertreber) nur 22,5 bis 24,1 Tage benötigte (Tomberlin et al., 2002). Als Grund für die unterschiedlichen Entwicklungszeiten wird der geringere Nährstoffgehalt im Kuhludung vermutet (St-Hilaire et al., 2007a), Lignin könnte ein limitierender Faktor sein (Stanogias and Pearce, 1987).

Nicht nur das Substrat, auf dem die Insekten gehalten werden, nimmt Einfluss auf die Zusammensetzung der Insekten, sondern auch die Verarbeitungsmethoden. In verschiedenen Studien wurden Insekten bis zum fertigen Produkt unterschiedlich verarbeitet (Tab. 2). Nicht jeder Autor beschreibt das Waschen der Insekten vor der Verarbeitung. Einige Insekten werden vor der Verarbeitung tiefgefroren oder in Alkohol konserviert und andere sofort verarbeitet. Nicht alle Insekten werden getrocknet und gemahlen, sondern ohne vorherige Verarbeitung analysiert. Außerdem werden unterschiedliche Trocknungsverfahren beschrieben. Diese unterscheiden sich insbesondere in der Temperatur und der Dauer der Trocknung. Auch weitere Schritte möglicher Fraktionierungen, z. B. Entfettung, können den Nährstoffgehalt verändern (Veldkamp et al., 2012)

Tab. 2: Verarbeitungsschritte und -methoden der Insekten

Autor	Verarbeitungsschritte und -methoden
Finke (2002)	Vor der Verarbeitung wurde allen Insekten, bis auf <i>Bombyx mori</i> , 24 h lang die Nahrung entzogen. Sie wurden tiefgefroren, auf Trockeneis gelagert und dann in das Labor zur Analyse transportiert.
Barroso et al. (2014)	Die Insekten wurden tiefgefroren und daraufhin gefriergetrocknet. Danach wurden sie gemahlen und bis zur Analyse wieder eingefroren.
Bosch et al. (2014)	Die Insekten wurden gefriergetrocknet. <i>Hermetia illucens</i> Larven und Puppen, die Puppen von <i>Musca domestica</i> und <i>Zophobas morio</i> wurden mittels Ultrazentrifugal Mühle ohne Sieb vorzerkleinert. Alle anderen Insekten dieser Studie mussten nicht vorzerkleinert werden. Danach wurden alle Insekten gemahlen.
Banjo et al. (2006)	Die adulten Stadien wurden getrocknet. Die unausgereiften Stadien wurden in ein Gefäß mit 80 %igem Alkohol gegeben und in ein Labor transportiert. Alle Insekten wurden im Ofen getrocknet und daraufhin gemahlen.

- St-Hilaire et al. (2007b) *Hermetia illucens* Vorpuppen wurden in einem elektrisch betriebenen Belüftungsofen bei 80 °C vorgetrocknet und für den Transport zum Labor eingefroren. Die Puppen von *Musca domestica* wurden lebend ins Labor transportiert und im Labor mittels Tiefemperaturzerkleinerung im flüssigem Stickstoff zerkleinert und anschließend bei 40 °C für 36 h getrocknet.
- Hale (1973) Die Insekten wurden gewaschen und im Ofen bei 105 °C für 24 h getrocknet. Daraufhin gemahlen und bis zur Studiennutzung tiefgefroren.
- Newton et al. (1977) Die Insekten wurden gewaschen und im Belüftungsofen bei 85 °C getrocknet. Daraufhin gemahlen und mit 35 ppm Butylhydroxyanisol und 35 ppm Butylhydroxytoluol versetzt. Bis zur Nutzung wurden diese tiefgefroren.
- Dordevic et al. (2008) Die Insekten wurden für 15 min mit 40 °C warmem, mikrobiologisch- und hygienisch sicherem Wasser gewaschen. Danach wurden die Insekten getrocknet. Eine Hälfte wurde im Ofen getrocknet und die andere Hälfte durch die Sonne.
- Kroeckel et al. (2012) Die Insekten wurden bei -24 °C tiefgefroren und zerschnitten, um intrazelluläres Fett auslaufen zu lassen. Daraufhin wurden sie bei 450 bar und 60 °C gepresst. Das hergestellte entfettete Material wurde bei 60 °C für 20 h getrocknet und daraufhin gemahlen.
-

2.1.3 Insekten als Futtermittel

Auch als Futtermittel für Tiere können Insekten bzw. das aus ihnen hergestellte Mehl eingesetzt werden. Sie haben einen hohen Protein- und Fettgehalt (Ramos Elorduy, 1997; Veldkamp et al., 2012). Dadurch können sie die Fütterung von Soja- und Fischmehl teilweise oder ganz ersetzen und somit möglicherweise Umweltbelastungen wie Überfischung und Anpflanzung von Monokulturen mindern (Sanchez-Muros et al., 2014; Veldkamp et al., 2012). Bei Überfischung sinkt die Fischmehlproduktion und die Preise für Fischmehl steigen an (Sanchez-Muros et al., 2014; Veldkamp et al., 2012). Daher ist es wichtig, erneuerbare, hochwertige Proteinquellen nutzbar zu machen.

Bisherige Untersuchungen zum Einsatz von Insekten bzw. deren Larven beziehen sich hauptsächlich auf die Fütterung von Nutztieren wie Geflügel, Schweine und Fische. Van Huis et al. (2013) beschreiben *Hermetia illucens*, *Musca domestica*, *Bombyx mori* und *Tenebrio molitor* als die vielversprechendsten Insekten für die Futtermittelproduktion. Für Veldkamp et al. (2012) sind die erfolgversprechendsten Insekten: *Hermetia illucens*, *Musca domestica* und *Tenebrio molitor*.

In China werden besonders *Tenebrio molitor*, *Tenebrio obscurus*, *Zophobas morio* und *Musca domestica* gezüchtet, um Hühner und Enten zu ernähren (Yi et al., 2010). Speziell in der Geflügelfütterung wurden verschiedene Insekten, wie Grillen *Acheta domesticus* (Nakagaki et al., 1987) bzw. *Anabrus simplex* (Finke et al., 1985) als Ersatz für die Sojaextraktionsschrot- und Fischmehlfütterung untersucht. In beiden Studien wurde eine Mais-Grillen-Diät im Vergleich zu einer Mais-Sojaextraktionsschrot-Diät verfüttert. In beiden Studien wurden keine Unterschiede in der Körpermassenzunahme bei Einsatz der verschiedenen Diäten verzeichnet. Wang et al. (2005) verfütterten die Grillenart *Gryllus testaceus* an Geflügel in unterschiedlichen Konzentrationen (5 %, 10 %, 15 %) und verglichen die Körpermassenzunahme mit einer Kontrollgruppe mit Mais, Sojaextraktionsschrot und Fischmehl als Proteinquelle. Auch in dieser Studie waren keine Unterschiede erkennbar.

Ojewola et al. (2005) fütterten vier tierische und eine rein pflanzliche Diät an Küken. Die vier Diäten bestanden aus Fischmehl, lokal produziertem Fischabfall, Mehl aus Flusskrebsabfall bzw. aus Grashüpfermehl (25 g/kg Futter) in Kombination mit Sojaextraktionsschrot und Mais. Die Tiere, die das Futter mit dem Grashüpfermehl erhielten, hatten die höchsten durchschnittlichen Tageszunahmen und das höchste Endgewicht nach 49 Versuchstagen. Außerdem hatten diese Tiere auch die höchste tägliche Futteraufnahme im Vergleich zu den

Tieren, die die anderen tierischen Diäten bekamen. Allerdings wiesen die Tiere, die mit der rein pflanzlichen Diät gefüttert wurden, die höchste Futteraufnahme auf.

Oyegoke et al. (2006) verfütterten Schmetterlingslarven von *Cirina forda* an Geflügel. Insgesamt wurden drei Diäten gefüttert (100 % *Cirina forda* Larven + 0 % Fischmehl; 50 % *Cirina forda* Larven + 50 % Fischmehl; 0 % *Cirina forda* Larven + 100 % Fischmehl). Es wurden keine Unterschiede im Futteraufnahmeverhalten, der Körpermassenzunahme und in der Wachstumsrate verzeichnet.

Ijaiya and Eko (2009) verfütterten Seidenraupenmehl von *Anaphe infracta* in unterschiedlichen Konzentrationen in Kombination mit Fischmehl. Auch in dieser Studie konnten keine Unterschiede in der Futteraufnahme, Körpermassenzunahme, Futtermittelnutzung und in der Verdaulichkeit der Nährstoffe beim Geflügel festgestellt werden.

Dordevic et al. (2008) untersuchten den Fütterungseinsatz von *Musca domestica* Larvenmehl und frischen Larven an Geflügel. Das Larvenmehl wurde zu 50 % in Kombination mit Fischmehl und zu 100 % an Masthähnchen verfüttert. Zusätzlich zu den beiden Diäten wurden als dritte Diät frische Larven in speziellen Futterbehältern angeboten. Die höchste Körpermassenzunahme nach 42 Tagen erreichten die Masthähnchen, die mit den frischen Larven gefüttert wurden. Im Gegensatz dazu erreichten die niedrigsten Körpermassenzunahmen die Masthähnchen, deren Futter zu 50 % aus Larvenmehl bestand.

Hwangbo et al. (2009) sahen 10 % und 15 % als optimale Konzentrationen von *Musca domestica* Larvenmehl in einer Diät für Masthähnchen an. Auch Ocio et al. (1979) verfütterten *Musca domestica* Larvenmehl, im Vergleich zur Fischmehl- und Sojaextraktionsschrotfütterung an Masthähnchen. Auch diese Studie stellte keine signifikanten Unterschiede in der Futtermittelnutzung und in der Körpermassenzunahme zwischen den einzelnen Diäten fest. Ramos-Elorduy et al. (2002) verfütterten unterschiedliche Konzentrationen (0 %, 5 %, 10 %) von *Tenebrio molitor* Larvenmehl an sieben Tage alte Küken. Nach 15 Tagen Versuchsdauer wurden keine Unterschiede in der Futteraufnahme und Körpermassenzunahme festgestellt.

Auch die Fütterung von Fischen mit Insektenmehl wird untersucht. Alegbeleye et al. (2012) setzten unterschiedliche Konzentrationen (0 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 %) von Grashüpfermehl (*Zonocerus variegatus*) in die Ration von Welsen ein. Die höchste Körpermassenzunahme erreichten die Fische, deren Futter 25 % Grashüpfermehl enthielt. Signifikante Unterschiede zu der Kontrolldiät, welche nur Fischmehl enthielt, konnten nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurden deutlich niedrigere Körpermassenzunahmen bei Fischen dokumentiert, die ausschließlich das Grashüpfermehl erhielten.

Ng et al. (2001) verfütterten Larvenmehl von *Tenebrio molitor* an Welse in unterschiedlichen Konzentrationen (20 %, 40 %, 60 %, 80 % und 100 %) in Kombination mit Fischmehl. Bis zu

einem Einsatz des Larvenmehls von 40 % in der Gesamtration ähnelten sich die Werte für Wachstum und Futtermittelverwertung, im Vergleich mit der Kontrolldiät (100 % Fischmehl). Bei höheren Konzentrationen sanken die Werte.

Auch der Einsatz von *Hermetia illucens* als Futtermittel wurde mehrfach publiziert. St-Hilaire et al. (2007b), Kroeckel et al. (2012) und Bondari and Sheppard (1981) setzten die Schwarze Soldatenfliege als Fischfutter ein. Newton et al. (1977) untersuchten den Einsatz von *Hermetia illucens* als Futtermittel bei Schweinen. Hale (1973) und Maurer et al. (2015) nutzten sie als Geflügelfutter (siehe 2.2.5).

2.1.4 Nährstoffgehalt

In der Nährstoffzusammensetzung der Insekten gibt es viele Unterschiede, bedingt durch die Spezies, unterschiedliche Substrate und Entwicklungsstufen, diese sind in Tab. 4 dargestellt. Durch ihren hohen Proteingehalt stellen Insekten eine wertvolle Futterquelle dar (Ramos Elorduy, 1997). Insekten werden auch als Proteinsupplemente genutzt, um andere Lebensmittel, wie Getreide, durch ihren hohen Proteingehalt aufzubessern (Bukkens, 1997). Zudem enthalten sie einen hohen Anteil an Fett (Barroso et al., 2014). Im Vergleich zu Sojaextraktionsschrot ist in Insekten der Gehalt von Arginin und Cystein niedriger (ausgenommen *Tenebrio molitor* Larve) und der Gehalt Methionin und Tyrosin höher (Veldkamp et al., 2012). Der Kalzium-, Eisen- und Kaliumgehalt liegt bei den meisten Insekten höher als in pflanzlichen und anderen tierischen Nahrungsmitteln (Ramos Elorduy, 1997).

Tab. 3: Durchschnittliche Nährstoffgehalte (% der Trockensubstanz) von verschiedenen Insektenspezies

Spezies	Ordnung	EW-S ¹	Rohprotein	Rohfett	NfE ²	Rohasche	Rohfaser	Quelle
		L	49,1	35,2	7,09	2,36	/	Finke (2002)
		L	52,7	32,8	/	3,20	/	Bernard et al. (1997)
		P	54,6	30,8	/	3,40	/	Bernard et al. (1997)
<i>Tenebrio molitor</i>	Coleoptera	A	65,3	14,9	/	3,31	/	Finke (2002)
		A	63,7	18,4	/	3,10	/	Bernard et al. (1997)
		L	58,4	30,1	8,00	3,50	/	Barroso et al. (2014)
		L	52,0	33,9	/	3,90	/	Bosch et al. (2014)
		L	46,8	42,0	2,61	2,37	/	Finke (2002)
<i>Zophoba morio</i>	Coleoptera	L	53,5	38,0	6,00	2,50	/	Barroso et al. (2014)
		L	47,0	39,6	/	3,00	/	Bosch et al. (2014)

Literatur

<i>Musca domestica</i>	Diptera	L	37,5	19,8	19,6	23,1	/	Ogunji et al. (2008)
		P	70,4	16,1	/	9,80	/	St-Hilaire et al. (2007b)
		L	56,8	20,0	/	6,80	/	Bernard et al. (1997)
		L	59,5	6,66	8,08	14,2	11,5	Dordevic et al. (2008)
		P	58,3	15,8	/	6,80	/	Bernard et al. (1997)
		L	46,9	31,3	15,3	6,50	/	Barroso et al. (2014)
		P	40,1	33,7	17,8	8,40	/	Barroso et al. (2014)
<i>Hermetia illucens</i>	Diptera	P	62,5	19,2	/	5,60	/	Bosch et al. (2014)
		L	42,1	34,8	1,40	14,6	/	Newton et al. (1977)
		VP	43,6	33,1	/	15,5	/	St-Hilaire et al. (2007b)
		L	47,0	32,6	5,09	8,63	6,65	Hale (1973)
		L	36,2	18,0	36,5	9,30	/	Barroso et al. (2014)

Literatur

		P	40,7	15,6	24,0	19,7	/	Barroso et al. (2014)
		L	56,1	12,8	/	12,6	/	Bosch et al. (2014)
		P	52,1	19,7	/	13,9	/	Bosch et al. (2014)
<i>Anaphe infracta</i>	Lepidoptera	L	22,1	16,8	73,1	1,77	2,65	Banjo et al. (2006)
<i>Cirina forda</i>	Lepidoptera	L	29,5	20,8	97,3	2,19	2,63	Banjo et al. (2006)
<i>Zonocerus variegatus</i>	Orthoptera	A	29,1	4,12	68,6	1,30	2,60	Banjo et al. (2006)
		A	66,6	22,1	/	3,57	/	Finke (2002)
		A	64,9	13,8	/	5,70	/	Bernard et al. (1997)
<i>Acheta domesticus</i>	Orthoptera	N	67,3	14,4	3,93	4,80	/	Finke (2002)
		A	70,6	17,7	/	5,30	/	Bosch et al. (2014)

Literatur

A	73,1	15,9	5,40	5,60	/	Barroso et al. (2014)
---	------	------	------	------	---	--------------------------

¹EW-S: Entwicklungsstadium; L: Larve; P: Puppe; VP: Vorpuppe; N: Nymphe; A: Adult

²NfE: Stickstofffreie Extraktstoffe

2.1.5 *Hermetia illucens* als Futtermittel

Die Schwarze Soldatenfliege stellt ein Insekt dar, welches in der Futtermittelindustrie genutzt werden kann (van der Spiegel et al., 2013; Van Huis et al., 2013). Sie gehört zur Familie der Waffenfiegen, ist ein Zweiflügler (Diptera) (Haupt and Haupt, 1998; May, 1961) und hat eine wespenähnliche Erscheinung. Die durchschnittliche Größe beträgt 13-20 mm (May, 1961). Das durchschnittliche Gewicht der Schwarzen Soldatenfliege liegt bei 250 mg, sie kann aber auch bis zu 350 mg schwer und 30 mm lang werden (Hale, 1973).

2.1.5.1 Nährstoff- und Aminosäuregehalt von *Hermetia illucens*

Die Nährstoff- und Aminosäuregehalte der Schwarzen Soldatenfliege wurden bereits in verschiedenen Untersuchungen analysiert. Es zeigten sich Unterschiede in der Zusammensetzung sowohl zwischen derselben Entwicklungsstufe verschiedener Studien als auch zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien (Tab. 4).

Tab. 4: Nährstoffgehalte (in %) von *Hermetia illucens* als Larve, Vorpuppe und Puppe

Autor	EW-S ¹	Nährstoffe (in %) in der Trockensubstanz				
		Rp ²	Rfe ³	NfE ⁴	Ra ⁵	Rfa ⁶
Hale (1973)	L	47,0	32,6	5,09	8,63	6,65
Newton et al. (1977)	L	42,1	34,8	1,40	14,6	/
St-Hilaire et al. (2007b)	VP	43,6	33,1	/	15,5	/
Barroso et al. (2014)	L	36,2	18,0	36,5	9,30	/
	P	40,7	15,6	24,0	19,7	/
Bosch et al. (2014)	L	56,1	12,8	/	12,6	/
	P	52,1	19,7	/	13,9	/

¹EW-S: Entwicklungsstadium; L: Larve; P: Puppe; VP: Vorpuppe; ²Rp: Rohprotein; ³Rfe: Rohfett;

⁴NfE: Stickstofffreie Extraktstoffe; ⁵Ra: Rohasche; ⁶Rfa: Rohfaser

In der Studie von Barroso et al. (2014) wiesen die Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin und Valin höhere relative Werte im Larvenmehl als im Fischmehl und Sojaextraktionsschrot auf. Die Gehalte von Histidin, Lysin, Methionin und Threonin waren in absteigender Reihenfolge in Fischmehl, Larvenmehl und Sojaextraktionsschrot zu verzeichnen (Tab. 5).

Tab. 5: Vergleich der Nährstoff- und Aminosäuregehalte (in %) von *Hermetia illucens* Larve bzw. Puppe, Fischmehl und Sojaextraktionsschrot (Barroso et al., 2014)

Nährstoffe (in %) in der Trockensubstanz	Substrat			
	HI ¹ Larve	HI ¹ Puppe	FM ²	SE ³
Rohprotein	36,2	40,7	73,0	50,4
Rohfett	18,0	15,6	8,2	3,00
Rohasche	9,30	19,7	18,0	7,80
Stickstofffreie Extraktstoffe	36,5	24,0	0,80	38,8
Aminosäuren (in %) anteilig der Gesamtaminosäuren				
Arginin	8,24	8,05	7,42	8,03
Histidin	5,29	5,16	7,86	3,28
Isoleucin	5,76	5,34	5,04	5,47
Leucin	6,87	6,83	7,81	8,01
Lysin	7,60	7,31	8,78	6,34
Methionin	1,50	3,26	2,93	1,01
Phenylalanin	6,88	6,22	5,38	5,79
Prolin	6,16	5,56	4,76	4,99
Threonin	5,39	4,95	6,26	4,17
Tyrosin	6,35	7,14	3,91	2,93
Valin	6,31	6,34	5,56	5,45

¹ HI: *Hermetia illucens*; ² FM: Fischmehl; ³ SE: Sojaextraktionsschrot

Bosch et al. (2014) verglichen die Nährstoff- und Aminosäuregehalte von unterschiedlichen Insektenspezies mit Geflügelfleischmehl, Fischmehl und Sojaextraktionsschrot (Tab. 6). Auch Hale (1973) und Kroeckel et al. (2012) untersuchten *Hermetia illucens* im Hinblick auf den Nährstoff- und Aminosäuregehalt (Tab. 6).

Der Rohproteingehalt war in fast allen Insekten höher als im Sojaextraktionsschrot. Den höchsten Rohaschewert von allen Insekten erreichten die Schwarzen Soldatenfliegen, sowohl in den Puppen als auch in den Larven. Im Gegensatz zu anderen Insekten fanden Bosch et al. (2014) einen der höchsten Aminosäuregehalte auch in den Puppen der Schwarzen Soldatenfliegen.

Literatur

Tab. 6: Vergleich der Nährstoff- und Aminosäuregehalte von *Hermetia illucens* Larve bzw. Puppe, Geflügelfleischmehl, Fischmehl und Sojaextraktionsschrot

Nährstoffe (in %) in der Trockensubstanz	Substrat							
	HI ¹ Larve (Bosch et al., 2014)	HI ¹ Puppe (Bosch et al., 2014)	HI ¹ Larve (Hale, 1973)	HI ¹ Vorpuppe (Kroeckel et al., 2012)	GFM ² (Bosch et al., 2014)	FM ³ (Bosch et al., 2014)	FM ³ (Kroeckel et al., 2012)	SE ⁴ (Bosch et al., 2014)
Rohprotein	56,1	52,1	47,0	47,6	69,1	71,0	64,1	51,6
Rohfett	12,8	19,7	32,6	11,8	12,8	9,20	9,80	2,50
Rohasche	12,6	13,9	8,63	15,9	15,4	19,9	16,6	6,80
Aminosäuren (%) des Rohproteins								
Arginin	3,70	4,20	4,57	5,71	5,80	4,50	5,93	6,30
Histidin	4,40	4,70	3,85	3,34	3,70	3,40	2,09	3,10
Isoleucin	4,00	4,20	5,41	5,19	3,80	4,80	3,98	5,00
Leucin	6,10	6,50	7,69	8,63	6,40	7,10	7,10	7,80
Lysin	5,40	5,40	5,51	7,12	5,60	7,40	7,16	6,20
Methionin	1,40	1,70	1,98	2,18	1,00	1,90	2,64	2,00
Phenylalanin	3,10	3,30	5,41	3,89	3,30	3,50	3,99	5,20
Threonin	3,60	3,60	4,05	4,66	3,60	4,00	4,12	3,90
Valin	5,50	5,70	5,40	7,21	4,60	5,00	4,81	5,00
essentielle Aminosäuren total	37,1	39,3	/	/	37,8	41,5	/	44,4

¹ HI: *Hermetia illucens*; ² GFM: Geflügelfleischmehl; ³ FM: Fischmehl; ⁴ SE: Sojaextraktionsschrot

2.1.5.2 Fütterung und Verdaulichkeit von *Hermetia illucens*

St-Hilaire et al. (2007b) nutzten die Vorpuppen der Schwarzen Soldatenfliege als Ersatz für Fischmehl und Fischöl in Futterrationen bei der Regenbogenforelle. Der Insektenanteil belief sich auf 25 % bzw. 50 % der Gesamtration. Die Kontrolldiät bestand überwiegend aus Fischmehl. Die Körpermassenzunahme am Ende der neunwöchigen Fütterungsperiode unterschied sich zwischen den Fischen, welche die Kontrolldiät und die Diät mit dem 25 %igen Anteil an Vorpuppen gefressen hatten, nicht signifikant. Die Körpermassenzunahmen der Fische, mit dem Futter mit einem 50 %igen Anteil an Vorpuppen, fielen geringer aus. Der Gehalt an n-3 Fettsäuren der Fische, welche mit Insekten gefüttert wurden, war niedriger, als bei den Fischen, welche die Kontrolldiät bekamen.

Auch Bondari and Sheppard (1981) nutzten die Larven der Schwarzen Soldatenfliege als Fischfutter. Sie verfütterten über zehn Wochen sechs unterschiedliche Diäten an Welse und Buntbarsche in unterschiedlichen Kombinationen von Larven und kommerzieller Diät mit hohen (45 %) und niedrigen (30 %) Proteingehalten, eine alleinige Larvendiat (Proteingehalt von 39 %) und eine Kontrolldiät (Proteinanteil von 45 %). Die Körpermassen und die Länge der Fische unterschieden sich nach zehn Wochen Fütterung zwischen den Fütterungsgruppen nicht wesentlich voneinander (Bondari and Sheppard, 1981).

Kroeckel et al. (2012) fütterten 56 Tage sechs unterschiedliche Diäten an Steinbutte. Es wurden 0 %, 17 %, 33 %, 49 %, 64 % und 76 % *Hermetia illucens* Vorpuppenmehl genutzt, um Fischmehl zu ersetzen. Die Futteraufnahme war bei den Steinbutten niedriger, welche eine Diät mit 33 % oder mit einem höheren Anteil an *Hermetia illucens* in der Diät bekamen. Das Endgewicht der Fische ohne *Hermetia illucens* Anteil im Futter war deutlich höher, im Vergleich zu den Diäten, die *Hermetia illucens* enthielten. Der Futteraufwand war am günstigsten während der Fütterung mit der Diät mit 0 % und 17 % *Hermetia illucens*. Die Ganzkörperanalyse der Fische am Ende des Versuches unterschied sich im Fett-, Energie- und im Feuchtigkeitsgehalt. Mit höherem Anteil an *Hermetia illucens* in der Diät stieg der Feuchtigkeitsgehalt, während der Energie- und Fettgehalt sank. Die scheinbaren Verdaulichkeiten wurden anhand zweier Diäten mit einem Anteil von 33 % *Hermetia illucens* und der Kontrolldiät ohne *Hermetia illucens* bestimmt (Tab. 7).

Tab. 7: Scheinbare Verdaulichkeiten (in %) von der Test¹- und Kontrolldiät² bei Steinbutten (Kroeckel et al., 2012)

	Scheinbare Verdaulichkeiten (in %)	
	Testdiät	Kontrolldiät
Organische Substanz	71,0	83,2
Rohprotein	81,1	89,1
Rohfett	92,8	98,7

¹ Anteil von 33 % *Hermetia illucens*; ² Anteil von 0 % *Hermetia illucens*

Auch Hale (1973) machte Fütterungsversuche mit den *Hermetia illucens* Larven. Die Kontrolldiät enthielt 35 % Sojaextraktionsschrot und die Larvendiät enthielt 35 % *Hermetia illucens* Larvenmehl. Am Ende der Fütterung konnten keine entscheidenden Unterschiede zwischen beiden Gruppen in Hinblick auf die Körpermassenzunahme festgestellt werden. Die Tiere, welche die Kontrolldiät bekamen, nahmen 7 % mehr Futter auf.

Maurer et al. (2015) prüften bei Legehennen Futtermischungen mit unterschiedlichen Gehalten an *Hermetia illucens* Mehl. Die erste Diät enthielt 12 % *Hermetia illucens* Mehl und 18 % Sojakuchen. Die zweite Diät enthielt 24 % *Hermetia illucens* Mehl. Die Kontrolldiät bestand aus 36 % Sojakuchen. Nach einer dreiwöchigen Fütterung wurden die Parameter Futteraufnahme, Eiproduktion, Körperkondition und Eimasse ausgewertet. Es wurde eine Tendenz zur höheren Futteraufnahme während der Fütterung der zweiten Diät im Vergleich zur Kontrolldiät beobachtet. Alle anderen Parameter unterschieden sich nicht untereinander.

Newton et al. (1977) verglichen die Fütterung und die scheinbare Verdaulichkeit (Tab. 8) von Sojaextraktionsschrot und *Hermetia illucens* Larvenmehl bei Schweinen. Die erste Diät umfasste einen Anteil von 25,5 % Sojaextraktionsschrot und 61,1 % Mais. Die zweite Diät enthielt 33 % Larvenmehl und 63,6 % Mais. Insgesamt hatten beide Diäten einen Rohproteinanteil von ca. 20 % und einen Rohfettanteil von ca. 13 %.

Tab. 8: Scheinbare Verdaulichkeiten (in %) von der Kontroll¹- und Testdiät² bei Schweinen (Newton et al., 1977)

	Scheinbare Verdaulichkeiten (in %)	
	Kontrolldiät	Testdiät
Trockensubstanz	85,3	77,5 ³
Rohfett	73,0	83,6
Rohfaser	49,2	53,8 ³
Rohasche	61,7	45,2 ³
Stickstofffreie Extraktstoffe	91,5	84,7 ³
Stickstoff	77,2	76,0 ³

¹ 25,5 % Sojaextraktionsschrot und 61,1 % Mais

² 33 % Larvenmehl und 63,6 % Mais

³ $P \leq 0.05$

Bosch et al. (2014) testeten *in vitro* die Verdaulichkeit von zwei Entwicklungsstufen von *Hermetia illucens* (Tab. 9). Die Verdaulichkeit der organischen Substanz war bei den *Hermetia illucens* Puppen geringer als bei den Larven. Die Vermutung ist, dass es sich bei den Puppen um höhere kutikuläre Proteinverdichtungen handeln könnte. Hierfür könnte auch die geringere Stickstoffverdaulichkeit sprechen. Bosch et al. (2016) untersuchten später weitere Insektenpezies. Die *in vitro* Stickstoffverdaulichkeit von *Hermetia illucens* Larven erreichte mit 87,7 % ähnliche Werte.

Tab. 9: *In vitro* Verdaulichkeiten (%) von *Hermetia illucens* Larve bzw. Puppe, Geflügelfleischmehl, Fischmehl und Sojaextraktionsschrot (Bosch et al., 2014)

Substrat	<i>in vitro</i> Verdaulichkeiten (in %)	
	Organische Substanz	Stickstoff
<i>Hermetia illucens</i> Larve	84,3	89,7
<i>Hermetia illucens</i> Puppe	68,1	77,7
Geflügelfleischmehl	85,8	87,9
Fischmehl	82,1	85,7
Sojaextraktionsschrot	80,6	94,7

2.2 Futtermittelunverträglichkeit

Futtermittelunverträglichkeiten bei Hunden durch ein oder mehrere Futtermittel können verschiedene Gründe haben. Generell ist die Futtermittelallergie von der Futtermittelintoleranz zu unterscheiden. Futtermittelintoleranzen sind nicht immunvermittelt und können durch verschiedenste Ursachen hervorgerufen werden wie z. B. Toxine, Pharmaka, metabolische Reaktionen oder idiosynkratische Mechanismen (Verlinden et al., 2006b). Eine immunvermittelte Reaktion wird als Futtermittelallergie oder als diätetische Hypersensibilität bezeichnet (Verlinden et al., 2006b). In dem Begriff Futtermittelunverträglichkeiten sind beide Begrifflichkeiten eingeschlossen (Paßlack and Zentek, 2013). Bei einer Futtermittelintoleranz können Symptome schon nach der Erstexposition auftreten, wohingegen es bei einer Futtermittelallergie erst zu einer Sensibilisierung kommen muss (Hall, 2002).

2.2.1 Futtermittelintoleranz

Die Futtermittelintoleranz kann auf unterschiedlichen Mechanismen/Reaktionen beruhen, die in der Literatur häufig in pharmakologische, metabolische, idiosynkratische und toxische Varianten unterteilt werden (Anderson, 1986). Diese Unterteilung ist allerdings sehr schematisch und unter den üblichen praktischen Bedingungen schwer ursächlich differenzierbar (Verlinden et al., 2006b).

2.2.1.1 Pharmakologische Reaktionen

Pharmakologische Reaktionen werden durch pharmakologisch aktive Stoffe ausgelöst, die in Lebensmitteln oft natürlicherweise enthalten sind. Beispielsweise befinden sich in Kaffee, Tee, Kakao oder Schokolade Methylxanthine (Kovalkovicova et al., 2009). Generell werden Methylxanthine in der Medizin als Analeptika, Bronchodilatoren, Vasodilatoren, Diuretika oder als Kardiotonika eingesetzt. Nimmt der Hund diese durch Nahrungsmittel auf, kann es zu vielfältigen Symptomen, wie z. B. Unruhe, Erbrechen, Durchfall, Dyspnoe oder Polyurie kommen. Auch die Aufnahme von unverarbeiteten Sojabohnen kann aufgrund eines Trypsininhibitors zu pharmakologischen Reaktionen führen, ebenso wie Veränderungen des n-3-n-6-Fettsäuren Verhältnisses in der Nahrung (Hall, 2002).

2.2.1.2 **Metabolische Reaktionen**

Metabolische Reaktionen treten z. B. bei übermäßigem Verzehr von Milch oder Milchprodukten beim Hund auf (Hall, 2002; Mundt and Meyer, 1989). Adulte Hunde können in der Regel nur 20-40 ml Milch bzw. Milchprodukte pro kg Körpermasse am Tag vertragen. Die Enzymaktivität der Laktase sinkt, je älter der Hund wird. Deshalb kann die Laktose nicht mehr im Dünndarm verdaut werden und gelangt in den Dickdarm. Dort wird der Milchzucker mikrobiell verstoffwechselt und es kommt durch nachfolgende Dysbiosen zu gastrointestinalen Symptomen wie Durchfall oder Flatulenzen (Paßlack and Zentek, 2013).

2.2.1.3 **Idiosynkratische Reaktionen**

Idiosynkratische Reaktionen ähneln der Futtermittelallergie, jedoch fehlt eine immunologische Reaktion (Anderson, 1986). Idiosynkratische Mechanismen werden durch „histamin-releasing-factors“ (Histaminfreisetzungsfaktoren) aktiviert (Willemse, 2002). Durch das daraufhin aktivierte Histamin entsteht bei den Hunden Juckreiz. Frisst der Hund z. B. verdorbenen Thunfisch bauen die Bakterien des Fisches die Aminosäure Histidin in Histamin um und es kommt zu einer entsprechenden Reaktion (Paßlack and Zentek, 2013).

2.2.1.4 **Toxische Mechanismen**

Toxische Mechanismen werden beispielsweise durch Mykotoxine oder bakterielle Toxine ausgelöst. Mykotoxine, wie Aflatoxin oder Penitrem A, oder das Exotoxin von Clostridium botulinum können solche toxischen Effekte auslösen (Anderson, 1986; Arp and Richard, 1979; Verlinden et al., 2006b).

Durch Aufnahme von toxinreichen Futtermitteln kann es beim Hund zu gastrointestinalen Beschwerden in Form von Durchfall, Erbrechen oder Übelkeit (Paßlack and Zentek, 2013) sowie Muskeltremor oder Krämpfen (Arp and Richard, 1979) kommen. Auch viszerale Petechien, hepatische Nekrosen und Hyperthermien können durch Mykotoxikosen ausgelöst werden (Arp and Richard, 1979). Diese Symptome sind in der Regel aber kurzfristig zu beobachten.

Auch die Aufnahme von Insektiziden, wie z. B. Pyrethrine, Carbamate, Organophosphate oder Pyrethroide und von zahlreichen Zierpflanzen, wie z. B. Stechapfel, englischer Efeu oder Paternosterbaum, kann zu neurologischen Störungen führen (Arp and Richard, 1979).

2.2.2 Futtermittelallergie

Die Futtermittelallergie ist die dritthäufigste Ursache für allergisch bedingte Hauterkrankungen, nach der Flohallergie und der Atopie (Verlinden et al., 2006b). Ungefähr bei 15-30 % Prozent aller dermatologischer Erkrankungen liegt eine dieser drei allergischen Ursachen vor (Willemse, 2002). Studien gehen davon aus, dass 1-5 % aller Hauterkrankungen auf Futtermittelallergien zurückzuführen sind (Walton, 1967).

Futtermittelallergien sind sowohl Ursache von Hauterkrankungen und saisonal unabhängiger Juckreiz als auch von gastrointestinalen Symptomen. Hautveränderungen und Juckreiz stellen die häufigsten Symptome dar (Day, 2005; Loeffler et al., 2004). Betroffene Hunde zeigen Alopezie, Hyperpigmentierung, Papel- oder Angioödembildung oder Hautentzündungen in Kombination mit Juckreiz (August, 1985; Baker, 1974; Meyer and Zentek, 2013; Rosser, 1993). Bei einer lokal begrenzten futtermittelallergenbedingten Hauterkrankung sind besonders das Gesicht, die Pfoten, die Achseln, der Perianalbereich oder die Ohren betroffen (Jackson, 2007; Loeffler et al., 2004). Proverbio et al. (2010) und Chesney (2002) stellten einen Zusammenhang zwischen einer beidseitigen Otitis externa und einer Futtermittelallergie fest. Auch eine einseitige Otitis kann Symptom einer Futtermittelallergie sein. Dennoch ist es auch möglich, dass sich die Symptome auf den ganzen Tierkörper ausbreiten (Chesney, 2002). Sekundäre Hautinfektionen sind eine relativ häufig beobachtete Folge (Day, 2005; Gaschen and Merchant, 2011; Jackson, 2007; Loeffler et al., 2004). Laut Rosser (1993) kommt es bei 35 % der Hunde mit einer Futtermittelallergie zu sekundär bedingten Pyodermien. Auch gastrointestinale Probleme, wie Durchfall, Erbrechen, dolentes Abdomen, Veränderung des Appetits und Gewichtsverlust (Hall, 1994), können Symptome darstellen, sind aber seltener (Walton, 1967) und weniger spezifisch (Hall, 2002). Ungefähr 10-15 % aller Hunde, die an einer Futtermittelallergie leiden, zeigen gastrointestinale Symptome (Carlotti et al., 1990; Tizard, 2013). Gastrointestinale Symptome und Hautveränderungen können auch in Kombination auftreten (Meyer and Zentek, 2013). Diese Kombination ist aber nicht pathognomonisch für eine Futtermittelallergie (Verlinden et al., 2006b), denn lediglich ca. 10-15 % der Hunde mit dermatologischen Symptomen, bedingt durch eine Futtermittelallergie, haben gleichzeitig gastrointestinale Symptome (Carlotti et al., 1990; Scott, 1978; Willemse, 2002). Sehr selten treten Symptome wie Rhinitis, Konjunktivitis, Erkrankungen des Harnapparates, muskuloskelettale Erkrankungen, zentralnervöse Erkrankungen oder Verhaltensauffälligkeiten auf (Ackerman, 1988; Carlotti et al., 1990; Day, 2005). Rosser (1993) beschrieb zwei Hunde mit idiopathischer Epilepsie. Während der Eliminationsdiät bekam keiner der Hunde Krämpfe. Als die Provokationsdiät wieder verabreicht wurde, traten die Krämpfe wieder auf und verschwanden wieder, als diese

abgesetzt wurde. Walton (1967) berichtete von zwei akuten asthmatischen Attacken bei Hunden.

Obwohl eine genetische Komponente ausgeschlossen wird (Chesney, 2002; Verlinden et al., 2006b), sind einige Rassen, wie z. B. der West Highland White Terrier, Deutscher Schäferhund, Labrador- oder Golden Retriever, häufiger betroffen als andere (Baker, 1974; Picco et al., 2008). Zwar sind die betroffenen Hunde meist jünger als ein Jahr (Proverbio et al., 2010; Rosser, 1993), es werden aber auch Patienten vorgestellt, die Symptome erst nach einigen Lebensjahren entwickeln (Harvey, 1993). Eine Verbindung zwischen Rasse und Alter scheint es nicht zu geben (Proverbio et al., 2010). Auch eine Geschlechtsprädisposition wird ausgeschlossen (Chesney, 2002).

2.2.2.1 Ursachen

2.2.2.1.1 Proteine

Die häufigsten Auslöser von Futtermittelallergien stellen die Futtermittelproteine dar. Generell können alle Futtermittelproteine ein allergisches Potenzial besitzen (Meyer and Zentek, 2013; Verlinden et al., 2006b). Ob die Proteine eine Reaktion auslösen, hängt von der Proteingröße, der Immunogenität des Proteins und der Darmpermeabilität ab (Taylor et al., 1987).

Das Molekulargewicht der allergenen Proteine variiert in der Literatur z. T. deutlich zwischen 51-58 kDa (Martin et al., 2004), 10-70 kDa (Verlinden et al., 2006b) oder 18-36 kDa (Halliwell, 1992). Laut Taylor et al. (1987) ist das Risiko geringer, dass Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 kDa allergenes Potenzial besitzen, allerdings können diese Proteine dann als Haptene wirken. Haptene sind niedermolekulare Stoffe, die nur in Verbindung mit einem Trägerprotein (Hapten-Carrier-Prinzip) ein vollwertiges Antigen bilden und daraufhin immunologische Reaktionen auslösen können (Kaufmann, 2013).

Häufige Futtermittel, die im Zusammenhang mit Allergien genannt werden, sind Rindfleisch, Milch, Hühnerfleisch und Weizen. Eier, Sojabohnen, Lammfleisch, Schweinefleisch, Fisch und Mais sind weniger häufig allergen (Day, 2005; Roudebush, 2013). Die meisten Hunde, bei denen eine Futtermittelallergie nachgewiesen wurde, reagieren im Durchschnitt auf zwei oder mehr Proteinquellen allergisch (Jeffers et al., 1996; Paterson, 1995). Kreuzreaktivitäten zwischen Rindfleisch und Kuhmilch bzw. zwischen Soja und Weizen konnten in der Studie von Jeffers et al. (1996) nicht festgestellt werden. Aber auch versteckte Proteine zur

Konsistenzverbesserung, wie z.B. das Milchprotein Natriumkaseinat, können Symptome einer Futtermittelallergie auslösen (Willemse, 2002).

2.2.2.1.2 Zusatzstoffe

Auch Farb- oder Konservierungsstoffe können als Haptene wirken. Fallbeispiele wurden bisher aber nur bei der Katze und nicht beim Hund beschrieben. Bei Hunden besteht der Verdacht, dass Zusatzstoffe ein allergisches Potenzial besitzen, gesichert ist diese Aussage aber nicht (Roudebush and Cowell, 1992). In einer Studie von Guilford et al. (1998) reagierte eine von 128 Katzen auf ein Zusatzstoffgemisch. Auch in einer anderen Studie erbrach eine von 70 Katzen nach der Eingabe eines Zusatzstoffgemisches. Um das Ergebnis zu bestätigen, wurde dieser Katze das Zusatzstoffgemisch nochmals eingegeben. Sie erbrach auch nach der zweiten Eingabe (Guilford et al., 2001). Keine der beiden Katzen in den Studien zeigte Symptome einer Futtermittelallergie nach Aufnahme von nur einem Zusatzstoff.

2.2.2.1.3 Sonstige

Die Rolle von Kohlenhydraten als Allergen wird in der Humanmedizin kontrovers diskutiert. Bei Hunden und Katzen wurden noch keine Hinweise auf eine allergene Wirkung von Kohlenhydraten beschrieben. Bei einer scheinbaren Unverträglichkeit gegen z. B. Mais wird eher eine Proteinunverträglichkeit des Futters vermutet (Cave, 2006; Gaschen and Merchant, 2011), als eine wahre Hypersensibilität gegen enthaltende Kohlenhydrate. Selbst wenn Mais als Kohlenhydratquelle verwendet wird, spielen Maisproteine (Mais Zein) eine Rolle. Auch Proteine des Weizens können zu allergischen Reaktionen führen. Sie lassen sich in vier Gruppen unterteilen: Globulin, Albumin, Gliadin und Gluten. Bei einem Hauttest mit Hunden wurde die höchste Reaktion auf das Protein Gliadin verzeichnet. Absteigende Reaktionen zeigten Gluten, Albumin und Globulin. Das reaktionsreichste Protein Gliadin besteht aus verschiedenen Fraktionen (α , β , γ und ω). Der α - und der β -Typ scheinen die reaktionsstärksten Fraktionen des Gliadins zu sein (Buchanan and Frick, 2002).

2.2.2.2 Diagnostik

Es gibt viele Möglichkeiten zur Diagnostik von Futtermittelallergien. Manche Tests sind kommerziell verfügbar. Jedoch verspricht keine der Möglichkeiten so eine genaue Diagnose wie die Durchführung einer Eliminationsdiät mit nachfolgender Provokation (Verlinden et al., 2006b).

Die derzeit sicherste und gebräuchlichste Methode, eine Futtermittelallergie zu diagnostizieren, ist die gezielte Fütterung mit einer Eliminationsdiät. Sie sollte einerseits über einen bestimmten Zeitraum gefüttert werden und andererseits sollte der Hund dieses Futter vorher nicht bekommen haben (August, 1985). Verbessern sich die klinischen Symptome während dieser Fütterungsperiode, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Futtermittelallergie ausgegangen werden.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wird nach der Phase der Eliminationsdiät noch einmal das Futter verabreicht, welches vermutlich für die klinischen Symptome verantwortlich war. Diese Durchführung wird als Provokation bezeichnet (Verlinden et al., 2006b). Treten nach dem Futterwechsel wieder klinische Symptome auf wird die Futtermittelallergie bestätigt (Biourge et al., 2004). Es besteht auch die Möglichkeit, dass nachdem die Symptome durch eine Eliminationsdiät verschwunden sind, einzelne Futterbestandteile, wie z. B. eine Protein- oder Kohlenhydratquelle, für 7-10 Tage zu füttern, um die einzelnen allergen wirkenden Bestandteile zu filtern (Hill, 1999; Jeffers et al., 1996). Dieser Test wird dann als Provokationstest bezeichnet (Verlinden et al., 2006b).

Im Allgemeinen ist eine Verbesserung der Hautsymptome meist erst nach 8-12 Wochen zu beobachten (Gaschen and Merchant, 2011), wohingegen gastrointestinale Symptome schon eher mit einer Eliminationsdiät verschwinden können, insofern es sich nicht um chronische gastrointestinale Symptome handelt. Dann ist es möglich, dass es erst nach ein bis zwei Monaten zu einer Verbesserung kommt (Halliwell, 1992).

Rosser (1993) befasste sich mit der Dauer von Eliminationsdiäten. Er zeigte, dass sich die Dauer einer Eliminationsdiät bis die Symptome einer Futtermittelallergie abgeklungen waren, zwischen den Hunden unterschied. Von den getesteten Hunden verschwanden bei nur 13 Hunden die Symptome innerhalb von drei Wochen. Andere benötigten bis zu acht Wochen. Im Gegensatz dazu benötigte keiner der 25 Hunde in einer Studie von Harvey (1993) länger als drei Wochen die Eliminationsdiät, um symptomlos zu werden.

In einer Studie von Paterson (1995) wurde bei dem Großteil der Hunde innerhalb von vier Wochen keine Symptome einer Futtermittelallergie mehr festgestellt. Nur zwei Hunde zeigten erst nach acht Wochen Eliminationsdiät keine Symptome mehr.

Daher ist es schwierig, eine genaue Dauer von Eliminationsdiäten festzusetzen. Diese sollte deshalb für ca. 3-10 Wochen gefüttert werden, um mögliche Verbesserungen der Symptome feststellen zu können (Hill, 1999).

2.2.2.3 Eliminationsdiät

Wenn eine Futtermittelallergie diagnostiziert wurde, kann der Besitzer entweder für seinen Hund kochen oder kommerzielle Diätfuttermittel verwenden.

2.2.2.3.1 Selbstgekochte Diät

Eine selbstgekochte Eliminationsdiät besteht aus einer Protein-, Kohlenhydrat-, Fett-, Mineralstoff- und Vitaminquelle. Im ersten Schritt wird nur die Proteinquelle über mindestens drei Wochen gefüttert. Zeigen sich keine Symptome, kann eine Kohlenhydratquelle mit der Proteinquelle kombiniert werden. Bleibt der Hund symptomfrei wird nun eine Fettquelle hinzugefügt. Genauso verläuft es mit dem Zusatz von Mineralstoffen und Vitaminen. Wenn der Hund es verträgt, kann ein vitaminisiertes Mineralstoffpräparat verwendet werden. Unter Umständen befinden sich tierische Rückstände in solch einem Ergänzungsfutter und können Allergiesymptome auslösen (Jackson, 2007). Ist das der Fall, müssen einzelne Futterkomponenten so kombiniert werden, dass der Mineralstoff- und Vitaminbedarf gedeckt ist. Zum Beispiel kann mit Kalziumkarbonat Kalzium bereitgestellt werden und der Einsatz von Leber kann den Kupfer- und Vitamin A Bedarf decken.

Jede Einzelkomponente muss mindestens drei Wochen lang gefüttert werden. Es ist auch möglich, eine Diät zu füttern, bei der alle Bestandteile zum gleichen Zeitpunkt für 6 bis 10 Wochen gefüttert werden (Jackson, 2007). Dadurch kommt es nicht zu möglichen Mängeln in der Nährstoffaufnahme und zudem ist der zeitliche Aufwand geringer.

Ein Vorteil der selbstgekochten Diät gegenüber kommerziellen Diätfuttermitteln ist, dass die Futterbestandteile individuell auf das Tier abgestimmt werden können und so eine genauere Kontrolle gewährleistet wird, was vertragen wird und was nicht.

Nachteilig bei einer selbstgekochten Diät kann der möglicherweise schwankende Nährstoffgehalt in der Diät sein - besonders am Anfang der Therapie (Paterson, 1995; Roudebush and Cowell, 1992). Auch durch Einwaagefehler kann es zu Nährstoffimbancen kommen (Hill, 1999). Außerdem kann die selbstgekochte Diät, gerade bei großen Hunden, hohe Kosten verursachen (Verlinden et al., 2006b).

2.2.2.3.2 Kommerzielle Diätfuttermittel

Bei den kommerziellen Diätfuttermitteln für Allergiker gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder basieren diese auf einer einzelnen Proteinquelle oder es werden hydrolysierte Proteine eingesetzt.

Bei den sogenannten Single-Protein-Diätfuttermitteln wird in der Regel eine Proteinquelle verwendet, die in Alleinfuttermitteln selten eingesetzt wird, sodass eine relativ hohe Chance besteht, dass der Hund vorher keinen Kontakt mit diesem Protein hatte. Häufig genutzte Proteinquellen in kommerziellen Single-Protein-Diätfuttermitteln sind Ente, Kaninchen, Pferd, Lamm, Wild oder verschiedene Fischarten (Paßlack and Zentek, 2013). Auch exotische Fleischsorten, wie Strauß oder Büffel, werden in solchen Diätfuttermitteln eingesetzt. Kombiniert werden sie mit einer Kohlenhydrat-, Fett-, Mineralstoff- und Vitaminquelle. In einer Studie von Leistra et al. (2001) konnte bei 95 % der getesteten Hunde durch eine von drei Single-Protein-Diäten, eine Verbesserung der Symptome erzielt werden. Insbesondere der Juckreiz ließ nach.

Bei der zweiten Variante der kommerziellen Diät werden die Proteine durch Proteolyse hydrolysiert, das heißt sie werden zerkleinert, so dass die Proteine in kleinen Fragmenten vorliegen. Hierfür werden vor allem Endopeptidasen und im geringeren Umfang auch Exopeptidasen eingesetzt. Durch die enzymatische Hydrolyse wird die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine verändert (Leopold-Temmler, 2001). Aufgrund der verschiedenen Grade der Hydrolyse, bedingt durch Nutzung und Kombination verschiedener Enzyme, können trotzdem noch Polypeptide mit einem größeren Molekulargewicht zurückbleiben. Um diese zu beseitigen, kann eine Ultrafiltration durchgeführt werden (Cave, 2006; Leopold-Temmler, 2001). Das Molekulargewicht wird durch die enzymatische Behandlung deutlich reduziert und die Proteine sind somit besser verdaulich (Cave, 2006; Leopold-Temmler, 2001). Durch die verbesserte Verdaulichkeit ist es dem Protein zeitlich nicht mehr möglich, sein allergisches Potenzial auszuschöpfen und das Immunsystem wird nicht aktiviert (Biourge et al., 2004). Sicher ist, dass kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 10 kDa schwach immunogen sind und kleine Peptide mit weniger als 2,5 kDa keine Immunogenität mehr besitzen (Cordle, 1994; Leopold-Temmler, 2001). Außerdem kann das Protein durch seine geringe Größe nicht mehr an zwei IgE Antikörper binden (Cordle, 1994; Paßlack and Zentek, 2013). Es sind mindestens 4 bis 8 Aminosäuren notwendig, um an den IgE Antikörper binden zu können (Leopold-Temmler, 2001). In der Humanmedizin wird davon ausgegangen, dass das Molekulargewicht auf weniger als 5 kDa reduziert werden muss, damit die Allergenität eines Proteins reduziert wird (Mahmoud, 1994). Als Proteinquelle wird in Diätfuttermitteln häufig Hühnerfleisch,

Hühnerleber oder Sojaprotein genutzt. Diäten mit hydrolysierten Proteinen sind insbesondere dann sinnvoll, wenn keine geeigneten Proteinquellen für eine Eliminationsdiät gefunden werden (Hall, 2002).

Ein Vorteil der kommerziellen Diätfuttermittel ist der immer gleiche Nährstoffgehalt, sodass es in der Regel nicht zu Imbalancen kommt (Paterson, 1995). Zusätzlich verursacht es dem Besitzer, im Gegensatz zur selbstgekochten Diät, keinen Mehraufwand in der Herstellung (Verlinden et al., 2006b).

Nachteilig ist, dass Futtermittel mit hydrolysierten Proteinen oft nicht gut schmecken und die Akzeptanz dadurch verringert ist. Der bittere Geschmack des Futters verstärkt sich, je höher der Hydrolysegrad ist (Leopold-Temmler, 2001). Außerdem werden dem kommerziellen Futter Zusatzstoffe beigemischt, welche im Verdacht stehen, allergisches Potenzial haben zu können (Paterson, 1995; Roudebush and Cowell, 1992). Ein weiterer Nachteil bei den Single-Protein-Diäten ist, dass diese, vermutlich produktionsbedingt, häufig doch noch Spuren anderer Fleischsorten enthalten als die deklarierten. Ricci et al. (2013) untersuchten 12 konventionelle Futtermittel (11 Single-Protein-Diätfuttermittel und ein hydrolysiertes Futtermittel) mittels Mikroskopie und PCR Analyse auf die Fett- und Proteinquellen. In 10 von 12 Futtermitteln wurden noch weitere Protein- bzw. Fettquellen, als auf der Packung deklariert wurden, gefunden. Dadurch ist es möglich, dass der Hund Proteinquellen aufnimmt, die er nicht verträgt.

2.3 Zusammenfassung der Literatur

Die Suche nach neuen, hochwertigen und erneuerbaren Proteinquellen ist aufgrund verschiedener Aspekte relevant. Im Nutztiersektor stellen ökologische Gründe und die Überfischung, bedingt durch die überwiegende Nutzung von Sojaprotein und Fischmehl, ein Problem dar. In der Kleintiermedizin wird durch das vermehrte Auftreten von Futtermittelunverträglichkeiten nach alternativen Proteinquellen gesucht.

Insekten können als neue Proteinquelle genutzt werden und sind durch ihren hohen Protein- und Fettgehalt interessant. *Hermetia illucens* wird von mehreren Autoren als vielversprechendes Insekt für die Futterproduktion betitelt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es nur im Nutztierbereich, bei Schweinen, Fischen und beim Geflügel, *in vivo* Untersuchungen in Bezug auf die Nutzung von *Hermetia illucens* als Futtermittel. Die Autoren dieser Untersuchungen beschreiben *Hermetia illucens* als nutzbare Proteinquelle in der Tierernährung. Bei Hunden wurden noch keine Untersuchungen dahingehend getätigt. Um mögliche Effekte durch die Fütterung dieser neuen Proteinquelle zu erkennen, wurden verdauungsphysiologische und immunologische Untersuchungen ausgeführt. Zusätzlich

wurde ein Kontrollfutter, mit der Proteinquelle Lamm, an die Hunde verfüttert um die Ergebnisse beider Futtermittel vergleichen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsziel

Ziel dieses Versuches war es, den Einfluss von *Hermetia illucens* Larvenmehl im Vergleich zu Lammemehl auf verdauungsphysiologische und immunologische Parameter bei Hunden zu untersuchen.

3.2 Versuchstiere

Der Versuch wurde mit 12 Hunden der Rasse Beagle aus dem Institut für Tierernährung durchgeführt. Es wurden zwei Versuchsgruppen mit jeweils sechs Hunden gebildet (Tab. 10). Die Hunde wurden in Paaren gehalten. Die Einzelhaltung fand in den fünf Tagen der Kotsammelphase statt. Die Hunde erhielten ein- bis zweimal täglich für jeweils zwei bis drei Stunden Auslauf.

Tab. 10: Gruppeneinteilung, Name, Geburtsdatum und Geschlecht der Hunde

Gruppe 1			Gruppe 2		
Name	Geburtsdatum	Geschlecht ¹	Name	Geburtsdatum	Geschlecht ¹
Oskar	17.10.2012	mk	Cookie	17.10.2012	mk
Phoebe	24.10.2011	w	Cleo	17.10.2012	w
Didi	01.07.2014	m	Mojo	01.07.2014	m
Pongo	01.07.2014	m	Pepe	01.07.2014	m
Fee	01.07.2014	w	Mia	01.07.2014	w
Cassy	01.07.2014	w	Bonnie	01.07.2014	w

¹ mk: männlich kastriert; w: weiblich; m: männlich

3.3 Versuchsfutter

Beide Alleinfuttermittel wurden als Trockenalleinfutter hergestellt. Die Zusammensetzung, Zusatzstoffe und analytischen Bestandteile befinden sich in den nachfolgenden Tabellen. Die Futtermengen pro Tier pro Tag wurden individuell an den Energiebedarf der Hunde angepasst.

Tab. 11: Zusammensetzung des Versuchs- und Kontrollfutters

Versuchsfutter: <i>Hermetia</i> und Reis	Kontrollfutter: Lamm und Reis
Reismehl, <i>Hermetia</i> Larven Mehl, Gerste, Kartoffelprotein, Mono-Calciumphosphat, Geflügelfett, Rinderfett, Sonnenblumenöl, Meersalz, Futterkalk, Rapsöl und Hefe (extrahiert)	Reismehl, Lammmehl, Gerste, Reisprotein, Rübentrockenschnitzel, Geflügelfett, Rinderfett, Sonnenblumenöl, Leinsamen, Rapsöl, Meersalz und Hefe (extrahiert)

Tab. 12: Zusatzstoffe des Versuchs- und Kontrollfutters pro kg im Futter

Vitamine	Spurenelemente	Aminosäuren	Sonstiges
Vitamin A 15.000 IE, Vitamin D3 1.500 IE, Vitamin E 100 mg (all rac-alpha- Tocopherylacetat)	Eisen (Eisen(II)sulfat, Monohydrat) 110 mg, Zink (Zinkoxid, Aminosäure- Zinkchelate, Hydrat) 140 mg, Kupfer (Kupfer(II)sulfat- Pentahydrat) 11 mg, Mangan (Mangan(II)oxid) 25 mg, Jod (Calciumjodat) 2 mg, Selen (Natriumselenit) 0,15 mg	Methionin 1.000 mg	Antioxidationsmittel, stark tocopherolhaltige Extrakte natürlichen Ursprungs, Marker: Titandioxid 2,1 g

3.4 Versuchsplan

In dem Versuch wurden die beiden Diäten an insgesamt 12 Hunde verfüttert. Jede Gruppe erhielt die beiden Futtermittel über einen Zeitraum von 5 Wochen. Dieser Zeitraum umfasste eine Anpassungsphase sowie eine Sammelphase von Kot. Nach den ersten 5 Wochen erfolgte ein Cross-Over und die beiden Gruppen erhielten das jeweils andere Futter (Abb. 1).

3.4.1 Zeitliche Abfolge durchgeführter Untersuchungen

Die Untersuchungen wurden nach den beiden Fütterungsphasen gemacht, um mögliche Veränderungen, bedingt durch das Versuchsfutter, festzustellen. Immunologische Parameter wurden durch die Analyse der Blutproben ermittelt. Die Kotproben wurden auf mikrobielle Metabolite und die Chitinaseaktivität hin untersucht. In der fünftägigen Kotsammelphase wurde der gesamte Kot pro Tier und Tag (24 Stunden) gesammelt. Dadurch konnten die scheinbare Gesamtverdaulichkeit der Nährstoffe, die Gesamtkotmenge pro Tag, die Kotkonsistenz und die Chitinverwertung bestimmt werden (Abb. 1). Zudem wurde jede

Woche eine allgemeine Untersuchung durchgeführt, um den Gesundheitszustand der Hunde zu überprüfen.

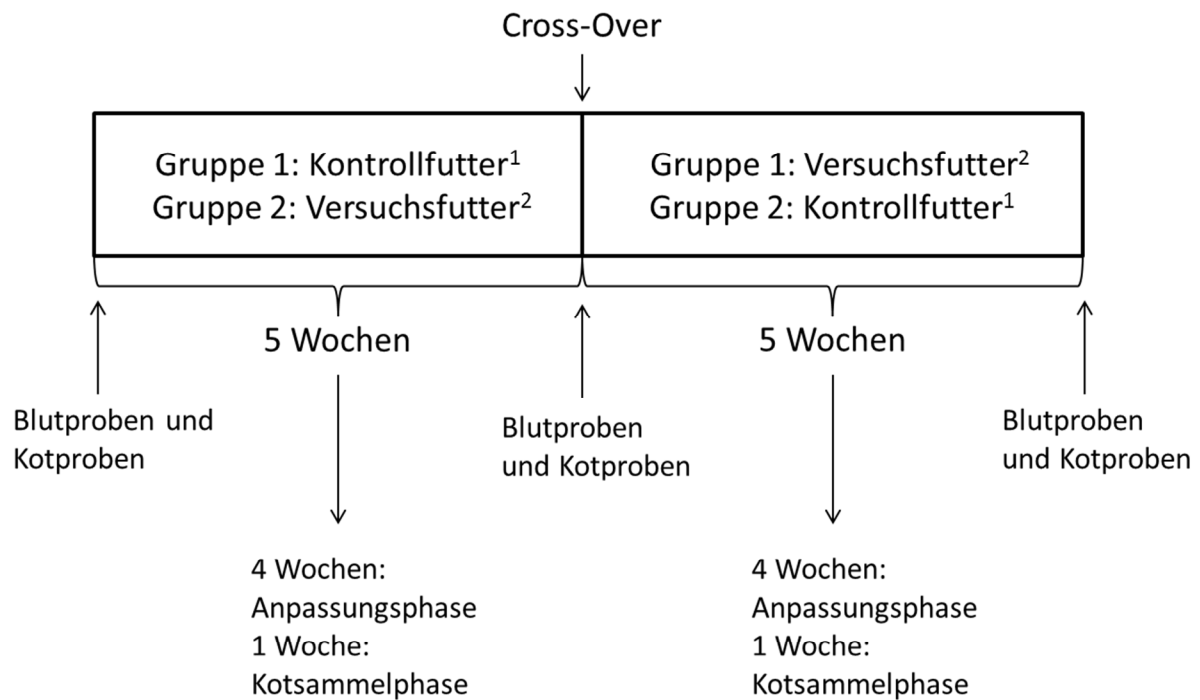


Abb. 1: Versuchsplan mit Probennahme

¹ tierische Proteinquelle: Lamm; ² tierische Proteinquelle: *Hermetia illucens* Larven

3.5 Untersuchungen

3.5.1 Allgemeinuntersuchung

Die klinische Untersuchung wurde wöchentlich durchgeführt. Folgende Parameter wurden untersucht: Körperhaltung, Verhalten, Pflegezustand, Ernährungszustand, Kotkonsistenz und Allgemeinbefinden/innere Körpertemperatur.

3.5.2 Körpermasse

Die Körpermasse der Hunde wurde wöchentlich bestimmt.

3.5.3 Kotkonsistenz und Trockensubstanz des Kotes

Für die Bestimmung der Kotkonsistenz wurde ein Scoring System (Tab. 13) erstellt. Die Bestimmung der Trockensubstanz wird unter Punkt 3.9 erläutert.

Tab. 13: Scoring System zur Beurteilung der Kotkonsistenz (Middelbos et al., 2007)

Bewertungsparameter	Kriterien	Scoring
Konsistenz der Fäzes	Geformte, trockene, harte Fäzes	1
	Geformte und trockene Fäzes, aber nicht hart	2
	Geformte aber sehr weiche Fäzes	3
	Breiartige Fäzes	4
	Flüssige Fäzes, Diarrhoe	5

3.5.4 Gesamtkotmenge

Die Gesamtkotmenge pro Tier und Tag wurde während der Sammlung des Kotes in der Phase der Einzelhaltung erfasst.

3.6 Blutabnahme

An zwei Zeitpunkten des Versuches (Abb. 1) wurde durch die Punktion der *V. cephalica antebrachii* oder *V. saphena lateralis* Blutproben gewonnen. Die Blutabnahme erfolgte mit einer sterilen Einmalkanüle. Das Blut wurde in Monovetten aufgefangen. Benötigt wurden 10 ml Blut in einem Li-Heparin Röhrchen und 2 ml Blut in einem EDTA K Röhrchen. Das EDTA K Röhrchen samt Blut wurde in ein externes Labor (Laboklin, Bad Kissingen) gesandt. Das Li-Heparin Blut wurde für die durchflusszytometrischen Untersuchungen verwendet. Die verwendeten Materialien sind in Tab. 14 aufgeführt.

Tab. 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Blutabnahme

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer/Typ
Einmalkanüle	Terumo Deutschland GmbH	Leuven, BEL	261905
S-Monovette, 2.7ml K3E	Sarstedt AG & Co.	Nürnberg, DE	05.1167
S-Monovette, 2.7ml LH	Sarstedt AG & Co.	Nürnberg, DE	05.1553
S-Monovette, 7.5ml LH	Sarstedt AG & Co.	Nürnberg, DE	01.1604
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	Heraeus Megafuge 1.OR
Eppendorfgefäß, 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030120.094

3.7 Proteinextraktion und Proteinbestimmung im *Hermetia illucens* Larvenmehl nach Bradford

Der Proteinextrakt und deren Proteingehalt des *Hermetia illucens* Larvenmehls wurden für die Durchführung des futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstests genutzt.

3.7.1 Durchführung der Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Philipp (2013). Es wurden 5 g Larvenpulver mit 20 ml Sörensen-Natriumphosphat-Puffer verdünnt, sodass eine 1:5 Verdünnung entstand. Das Gemisch wurde durch ein Dispergiergerät für 4 x 30 sek. homogenisiert und zwischendurch auf Eis gelagert. Anschließend folgte die Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 20000 x g. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen gegeben und wieder bei 20000 x g und 4 °C über 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 20 min zentrifugiert, mit denselben Einstellungen wie in den vorherigen Schritten. Feste Bestandteile des Überstands wurden durch Filtration mit einem Papierfaltenfilter entfernt. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 min. Feinere Bestandteile des Überstandes wurden durch eine feinporige Filtration (0,45 µm) entfernt. Darauf folgte eine sterile Filtration (0,2 µm). Der hergestellte Extrakt wurde zu jeweils 1 ml Aliquote in Eppendorfgefäße bei -25 °C eingefroren. Alle verwendeten Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 19 aufgeführt.

3.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

3.7.2.1 Prinzip

Um Proteine photometrisch sichtbar zu machen, wurden diese mit dem Bradford Reagenz angefärbt. Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 bildet in saurer Lösung sowohl mit den kationischen als auch den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Durch die Komplexbildung hat das Absorptionsspektrum ein Absorptionsmaximum bei 595 nm. Die Intensität des Farbstoffes steht damit im linearen Zusammenhang mit der vorhandenen Proteinkonzentration.

3.7.2.2 Durchführung

Zunächst wurde eine Rinderserumalbumin-Kalibrierreihe (BSA-Kalibrierreihe) erstellt (10-150 µg/ml). Dazu wurde im ersten Schritt eine Stammlösung mit einer Konzentration von

10 mg/ml hergestellt. Aus der Stammlösung wurde anschließend eine 1:10 Verdünnung hergestellt, sodass eine Konzentration von 1 mg/ml erreicht wurde. Aus dieser Verdünnung wurde wiederum eine 1:10 Verdünnung hergestellt, sodass diese Lösung eine Konzentration von 100 µg/ml erreichte. Die Kalibrierungen wurden dann anhand der Mischtablette erstellt (Tab. 15). Die Herstellung und das Zusammenfügen der Lösungen für den Sörensen-Natriumphosphat-Puffer sind in Tab. 16 und 17 beschrieben.

Tab. 15: Mischtablette Rinderserumalbumin-Kalibrierreihe

Kalibrierlösung BSA ¹ (µg/ml)	Volumen Sörensen- Natriumphosphat- Puffer (µl)	Volumen 100 µg/ml (µl)	Volumen 1 mg/ml (µl)
10	900	100	
20	800	200	
40	600	400	
60	400	600	
80	200	800	
100		1000	
120	880		120
150	850		150

¹BSA: Bovines Serum Albumin

Vor der Messung der Proteingehalte wurden die Proben 1:20 und 1:25 verdünnt und im Doppelansatz gemessen. Es wurden 100 µl der jeweiligen vorverdünnten Probe in Halbmikroküvetten vorgelegt und 1 ml Bradford-Reagenz (Tab. 18) hinzugegeben. Nach einer drei- bis zehnminütigen Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch gemessen.

Mit Hilfe der Swift II Quantification Software konnte eine Kalibrierkurve und Regressionsgleichung ($y = 331,55x - 5,8289$) erstellt werden. Der Regressionskoeffizient (Bestimmtheitsmaß) betrug $R^2 = 0,9926$. Die Berechnung der Proteinkonzentration in µg/ml erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Proteinkonzentration in } \mu\text{g/ml} = [(331,55 * x) + 5,8289] * \text{Verdünnungsfaktor}$$

x = gemessene Extinktion bei 595 nm

Material und Methoden

Tab. 16: 1. Schritt: Herstellung der Lösungen für den 20 mM Sörensen-Natriumphosphat-Puffer

Substanz	erzielte Stoffmengenkonzentration (mol/l)	Zugabe (g)
Dinatriumhydrogenphosphat- Dodecahydrat (358,14 g/mol)	0,02	7,1628 in 1 l Reinstwasser lösen
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat (137,99 g/mol)	0,2	27,598 in 1 l Reinstwasser lösen

Tab. 17: 2. Schritt: Zusammenfügen der Lösungen für die Zusammensetzung des 20 mM Sörensen-Natriumphosphat-Puffers (pH 7,4)

Substanz	Zugabe (ml)
0,2 mol/l Natriumdihydrogenphosphatlösung	10
0,02 mol/l Dinatriumhydrogenphosphatlösung	380

Tab. 18: Zusammensetzung des Bradford Reagenz

Substanz	Zugabe
Coomassie Brilliant Blau G-250	20 mg
Ethanol 96%	25 ml
o-Phosphorsäure	50 ml
Reinstwasser	425 ml

Tab. 19: Verwendete Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Proteinextraktion und Proteinbestimmung nach Bradford

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer/Typ
Dinatriumhydrogenphosphat- Dodecahydrat (M=358,14 g/mol)	Merck KGaA	Darmstadt, DE	106579
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat (M=137,99 g/mol)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	K300.1
Halbmikroküvetten	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, DE	759115
BSA	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	8076
Coomassie Brilliant Blau G-250	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	9598.1
Ethanol, 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	9065
o-Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	9079

Trichter	Vitlab GmbH	Großostheim, DE	709
Faltenfilter, Ø 240 mm	Whatman	Kent, UK	10311651
Spritzenaufsatzfilter, 0,45 µm	VWR International GmbH	Radnor, USA	5140062
Vakuumfilter, 0,22 µm	TPP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, CH	99155
Greinerröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE	210261
Eppendorfgefäß, 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030123.328
Eppendorfgefäß, 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030120.094
Dispergiergerät	IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, DE	T10-basic Ultra-Turrax
Zentrifuge	Beckman Coulter	Krefeld, DE	Avanti J-26 XP
Oak Ridge Röhrchen	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	3138-0050
Photometer	Amersham Biosciences Corp.	Piscataway, USA	Ultrospec 3300 pro
Photometer Software	Amersham Biosciences Corp.	Piscataway, USA	Swift II Quantification

3.8 Durchflusszytometrie der mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Mittels Durchflusszytometrie ist es möglich, den Gesamtgehalt und den Gehalt der verschiedenen Phänotypen der mononukleären Zellen zu ermitteln. Auch der Gehalt an Lymphozyten nach Stimulation mit Mitogenen bzw. dem Proteinextrakt wird durchflusszytometrisch bestimmt.

3.8.1 Prinzip

Mittels Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Form, Größe oder Färbung analysiert werden. Passiert eine Zelle einen Laserstrahl sendet sie optische Signale in Form von Streulicht aus. Diese Signale werden von einem Detektor ausgewertet. Das Streulicht wird in ein Vorwärtstreulicht (Forward Scatter bzw. FSC) und Seitwärtstreulicht (Side Scatter bzw. SSC) unterteilt. Die Intensität des Vorwärtstreulichtes gibt das Volumen der Zelle an. Wohingegen die Intensität des Seitwärtstreulichtes die Granularität der Zelle angibt (Abb. 2). Zudem ist das Durchflusszytometer in der Lage, fluoreszierendes Licht und unterschiedliche Farben zu messen.

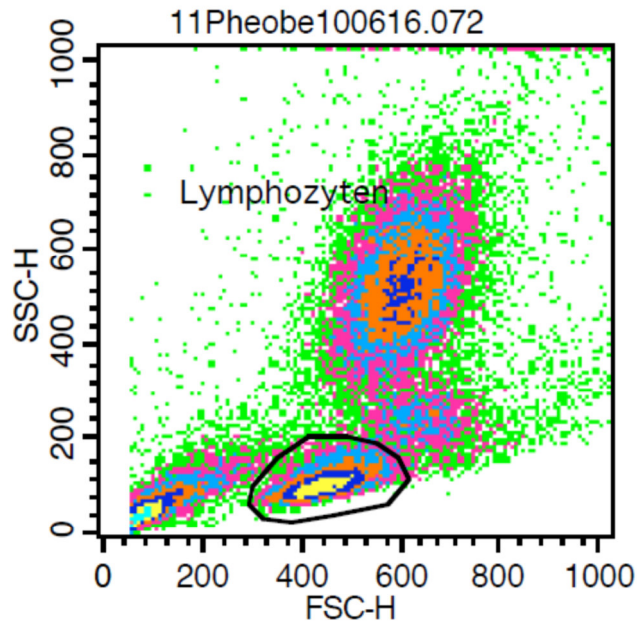


Abb. 2: Streulicht-Density-Plot Darstellung mit gekennzeichnete Lymphozytenpopulation

3.8.2 Isolierung der mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation

3.8.2.1 Prinzip und Durchführung

Das Verfahren beruht darauf, dass Ficoll (ein synthetisches Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin) eine höhere Dichte aufweist als die Monozyten und Lymphozyten, aber eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten. Daher sammeln sich die Lymphozyten und Monozyten (mononukleäre Zellen) entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen dem Überstand (Plasma/Thrombozyten) und dem Ficoll an. Das Zellsediment bilden die Erythrozyten und Granulozyten (Abb. 3).

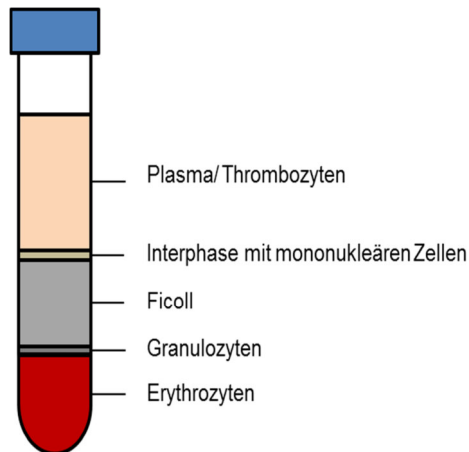


Abb. 3: Darstellung der verschiedenen Zellschichten nach der Dichtegradientenzentrifugation

Das Lithium-Heparinblut wurde 1:2 mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) verdünnt und vermischt. Von dem Blut-PBS-Gemisch wurden 9 ml auf 3 ml Ficoll geschichtet und die Röhren wurden 30 min bei Raumtemperatur und $500 \times g$ zentrifugiert. Die Interphase, in der sich die mononukleären Zellen befinden, wurde abpipettiert und in 10 ml gekühltes PBS transferiert. Dem folgten zwei Waschschrte mit PBS und eine Lyse der Erythrozyten. Das durch den zweiten Waschschrte gewonnene Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und mit 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer-Lösung (Tab. 21) vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gemisch bei $300 \times g$ und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das dadurch gewonnene Pellet wurde in 5 ml Zellkulturmedium (Tab. 23) resuspendiert. Für die Zählung der mononukleären Zellen wurden $100 \mu\text{l}$ abgenommen und durchflusszytometrisch gemessen.

Alle verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Isolierung der mononukleären Zellen sind in Tab. 20 aufgeführt.

3.8.3 Phänotypisierung der mononukleären Zellen

3.8.3.1 Prinzip

Die verschiedenen Oberflächenantigene werden durch primäre und sekundäre Antikörper sichtbar gemacht. Durch die Zugabe eines primären Antikörpers kommt es zu einer Verbindung zwischen Oberflächenantigenen und primärem Antikörper. Um diese Verbindung sichtbar zu machen, wird ein sekundärer Antikörper in Kombination mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) eingesetzt.

3.8.3.2 Durchführung

Die Zellsuspension, welche bei der Isolierung der mononukleären Zellen entstand, wurde ebenfalls für die Phänotypisierung genutzt. Die mononukleären Zellen wurden auf eine Dichte von 1×10^7 /ml im Zellkulturmedium eingestellt. Von dieser Lösung wurden pro Färbung (demnach pro Phänotyp) 100 μ l (1×10^6 Zellen) auf den Boden eines FACS Röhrchens pipettiert. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich um spezifische anti-CD4-, anti-CD8 β -, anti-CD21-, anti-CD3-, anti-CD5-Antikörper und einen anti-MHC II-Antikörper (Tab. 24). Bevor die primären Antikörper auf die Zellen gegeben werden, wurden sie vorverdünnt. Um die Autofluoreszenz zu bestimmen, diente pro Tier ein ungefärbter Ansatz als Negativkontrolle. Von den vorverdünnten primären Antikörpern wurden 50 μ l auf die Zellen pipettiert und 25 min auf Eis inkubiert. Nicht gebundene primäre Antikörper wurden durch die Zugabe von 2 ml FACS Puffer (Tab. 22) und darauffolgende Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 400 x g ausgewaschen. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet durch 50 μ l vorverdünnte sekundäre Antikörper (Tab. 25) resuspendiert. Darauf folgte eine Inkubationszeit von 20 min auf Eis unter Lichtschutz. Die jetzt nicht gebundenen sekundären Antikörper wurden durch einen erneuten Wasch- und Zentrifugationsschritt unter denselben Bedingungen ausgewaschen. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet mit 200 μ l FACS Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch gemessen.

Alle verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Phänotypisierung der mononukleären Zellen sind in Tab. 21 aufgeführt.

Tab. 20: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer/Typ
Dulbeccos Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG	Berlin, DE	L1820
Albuminfraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	8076.2
Erythrozyten Lyse Puffer	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, DE	120-001-339
VLE RPMI	Biochrom AG	Berlin, DE	FG1415
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG	Berlin, DE	A2213
Fetales Kälberserum	Biochrom AG	Berlin, DE	S0615
FACS Röhrchen	VWR International GmbH	Radnor, USA	212-1837
Greinerröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE	188271
Greinerröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE	210261

Eppendorfgefäß, 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030123.328
Eppendorfgefäß, 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030120.094
Biocoll (Ficoll)	Biochrom AG	Berlin, DE	L6115
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	Heraeus Megafuge 1.OR
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	Heraeus Megafuge 16 R
Durchflusszytometer mit Computereinheit	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, DE	MACSQuant Analyzer
Software	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, DE	MACSQuantify 2.6
Durchflusszytometer mit Computereinheit	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	BD FACSCalibur
Software	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	CellQuest Pro 5.2
Laminar Air Flow	Esco GB Ltd	Wiltshire, UK	Airstream Max Class II BSC

Tab. 21: Zusammensetzung der Erythrozyten-Lyse-Puffer-Lösung

Substanz	Zugabe (ml)
Erythrozyten Lyse Puffer	12
Reinstwasser	108

Tab. 22: Zusammensetzung des FACS Puffers

Substanz	Zugabe
Albuminfraktion V	5 g
PBS	1000 ml

Tab. 23: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Substanz	Zugabe (ml)
VLE RPMI 1640	500 ml
Fetales Kälberserum	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml

Material und Methoden

Tab. 24: Primäre Antikörper für den ersten Inkubationsschritt bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der mononukleären Zellen

Primärer Antikörper	Hersteller, Artikelnummer	Stadt, Land	Klon	Isotyp	Verdünnung	Sekundärer Antikörper
Mouse anti-dog CD3	Bio-Rad Laboratories GmbH, MCA1774GA	Hercules, USA	CA17.2A12	IgG ₁	1:50	Goat anti-mouse IgG ₁ : R-PE
Mouse anti-dog CD4	AbD Serotec, MCA1998S	Düsseldorf, DE	CA13.1E4	IgG ₁	1:5	Goat anti-mouse IgG ₁ : R-PE
Mouse anti-dog CD8 β	AbD Serotec, MCA1775S	Düsseldorf, DE	CA15.4G2	IgG ₁	1:20	Goat anti-mouse IgG ₁ : R-PE
Mouse anti-dog CD21	AbD Serotec, MCA1781S	Düsseldorf, DE	CA2.1D6	IgG ₁	1:100	Goat anti-mouse IgG ₁ : R-PE
Mouse anti-horse MHC Class II	AbD Serotec, MCA1085	Düsseldorf, DE	CVS20	IgG ₁	1:100	Goat anti-mouse IgG ₁ : R-PE
Rat anti-dog CD5	AbD Serotec, MCA1037G	Düsseldorf, DE	YKIX322.3	IgG _{2a}	1:50	Mouse anti-rat IgG _{2a} heavy chain: FITC

Tab. 25: Sekundäre Antikörper für den zweiten Inkubationsschritt bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der mononukleären Zellen

Sekundärer Antikörper	Hersteller, Artikelnummer	Stadt, Land	Klon	Verdünnung
Goat anti-mouse IgG ₁ : R-FITC	Southern Biotech, 1070-02	Birmingham, USA	keine Angabe	1:100
Goat anti-mouse IgG ₁ : R-PE	Southern Biotech, 1070-09	Birmingham, USA	keine Angabe	1:200
Mouse anti-rat IgG _{2a} heavy chain: FITC	AbD Serotec, MCA278F	Düsseldorf, DE	MARG2a-1	1:100

3.8.4 Mitogen- und futtermittelantigeninduzierter Lymphozytenproliferationstest

Durch den futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstest wird der Anteil der Lymphozyten bestimmt, die sich durch den Proteinextrakt proliferieren. Eine Proliferation der Lymphozyten gibt Hinweis auf eine immunologische Reaktion, bedingt durch das Antigen. Der mitogeninduzierte Lymphozytenproliferationstest wird als Positivkontrolle genutzt.

3.8.4.1 Prinzip

Durch Bromodesoxyuridin (BrdU) und einen fluoreszierenden Antikörper ist es möglich, proliferierte Lymphozyten zu kennzeichnen. Bromdesoxyuridin ist ein chemisches Analogon zum Nucleosid Thymidin, welches von den proliferierten Zelle aufgenommen und in phosphorylierter Form, anstelle des Nucleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP), während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA als Markierung eingebaut wird. Durch einen Maus-Anti-BrdU-Antikörper, der mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert wurde, ist es möglich, proliferierte Lymphozyten darzustellen.

3.8.4.2 Durchführung des mitogeninduzierten Lymphozytenproliferationstest

Für den Proliferationstest wurden die Mitogene Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA) ausgewählt. Es wurde dieselbe Zellsuspension verwendet, welche bereits für die Phänotypisierung der Lymphozyten genutzt wurde. Diese wurde auf eine Dichte von 4×10^6 /ml Zellen eingestellt. Von der Zellsuspension wurden 100 μ l zusammen mit 100 μ l der vorverdünnten Mitogene (Tab. 26) in eine Vertiefung der 96-Well-Zellkulturplatten gegeben. Die Negativkontrolle bestand aus 100 μ l Zellsuspension und 100 μ l Zellkulturmedium.

Die Mikrotiterplatte wurde für 48 h in einen CO₂ Inkubator gestellt. Im Anschluss wurden 20 μ l BrdU (Konzentration: 60 μ M) in jede Vertiefung pipettiert. Die Mikrotiterplatte kam weitere 24 h in den CO₂ Inkubator. Nach der Inkubationszeit wurden alle Vertiefungen auf und ab pipettiert und jeweils zusammengehörige Vertiefungen in ein FACS Röhrchen pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 4 °C und 500 x g. Der Überstand wurde abgenommen und eingefroren. Das Pellet wurde in 1 ml FACS Puffer resuspendiert. In jedes Röhrchen wurden 250 μ l Inside Fix gegeben, bei geringer Frequenz vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 500 x g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Daraufhin wurde 1 ml des

Permeabilisierungspuffer tropfenweise zum Pellet dazugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 2 ml FACS Puffer dazugegeben und 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurde zweimal mit 3 ml FACS Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und 250 µl DNase (1:10 mit DNase I Puffer [Tab. 27]; Konzentration: 1 mg/ml) dazugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C im Brutschrank. Nach der Inkubation wurden 2 ml Zellkulturmedium hinzugefügt. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 4 °C und 500 x g. Der Überstand wurde verworfen. Es wurden 50 µl des vorverdünnten BrdU Antikörpers (1:5 mit FACS Puffer verdünnt) dazu gegeben. Es folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis unter Lichtschutz. Um die nicht gebundenen Antikörper auszuwaschen, wurde 2 ml FACS Puffer hinzugefügt und 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 µl FACS Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch gemessen.

Um die Daten auszuwerten, wurde der Stimulationsindex (SI) ermittelt. Dieser gibt den Faktor an, um wieviel die Proliferation durch die Stimulation mit den Mitogenen PWM, Con A und PHA zugenommen hat.

$$\text{Stimulationsindex (SI)} = \frac{\text{Mitogenstimulierte Zellen}}{\text{Unstimulierte Zellen}}$$

3.8.4.3 Durchführung des futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstest

Für den futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstest wurde ebenfalls die Zellsuspension für die Phänotypisierung der Lymphozyten mit einer Zelldichte von 4×10^6 /ml genutzt. Es wurden 100 µl Zellsuspension und 100 µl vorverdünnte Proteinextrakte zusammen in eine Vertiefung der 96-U-Well-Zellkulturplatten gegeben. Die Proteinextrakte wurden so verdünnt, dass Konzentrationen von 30 µg/ml, 75 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml und 500 µg/ml erreicht wurden.

Der weitere Ablauf glich dem mitogeninduzierten Lymphozytenstimulationstest mit dem einzigen Unterschied, dass hier die Zellen bis zum BrdU-Zusatz 96 Stunden (statt 48 Stunden) im CO₂ Inkubator inkubiert wurden.

Alle verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für den mitogeninduzierten und futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstest sind in Tab. 28 aufgeführt.

Tab. 26: Verwendete Mitogene für den Lymphozytenproliferationstest

Mitogen ¹	Hersteller, Artikelnummer	Stadt, Land	Endkonzentration
PWM	Sigma Aldrich, L8777	St. Louis, USA	2,5 µg/ml
Con A	Sigma Aldrich, C5275	St. Louis, USA	5 µg/ml
PHA	Sigma Aldrich, L8902	St. Louis, USA	10 µg/ml

¹PWM: Pokeweed Mitogen; Con A: Concanavalin A; PHA: Phytohämagglutinin

Tab. 27: Zusammensetzung des DNase I Puffers

Substanz	Zugabe
Natriumchlorid (58,44 g/mol)	4,383 g
Magnesiumchlorid (203,3 g/mol)	0,427 g
Salzsäure	5 µl (aus 1 M Lösung)
	in 500 ml Reinstwasser lösen

Tab. 28: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Lymphozytenproliferationstests

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer/Typ
VLE RPMI	Biochrom AG	Berlin, DE	FG1415
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG	Berlin, DE	A2213
Fetales Kälberserum	Biochrom AG	Berlin, DE	S0615
5-Bromo-2Deoxyuridine (BrdU)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	B5002
Mouse anti BrdU FITC	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA	556028
Dulbeccos Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG	Berlin, DE	L1820
96-U-Well-Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE	650180
Greinerröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE	188271
Greinerröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE	210261
Eppendorfgefäß, 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030123.328
Eppendorfgefäß, 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030120.094
FACS Röhrchen	VWR International GmbH	Radnor, USA	212-1837
Biocoll (Ficoll)	Biochrom AG	Berlin, DE	L6115
DNase I	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	DN25
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	9265.1
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, DE	2189.2

	KG		
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	K025.1
Brutschrank	Renggli AG Salvis Lab	Rotkreuz, CHE	Biocenter 170
Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH	Hanau, DE	Megafuge 1.OR
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	Heraeus Megafuge 16 R
Software	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, DE	MACSQuantify 2.6
Laminar Air Flow	Esco GB Ltd	Wiltshire, UK	Airstream Max Class II BSC
Durchflusszytometer mit Computereinheit	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, DE	MACSQuant Analyzer
Durchflusszytometer mit Computereinheit	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	BD FACSCalibur
Software	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	CellQuest Pro 5.2
Permeabilisierungspuffer A	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, DE	120-016-632
Inside Fix	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, DE	120-000-838

3.9 Bestimmung der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit

3.9.1 Prinzip

Die scheinbare Gesamtverdaulichkeit (sV) der Rohnährstoffe, Mengenelemente und Spurenelemente wurde mittels Verdaulichkeitsmarker Titandioxid (TiO₂) im Futter bestimmt. Das Titandioxid wurde in einer Konzentration von 0,2 % in das Futter eingemischt. Durch die Bestimmung der Rohnährstoffe und des Titandioxids im Futter und im Kot der Hunde konnte anhand der nachfolgenden Formel die scheinbare Verdaulichkeit der Rohnährstoffe ermittelt werden.

$$sV (\%) = 100 - \left(\frac{\text{Indikator im Futter}}{\text{Indikator im Kot}} \right) * \left(\frac{\text{Indikator im Kot}}{\text{Indikator im Futter}} \right) * 100$$

3.9.2 Durchführung

Nach einer Anpassungsphase der Fütterung von 4 Wochen wurden in der fünften Woche an 5 aufeinanderfolgenden Tagen die Hunde einzeln gehalten und der gesamte Kot an jedem der 5 Tage gesammelt. Die Proben wurden gepoolt, indem 30 g Kot pro Tag von jedem Hund miteinander vermischt wurden. Sowohl die Kotproben als auch Proben von den beiden Alleinfuttermitteln wurden bei -20 °C tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Proben wurden gemahlen (0,5 mm) und zur Bestimmung der Roh Nährstoffgehalte (Rohprotein, Rohfett, Rohfaser, Rohasche), der Mengenelemente (Kalzium, Phosphor, Natrium, Magnesium und Kalium), der Spurenelemente (Eisen, Mangan, Zink und Kupfer) und des Indikators Titandioxid einer Analyse nach den Vorschriften der VDLUFA (Methodenbuch III, 8. Ergänzungslieferung 2012) unterzogen. Anschließend erfolgte die Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit. Alle verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für den Verdaulichkeitsversuch sind in Tab. 29 aufgeführt.

3.9.2.1 Roh Nährstoffbestimmung

3.9.2.1.1 Trockensubstanz

Für die Bestimmung der Trockensubstanz (TS) wurden ca. 1-2 g Futter bzw. Kotprobe (E) in Porzellantiegel (T1) eingewogen und 4 Stunden bei 103 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach der Abkühlung im Exsikkator wurden die Porzellantiegel erneut gewogen (T2). Der Trockensubstanzgehalt wurde anhand der Differenz ermittelt.

$$\text{Berechnung (TS in g/kg)} = \left[\frac{(T2-T1)}{E} \right] * 1000$$

3.9.2.1.2 Rohprotein

Die Bestimmung des Rohproteins erfolgte durch Ermittlung des Stickstoffgehaltes nach der Dumas-Methode mit Hilfe eines Makro-Elementaranalysators.

3.9.2.1.3 Rohasche

Für die Bestimmung der Rohasche (Ra) wurden ca. 1 g Futter bzw. 0,5 g Kotprobe (E) in einen Tiegel (T1) eingewogen. Die Proben wurden bei 600 °C für mindestens 6 Stunden im Muffelofen verascht. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurden die Proben erneut gewogen (T2) und der Rohaschegehalt anhand der Differenz ermittelt.

$$\text{Berechnung (Ra in g/kg)} = \left[\frac{(T2-T1)}{E} \right] * 1000$$

3.9.2.1.4 Rohfett

Für die Bestimmung von Rohfett (Rfe) wurden ca. 1 g Futter bzw. Kotprobe (E) in Filterbeutel eingewogen und verschlossen. Von den Gläschen wurde die Tara bestimmt (T1). Daraufhin erfolgte die Fettextraktion mittels Petrolether nach dem Soxhlet-Verfahren. Danach wurden die Gläschen samt Inhalt bei 103 °C im Trockenschrank getrocknet und wieder gewogen (T2). Aufgrund der Differenz wurde der Rfe-Gehalt ermittelt.

$$\text{Berechnung (Rfe in g/kg)} = \left[\frac{(T2-T1)}{E} \right] * 1000$$

3.9.2.1.5 Rohfaser

Um den Gehalt an Rohfaser (Rfa) zu ermitteln, wurden 0,5 g Futter bzw. Kotprobe (w2) in ein Filterbeutel (w1) eingewogen und erst in 1,25 %iger Schwefelsäure und nachfolgend in 1,25 %iger Natronlauge gekocht. Nach der anschließenden Trocknung und Rückwaage (w3) wurden die Proben für sechs Stunden im Trockenschrank bei 600 °C verascht, abgekühlt und daraufhin gewogen (w4).

$$\text{Berechnung (Rfa in g/kg)} = \frac{[w3-w4)-(w1*c1)]}{w2} * 1000 \quad c1 = \text{Blindwertkorrektur}$$

3.9.2.2 Bestimmung der Mengen- und Spurenelemente

Für die Bestimmung der Mengen- und Spurenelemente wurden die Rückstände der Ra-Analyse verwendet.

3.9.2.2.1 Vorbereitung der Proben

Im Anschluss an die Veraschung wurden die Proben mit 20 ml Reinstwasser und 6 ml Salzsäure versetzt und im vorgeheizten Sandbad bei 210-220 °C für 50 min erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben über einen Faltenfilter mit Reinstwasser in einen Messkolben überführt.

3.9.2.2.2 Messung der Mengen- und Spurenelemente

Der Gehalt an Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink, Mangan und Eisen wurde mittels Atomabsorptionsspektrophotometer bestimmt.

3.9.2.2.3 Messung von Phosphor

Der Phosphorgehalt wurde photometrisch mittels Nitrovanadatmolybdat-Lösung (Tab. 30, 31 und 32) bestimmt. Für die Bestimmung wurde die Aschelösung mit einer Lösung aus Salpetersäure und den Phosphor-Komplexbildnern Ammoniumvanadat und Ammoniummolybdat versetzt. Aufgrund des sauren Milieus entsteht ein gelber Farbkomplex, dessen Intensität proportional zur Konzentration ist. Der Phosphorgehalt wurde anhand der Standardreihe (Tab. 33 und 34) bei einer Wellenlänge von 436 nm photometrisch gemessen.

3.9.2.3 Titandioxidbestimmung

Von den beiden Futtermitteln wurden 200 mg und von den Kotproben 100 mg in ein Glasaufschlussgefäß gewogen. Die Proben wurden mit konzentrierter Schwefelsäure, zwei Siedesteinchen und Kjeldahlkatalysator versetzt und für 95 min bei 400 °C aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Proben quantitativ mit Reinstwasser in einen Messkolben überführt. Daraufhin wurden 2 ml der Lösung mit 200 µl 30 %igem Wasserstoffperoxid versetzt und die Extinktion mit Hilfe der Standardreihe (50, 100, 200 und 500 µg Titandioxid/2,2 ml) bei 410 nm photometrisch gemessen.

Tab. 29: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung der scheinbaren Gesamtverdaulichkeit

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer/Typ
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA	Darmstadt, DE	1.04873
Titandioxid	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	14021
Siedesteinchen	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	1692.1 Heraeus
Trockenschrank	Heraeus Holding GmbH	Hanau, DE	Trockenschrank T5042
Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	Lackrockenschrank LUT 6050 F DURAN, DN 300,
Exsikkator	Duran Produktions GmbH & Co. KG	Mainz, DE	Exsikkator-Deckel, mit Tubus NS 24/29 Novus
Porzellantiegel	VWR International GmbH	Radnor, USA	459-0203 DIN
Muffelofen	Heraeus Holding GmbH	Hanau, DE	Heraeus M 110

Material und Methoden

Filterbeutel Rohfett	ANKOM Technology Macedon	New York, USA	XT4 Filter Bags
Filterbeutel Rohfaser	ANKOM Technology Macedon	New York, USA	F57 Filter Bags
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	6771.1
Waage	Satorius AG	Göttingen, DE	Analysewaagetyp Genius
Gefriertrocknungsgerät	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Osterode am Harz, DE	Alpha 1-4 LSC
Makro-Element Analysator	Elementar Analysensysteme GmbH	Hanau, DE	Makro Elementaranalysator vario max CN
Mühle	Retsch GmbH	Haan, DE	Ultra-Zentrifugalmühle ZM 200
Petrolether	Merck KGaA	Darmstadt, DE	Petroleumbenzin, reinst
Soxhlet-Extraktion	Büchi Labortechnik GmbH	Essen, DE	Extraktionssystem B- 811
Rohfaseranalysator	ANKOM Technology Macedon	New York, USA	Ankom2000 Fibre Analyser
Salzsäure	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	84415
Sandbad	Harry Gestigkeit GmbH	Düsseldorf, DE	SD 7
Faltenfilter	Whatman	Kent, UK	10347511
Atomabsorptions- spektrometer	Analytik Jena AG	Jena, DE	contrAA 700
Salpetersäure	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	84380
Ammoniumvanadat	Merck KGaA	Darmstadt, DE	1.01226
Ammoniummolybdat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	3666.1
Ammoniak	Merck KGaA	Darmstadt, DE	5432
Photometer	Amersham Pharmacia Biotech Inc	Piscataway, USA	Ultrospec 2100 pro
Photometer Software	Amersham Biosciences Corp.	Piscataway, USA	Swift II Quantification

Glasaufschlussgefäß	SCP Science	Quebec, CA	DigiPREP HT
Schwefelsäure	J.T. Baker	Griesheim, DE	6057
Kjeldahlkatalysator	Thompson & Capper Ltd.	Runcorn, GB	AA 17
Wasserstoffperoxid (30 %ig)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	31642

Tab. 30: Zusammensetzung der Nitrovanadatmolydat-Lösung für die Phosphorbestimmung - Herstellung der Lösung A: Ammoniummolybdat-Lösung

Substanz	Zugabe
Ammoniummolybdat (M=1235,09 g/mol) in warmen Reinstwasser lösen	100 g
Ammoniak (25 %)	10 ml
auf 1000 ml mit Reinstwasser auffüllen	

Tab. 31: Zusammensetzung der Nitrovanadatmolydat-Lösung für die Phosphorbestimmung - Herstellung der Lösung B: Ammoniummetavanadat-Lösung

Substanz	Zugabe
Ammoniummetavanadat (M=116,99 g/mol) in 400 ml warmen Reinstwasser lösen	2,35 g
H ₂ O	13 ml
auf 1000 ml mit Reinstwasser auffüllen	

Tab. 32: Zusammensetzung der Nitrovanadatmolydat-Lösung für die Phosphorbestimmung - Herstellung der Nitrovanadatmolybdat-Lösung

Substanz	Zugabe (ml)
Lösung A	200
Lösung B	200
Salpetersäure (65 %)	134
auf 1000 ml mit Reinstwasser auffüllen	

Tab. 33: Herstellung der Kalibrierlösung 1 mg/ml β Phosphor für die Phosphorbestimmung

Substanz	Zugabe (g)
Kaliumdihydrogenphosphat (136,08 g/mol) in Reinstwasser lösen und mit Reinstwasser auf 100 ml auffüllen	0,4387
von dieser Lösung eine 1:10 Verdünnung herstellen \rightarrow 0,1 mg/ml β (P) ¹	

¹ = β Phosphor

Tab. 34: Pipettierschema der Standardreihe in der Makroküvette für die Phosphorbestimmung

Gehalt in $\mu\text{g } \beta$ (P) ¹	Gehalt in $\mu\text{g } \beta$ (P) ¹ /ml	Volumen Kalibrierlösung [0,1 mg/ml β (P) ¹] in μl	Volumen Reinstwasser in μl	Volumen in Farbreagenz in μl
0	0	0	1500	500
10	5	100	1400	500
20	10	200	1300	500
40	20	400	1100	500
60	30	600	900	500

¹ = β Phosphor

3.10 Bestimmung der bakteriellen Metaboliten in Kotproben

Für die Bestimmung der bakteriellen Metabolite (kurzkettige Fettsäuren, Laktat und Ammonium) wurden frische Kotproben genommen, direkt für die einzelnen Bestimmungen eingewogen und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Alle verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung der bakteriellen Metaboliten sind in Tab. 35 aufgeführt.

3.10.1 Kurzkettige Fettsäuren

3.10.1.1 Prinzip

Die kurzkettigen Fettsäuren wurden mit Hilfe der Gaschromatografie bestimmt. Die zu analysierenden Substanzen werden im Injektor verdampft und mittels Trägergas durch die

Säule transportiert. Aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte und der Wechselwirkungen mit der stationären Phase werden die Fettsäuren getrennt und die Konzentration mit dem Flammenionisationsdetektor bestimmt. Die Software erstellt daraufhin ein Chromatogramm.

3.10.1.2 Durchführung

Es wurden 300 mg Kotprobe in ein 2 ml Eppendorfgefäß eingewogen und mit 1 ml Verdünnungslösung (Tab. 37) mit 0,5 mM Capronsäure als internen Standard suspendiert. Daraufhin wurden die Proben eine Stunde auf einem Rüttler inkubiert und danach bei $14800 \times g$ für 8 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es wurden 100 μl des Überstandes mit 900 μl Capronsäurelösung verdünnt und im Gaschromatografen analysiert. Nach 10 Proben wurde eine Kalibrierung mittels Standardlösung (Tab. 36) vorgenommen. Die chromatografische Trennung erfolgte dabei mit der HP-INNOWAX Säule. Wasserstoff diente als Trägergas, welcher über einen Gasgenerator generiert wurde. Bei dem Detektor handelte es sich um einen Flammenionisationsdetektor. Die Injektionsspritze hatte ein Fassungsvermögen von 10 μl . Das Probenvolumen von 1 μl wurde mit einer Wasserstoffflussrate von 30 ml/min auf die Säule aufgebracht. Der Gehalt der kurzkettigen Fettsäuren wurde durch die Flächenintegration des dazugehörigen Peaks bestimmt. Dafür wurde die Software HP ChemStation genutzt.

3.10.2 D- und L-Laktat

3.10.2.1 Prinzip

Da D- und L-Laktat wasserlöslich sind, ist es möglich, durch wässrige Extrakte der Probe die Substanzen mit Hilfe einer chiralen Säule flüssigkeitschromatografisch zu trennen und zu quantifizieren.

3.10.2.2 Durchführung

Für die Bestimmung von Laktat wurden 500 mg Kotprobe in ein 2 ml Eppendorfgefäß eingewogen und mit 1 ml Kupfer-II-sulfat-Lösung (0,5 mmol/l) (Tab. 39) versetzt, vermischt und 10 min auf dem Schüttler extrahiert. Anschließend wurden nacheinander 100 μl Carrez I und Carrez II Lösung (Tab. 40 und 41) dazu gegeben und es erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei $18000 \times g$. Der Überstand wurde durch einen Cellulose-Acetatfilter (0,45 μm) in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben. Von dem filtrierten Überstand wurden 400 μl mit 600 μl Kupfer-II-sulfat-Lösung (0,5 mmol/l) verdünnt und direkt in ein Messgefäß (Vial) gegeben. Die Anlage besteht aus zwei Säulen, einer Vorsäule und einer

chiralen Hauptsäule. Die Temperatur des Säulenofens betrug 35 °C. Die Eluenten, die Kupfer-II-sulfat-Lösung (2,5 mM) (Tab. 38) und die Kupfer-II-sulfat-Lösung (0,5 mM), passierten die Säule mit einer Flussrate von 1,0 ml/min. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl. Der Probenlauf dauert 24 min, bei dem die Substanzen mit Hilfe eines UV/VIS Detektors bei 253 nm quantifiziert wurden. Die Retentionszeit von L-Laktat betrug dabei 12-12,5 min und von D-Laktat 15-15,5 min. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Chromeleon-Software 6.9 und der Standardreihe (Tab. 42, 43 und 44).

3.10.3 Ammonium

3.10.3.1 Prinzip

Ammonium wurde mit Hilfe der Berthelot-Reaktion bestimmt. Die Reaktion findet im alkalischen Milieu statt, indem Ammonium als Ammoniak vorliegt. Ammoniak reagiert im ersten Schritt mit Hypochlorit zu Monochloramin. Das Monochloramin reagiert mit Thymol zu N-Chlor-2-isopropyl-5-methylchinon-monoimin und mit einem weiteren Thymolmolekül zum entsprechenden Indophenol. Im alkalischen Medium liegt das entstandene Indophenolmolekül in seiner blauen Basenform vor. Die Konzentration kann photometrisch bestimmt werden.

3.10.3.2 Durchführung

Für die Bestimmung wurden 500 mg Kotprobe benötigt. Die Kotproben wurden mit 1 ml 100 mM MOPS pH 7 (Tab. 45) versetzt und eine Minute homogenisiert mit anschließender zehnminütiger Inkubation auf Eis. Nachfolgend wurden die Proben bei 4 °C für 10 min bei 17.000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde in frische Eppendorfgefäße überführt. Für die Bestimmung wurde der Überstand 1:120 verdünnt. In einer Mikrotiterplatte wurden 20 µl der verdünnten Proben mit den nachfolgenden Reagenzien für die Berthelot-Reaktion gemischt: 100 µl Phenol-Nitroprussid-Lösung und 100 µl 0,2 % Na-Hypochloridlösung (Tab. 46) in 1 M NaOH. Danach erfolgte eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte in ein Mikrotiterplatten-Lesegerät gestellt und photometrisch bei 620 nm gemessen. Die zweite Messung erfolgte 5 min später. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Standardreihe (Tab. 47 und 48) und der i-control 1.7 Software ausgewertet.

Tab. 35: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Analyse der bakteriellen Metabolite

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer/Typ
Rüttler	VWR International GmbH	Radnor, USA	Rüttler VV 3
Zentrifuge	Eppendorf AG	Hamburg, DE	Centrifuge 5415 C
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge
MOPS-Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	6979.4
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	Heraeus Fresco 17 Centrifuge
Vial	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, USA	Screw cap vials
Eppendorfgefäß, 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030123.328
Eppendorfgefäß, 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030120.094
Gaschromatograf	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, USA	GC 6890N
HP-INNOWAX Säule	Agilent Technologies Inc	Santa Clara, USA	19095N-123 HP-Säule INNOWAX, Polyethylen Glycol
Gasgenerator	Parker Hannifin Corp.	Cleveland, USA	Parker ChromGas 9150
Injektionsspritze	Agilent Technologies Inc	Santa Clara, USA	
Software	Agilent Technologies Inc	Santa Clara, USA	HP ChemStation Software Rev.A.10.01
Spritzenaufsatzfilter, 0,45 µm	VWR International GmbH	Radnor, USA	5140062
HPLC-Anlage	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, USA	HPLC Agilent 1100
Vorsäule	Phenomenex Inc.	Torrance, USA	Phenomenex C18 4.0 L mm x 2,0 ID mm
Hauptsäule	Phenomenex Inc.	Torrance, USA	Phenomenex Chirex 3126 (D)-penicillamine 150 x 4,6 mm
Software	Dionex Corporation	Sunnyvale, USA	Chromeleon Software version 6.9
Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One	Kremsmünster, AT	655101
Phenol-Nitroprussid-Lösung	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	P6994

Material und Methoden

Hexansäure	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	H1213-7
Oxalsäure-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	T 113.1
Kupfer-II-Sulfat	Merck KGaA	Darmstadt, DE	2791
Zinkchlorid	Merck KGaA	Darmstadt, DE	108816
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Merck KGaA	Darmstadt, DE	4984
D- + L-Milchsäure	AppliChem GmbH	Darmstadt, DE	A2184
Natriumhypochlorit	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	9062.3
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	7343.1
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	A 9434
Natriumhypochloridlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	9062.3
Mikrotiterplatten Lesegerät	Tecan Group Ltd.	Männedorf, CH	Infinite M200 PRO
Software	Tecan Group Ltd.	Männedorf, CH	i-control 1.7

Tab. 36: Zusammensetzung der Standardlösung (0,5 mM) zur Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren

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

Tab. 37: Zusammensetzung der Verdünnungslösung für die Proben zur Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren

Substanz	Zugabe
Hexansäure	250 µl
Oxalsäure-Dihydrat	2 g

mit Reinstwasser auf 200 ml auffüllen

Tab. 38: Herstellung der Lösungen für die Laktat-Analyse - Herstellung der Lösung A: 2,5 mM Kupfer-II-Sulfat-Lösung mit 2-Propanol

Substanz	Zugabe
Kupfer-II-Sulfat	399 mg
2-Propanol	50,0 ml

mit Reinstwasser auf 1000 ml auffüllen

Tab. 39: Herstellung der Lösungen für die Laktat-Analyse - Herstellung der Lösung B: 0,5 mM Kupfer-II-Sulfat-Lösung

Substanz	Zugabe (mg)
Kupfer-II-Sulfat	79,8
in 1000 ml Reinstwasser lösen	

Tab. 40: Herstellung der Lösungen für die Laktat-Analyse - Herstellung der Lösung C: Carrez I

Substanz	Zugabe (g)
Zinkchlorid	17,0
in 100 ml Reinstwasser lösen	

Tab. 41: Herstellung der Lösungen für die Laktat-Analyse - Herstellung der Lösung D: Carrez II

Substanz	Zugabe (g)
Kaliumhexacyanoferrat (II)	15,0
in 100 ml Reinstwasser lösen	

Tab. 42: Herstellung der Standardreihe für die Laktat-Analyse - Herstellung der Stammlösung (10 mmol/l)

Substanz	Zugabe (mg)
D- + L – Milchsäure	
in ein 25 ml Messkolben überführen und mit 0,5 mmol Kupfer-II-sulfat Lösung auffüllen	49,9

Tab. 43: Herstellung der Standardreihe für die Laktat-Analyse - Herstellung der 1 mmol/l Lösung

Substanz	Zugabe (µl)
Stammlösung (10 mmol/l)	
in ein Vial geben und mit 900 µl 0,5 mmol Kupfer-II-sulfat Lösung verdünnen	100

Tab. 44: Herstellung der Standardreihe für die Laktat-Analyse - Herstellung der 0,1 mmol/l Lösung

Substanz	Zugabe (µl)
1 mmol/l Lösung	
in ein Vial geben und mit 900 µl 0,5 mmol Kupfer-II-sulfat Lösung verdünnen	100

Material und Methoden

Tab. 45: Herstellung von 100 mM MOPS pH 7 für die Ammoniumbestimmung

Substanz	Zugabe (g)
MOPS	
in 100 ml Reinstwasser lösen und den pH auf 7 bei 4 °C einstellen	2,092

Tab. 46: Herstellung von 0,2 % Natriumhypochloritlösung in 1 M Natriumhydroxid für die Ammoniumbestimmung

Substanz	Zugabe (ml)
12 %iges Natriumhypochlorit	1
1 M Natriumhydroxid	59

Tab. 47: Herstellung von 1000 μM NH_4^+ in 100 mM MOPS pH 7 für die Ammoniumbestimmung

Substanz	Zugabe
Ammoniumchlorid	0,0535 g
100 mM MOPS pH 7	10 ml

diese Lösung 2 mal 1:10 verdünnen

Tab. 48: Standardreihe für die Ammoniumbestimmung

Endkonzentration NH_4^+ ¹ in μM	Aus 1000 μM NH_4^+ ¹ (A)	Volumen (A) in μl	Volumen Verdünnungsmedium (V) in μl
400	1000	400	600
350	1000	350	650
300	1000	300	700
250	1000	250	750
200	400	500	500
150	300	500	500
100	200	500	500
50	100	500	500

¹ NH_4^+ : Ammonium

3.11 Bestimmung der Chitinaseaktivität in Kotproben

3.11.1 Prinzip

Der Chitinasegehalt im Kot wurde mittels Farbreaktion bestimmt. Wenn Chitinase kolloides Chitin-Azur umsetzt, wird der Farbstoff Azur freigesetzt und kann photometrisch bei 560 nm gemessen werden.

3.11.2 Durchführung

Die Bestimmung der Chitinaseaktivität wurde nach Shen et al. (2010) durchgeführt. Um Chitin-Azur in eine kolloide Lösung zu bringen, wurden 100 mg Chitin-Azur mit 1 ml Salzsäure versetzt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler. Nach der Inkubation wurden 25 ml Reinstwasser dazugegeben und die Lösung wurde für 20 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zentrifugat in 40 ml Reinstwasser resuspendiert. Es folgte eine zweite Zentrifugation. Der Überstand wurde wieder abgekippt und das Pellet in 25 ml Sörensen Phosphat Puffer (Tab. 51 und 52) resuspendiert. Die entstandene Lösung wurde nach Prüfung des pH-Wertes als Substrat genutzt.

Ein Gramm Kotprobe wurde in 10 ml Sörensen Phosphat Puffer suspendiert und 15 min auf einem Schüttler gemischt. Daraufhin erfolgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 3939 x g. Der Überstand wurde abgenommen und gleichmäßig in Eppendorfgefäße überführt. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 17000 x g über 30 min. Der Überstand wurde in frische Eppendorfgefäße pipettiert. Es wurden 400 µl des Überstandes mit 400 µl Substrat versetzt. Pro Probe wurden auch ein Probenleerwert und ein Reagenzienleerwert gemessen. Es schloss sich ein Inkubationsschritt von 2 h bei 37 °C im Schüttelinkubator an. Nach der Inkubation wurden die Proben 10 min lang bei Raumtemperatur und 17000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Halbmikroküvette gegeben und bei 560 nm gegen Luft gemessen. Die Ergebnisse wurden mittels Standardreihe (Tab. 49) und Gleichung berechnet.

$$\Delta E = E_{\text{Probe}} - E_{\text{PLW}}$$

$$U/g = \left[\frac{[(\Delta E * m + n) * 400]}{1000} \right] * f$$

f = Verdünnungsfaktor (10, da 1 g Kot in 10 ml Sörensen Phosphat Puffer extrahiert wurde)

400 = Probenvolumen im Versuch

m und n = Trendlinie der Standardkurve

Material und Methoden

Die Enzymaktivität der Chitinase wird in Unit angegeben. Eine Einheit (Unit) der Chitinase setzt 1 mg N-Acetyl-D-Glucosamin des Chitins in einer Stunde bei einem zwei Stunden Test frei.

Alle verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Analyse der Chitinaseaktivität sind in Tab. 50 aufgeführt.

Tab. 49: Herstellung der Standardreihe zur Bestimmung der Chitinaseaktivität

Enzymaktivität in U ²	Chitinase 1 U ² /100 µl (µl)	Chitinase 0,1 U ² /100 µl (µl)	Substrat (µl)	Sörensen Phosphat Puffer (µl)
1	100		400	300
0,5	50		400	350
0,2	20		400	380
0,1		100	400	300
0,05		50	400	350
0,025		25	400	375
0,01		10	400	390
0,005		5	400	395
RLW ¹			400	400

¹ RLW: Reagenzienleerwert; ² U: Unit

Tab. 50: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Analyse der Chitinaseaktivität

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer/Typ
Chitin-Azur	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	C3020-100MG
Chitinase vom <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	C6137-5UN
Salzsäure	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	30721
Greinerröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE	210261
Oak Ridge Röhrchen	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	3138-0050
Zentrifuge	Beckman Coulter	Krefeld, DE	Avanti J-26 XP
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	Heraeus Labofuge 400R
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	Heraeus Fresco 17

Photometer	Amersham Biosciences Corp.	Piscataway, USA	Ultrospec 3300 pro
Photometer Software	Amersham Biosciences Corp.	Piscataway, USA	Swift II Quantification
Eppendorfgefäß, 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030123.328
Eppendorfgefäß, 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE	0030120.094
Halbmikroküvetten	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, DE	759115
Horizontalschüttler	Bibby Scientific Limited	Staffordshire, GB	Roller mixer SRT 6
Schüttelinkubator	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	MAXQ 6000
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG	Schwabach, DE	Heidolph Multi Reax
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat (177,99 g/mol)	Merck KGaA	Darmstadt, DE	106580
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat (137,99 g/mol)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	K300.1

Tab. 51: 1. Schritt, Zusammensetzung des 0,1 M Sörensen-Natriumphosphat-Puffer (pH 6)

Substanz	erzielte Stoffmengenkonzentration (mol/l)	Zugabe (g)
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat (177,99 g/mol)	0,2	17,799g in 0,5 Liter Reinstwasser lösen
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat (137,99 g/mol)	0,2	13,799 g in 0,5 Liter Reinstwasser lösen

Tab. 52: 2. Schritt, Zusammensetzung des 0,1 M Sörensen-Natriumphosphat-Puffer (pH 6)

Substanz	Zugabe (ml)
0,2 mol/l Dinatriumhydrogenphosphatlösung	12,3
0,2 mol/l Natriumdihydrogenphosphatlösung	87,7

3.12 Bestimmung des Chitingehalts in Futter- und Kotproben

3.12.1 Prinzip

Chitin ist ein Polysaccharid, das aus N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten aufgebaut ist. Der Gehalt an Glucosamin im Chitin wurde im Vorfeld ionenchromatografisch ermittelt. Zusätzlich wurde eine Glucosaminkalibrierreihe angefertigt, um den Glucosamingehalt in den Proben bewerten zu können. Der Gehalt an Glucosamin in den Proben steht im linearen Zusammenhang mit dem Chitingehalt in den Proben.

3.12.2 Durchführung

3.12.2.1 Vorbereitung Glucosaminkalibrierreihe

Es wurden 20 mg Glucosamin in einen 20 ml Messkolben eingewogen und mit Reinstwasser auf 20 ml aufgefüllt. Aus dieser Stammlösung mit der Konzentration 1 mg/ml wurde 1 ml entnommen und in ein 10 ml Messkolben überführt und wiederum mit Reinstwasser auf 10 ml aufgefüllt. Es entstand die Ausgangslösung (100 µg/ml) für die Kalibrierreihe. Die Herstellung der Kalibrierreihe ist in Tab. 53 dargestellt.

3.12.2.2 Vorbereitung der Futter- und Kotproben

Es wurden 700 mg Futter- und Kotproben in Rohfaserfilterbeutel eingewogen. Daraufhin erfolgte die Fettextraktion mittels Petrolether nach dem Soxhlet-Verfahren. Danach wurden die Proben in 1,25 %iger Schwefelsäure und nachfolgend in 1,25 %igem Natriumhydroxid gekocht. Um die Restflüssigkeit aus den Filterbeuteln und den Proben zu entfernen, wurden die Rohfaserfilterbeutel mit Aceton behandelt und anschließend 45 min im Trockenschrank bei 104 °C getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Rohfaserfilterbeutel samt Probeninhalt in ca. 0,5 cm x 0,5 cm große Teile geschnitten und in ein 50 ml Greiner Röhrchen überführt. In das Röhrchen wurden 4 ml 12 molare Schwefelsäure gegeben und für 60 min bei 40 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden 30 ml Reinstwasser hinzugegeben und für 120 min bei 100 °C gekocht. Danach wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und mittels Natriumhydroxidlösung (Konzentration: 7 mol/l) der pH-Wert auf 8-9 eingestellt. Die Suspension wurde quantitativ in einen 100 ml Messkolben überführt und mit Reinstwasser aufgefüllt. Die Flüssigkeit wurde durch eine 0,2 µm große SCFA Filtermembran filtriert und in einem 15 ml Greiner Röhrchen aufgefangen. Die Futterproben wurden unverdünnt, das Larvenmehl 1:10 und das Chitin 1:20 verdünnt und ionenchromatografisch gemessen. Die Ergebnisse wurden mittels Kalibrierreihe bestimmt.

Alle verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Chitingehaltbestimmung sind in Tab. 54 aufgeführt.

Tab. 53: Herstellung der Glucosaminkalibrierreihe für die Chitingehaltbestimmung

Glucosaminkonzentration in $\mu\text{g/ml}$	Menge der Ausgangslösung in μl	Menge der Verdünnungslösung (Reinstwasser) in μl
10	100	900
20	200	800
40	400	600
60	600	400
80	800	200

Tab. 54: Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung des Chitingehaltes

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, Land	Artikelnummer/Typ
D(+)-Glucosamin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	G-4875
Chitin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	C7170
Filterbeutel Rohfaser	ANKOM Technology Macedon	New York, USA	F57 Filter Bags
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	6771.1
Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	Lackrockenschrank LUT 6050 F
Waage	Satorius AG	Göttingen, DE	Analysewaagetyp Genius
Petrolether	Merck KGaA	Darmstadt, DE	Petroleumbenzin, reinst
Soxhlet-Extraktion	Büchi Labortechnik GmbH	Essen, DE	Extraktionssystem B- 811
Rohfaseranalysator	ANKOM Technology Macedon	New York, USA	Ankom2000 Fibre Analyser
Schwefelsäure	J.T. Baker	Griesheim, DE	6057
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE	5025.5
Greinerröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE	188271
Greinerröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, DE	210261
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG	Uetze, DE	Typ 3043

pH-Messgerät	Mettler-Toledo Garvens GmbH	Gießen, DE	SevenMulti
Spritzenaufsatzfilter, 0,2 µm	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	724-2020

3.13 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die Darstellung der Daten erfolgte in Form des arithmetischen Mittels und seiner Standardabweichung. Die Parameter wurden mit dem Allgemeinen Linearen Modell (Univariat) für die Faktoren „Gruppe“ und „Durchgang“ auf Unterschiede getestet. Dabei wurde die „Gruppe“ als fester Faktor und der „Durchgang“ als Kovariate angegeben. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 %, wurde der Unterschied als signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Ergebnisse der Futtermitteluntersuchung, der Analyse des Larvenmehls von *Hermetia illucens* und die Ergebnisse des Gesundheitszustands der Hunde während des Versuches dargestellt. Danach werden die Analyseergebnisse des Blutes und der Fäzes vorgestellt. Die Blutproben wurden für die Anfertigung des Blutbildes inklusive Differentialblutbild und für die durchflusszytometrischen Untersuchungen genutzt. Der Kot der Hunde diente der Analyse von verdauungsphysiologischen Parametern, der bakteriellen Metaboliten, der Bestimmung des Chitingehalts und der Aktivitätsmessung der Chitinase.

4.1 Versuchsdiäten

In der nachfolgenden Tabelle sind die analytischen Bestandteile der Versuchsdiäten und des Larvenmehls von *Hermetia illucens* dargestellt (Tab. 55 und 56).

Tab. 55: Analytische Bestandteile des Kontroll- und Versuchsfutter

	Kontrollfutter (Lamm und Reis)	Versuchsfutter (Hermetia und Reis)
g/kg TS ¹		
Rohprotein	269	260
Rohfett	90,8	74,9
Rohasche	84,5	54,8
Rohfaser (entfettet)	14,3	23,6
Kalzium	19,7	8,42
Phosphor	12,8	10,3
Kalium	3,38	6,07
Magnesium	1,01	1,50
Natrium	3,72	2,35
mg/g TS ¹		
Zink	107	159
Mangan	27,8	60,5
Kupfer	12,5	17,8
Eisen	290	256

¹TS: Trockensubstanz

Tab. 56: Analytische Bestandteile des Larvenmehls von *Hermetia illucens*

Larvenmehl von <i>Hermetia illucens</i>	
g/kg TS ¹	
Rohprotein	675
Rohfett	62,0
Rohasche	82,0
Rohfaser	121
Kalzium	3,88
Phosphor	11,8
Kalium	11,2
Magnesium	4,54
Natrium	1,27
mg/kg TS ¹	
Zink	140
Mangan	192
Kupfer	12,2
Eisen	187

¹ TS: Trockensubstanz

4.2 Gesundheitszustand und Körpermasse

Keiner der Hunde zeigte während des Versuches gesundheitliche Auffälligkeiten bzw. musste aufgrund des Erreichens der Abbruchkriterien (Tab. 73) aus dem Versuch genommen werden. Keiner der Hunde erhielt eine medikamentöse Behandlung.

4.3 Gesamtkotmenge, Trockensubstanz des Kotes und Kotkonsistenz

Vergleicht man die Gesamtkotmenge in Gramm pro Tag beider Fütterungsgruppen miteinander, ist zu erkennen, dass die Hunde, die das Kontrollfutter bekamen, eine numerisch höhere Gesamtkotmenge pro Tag erreichten. Der Unterschied der Kotkonsistenz zwischen beiden Fütterungsgruppen ist statistisch signifikant. Die Kotkonsistenz der Hunde, die das Versuchsfutter erhielten, war weicher. Der Trockensubstanzgehalt des Kotes zwischen beiden Fütterungsgruppen war allerdings nicht unterschiedlich (Tab. 57).

Tab. 57: Durchschnittliche tägliche Kotmenge, Trockensubstanz des Kotes und Kotkonsistenz der Fäzes der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter	P-Wert*
Kotmenge (g/24 h)	137 ± 50	109 ± 39	0.141
TS ¹ des Kotes (% der uS)	35,4 ± 4,2	34,3 ± 2,7	0.432
Kotkonsistenz ²	2,04 ± 0,3	2,25 ± 0,2	0.044

¹ TS: Trockensubstanz

² Score 1-5; geformte, trockene, harte Fäzes - flüssige Fäzes, Diarrhoe)

* signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

4.4 Blutbild und Differentialblutbild

Die hämatologischen Parameter unterscheiden sich nicht zwischen den beiden Fütterungsgruppen (Tab. 58). Auch im Differentialblutbild traten keine Differenzen zwischen den Fütterungsgruppen auf (Tab. 58). Alle Parameter befanden sich im Normbereich.

Tab. 58: Ergebnisse des Blutbildes inkl. Differentialblutbildes der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter	P-Wert*	Normalwerte ³
Leukozyten (G/l)	8,29 ± 1,7	8,75 ± 1,4	0.477	6,0-12,0
Erythrozyten (T/l)	7,09 ± 0,4	6,99 ± 0,5	0.561	5,5-8,5
Hämoglobin (g/l)	165 ± 8,9	161 ± 10	0.273	150-190
Hämatokrit (l/l)	0,47 ± 0,0	0,46 ± 0,0	0.610	0,44-0,52
Thrombozyten (G/l)	265 ± 92	273 ± 68	0.827	150-500
Segm. ¹ Neutrophile Granulozyten (G/l)	5,09 ± 1,2	5,46 ± 1,2	0.466	3,0-9,0
Stabk. ² Neutrophile Granulozyten (G/l)	0	0	/	< 0,5
Lymphozyten (G/l)	2,28 ± 0,4	2,38 ± 0,4	0.542	1-3,6
Monozyten (G/l)	0,48 ± 0,2	0,48 ± 0,1	0.891	0,04-0,5
Eosinophile Granulozyten (G/l)	0,45 ± 0,3	0,42 ± 0,2	0.759	0,04-0,6
Basophile Granulozyten (G/l)	0	0	/	< 0,04

* signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

¹ segm. = segmentkernige; ² stabk. = stabkernige

³ Labor Laboklin

4.5 Lymphozytenphänotypisierung

Es kam zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden in den Lymphozytenpopulationen während des Versuches zwischen den beiden Fütterungsgruppen (Tab. 59). Aus technischen Gründen konnten drei Einzelproben (CD4⁺ Zellen von Tier 21 [Kontrollfutter], MHC II⁺ Zellen von Tier 18 [Versuchsfutter] und Tier 22 [Kontrollfutter]) nicht analysiert werden.

Tab. 59: Phänotypisierung der peripheren mononukleären Lymphozyten (in %) der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter	P-Wert [*]
CD3 ⁺	74,0 ± 4,4	71,5 ± 4,9	0.206
CD4 ⁺	48,3 ± 4,1 ¹	48,3 ± 4,2	0,940
CD5 ⁺	75,3 ± 5,6	75,2 ± 3,9	0.952
CD8β ⁺	19,9 ± 3,4	18,7 ± 3,1	0.412
CD21 ⁺	21,4 ± 5,4	22,2 ± 3,6	0.687
MHC II ⁺	97,5 ± 0,9 ¹	97,9 ± 0,8 ¹	0.338

^{*} signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

¹ n = 11

4.6 Mitogeninduzierter Lymphozytenproliferationstest

Statistisch konnten keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit (Stimulationsindex) zwischen beiden Fütterungsgruppen festgestellt werden (Tab. 60).

Tab. 60: Vergleich der Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten (Stimulationsindex) durch die Mitogene Pokeweed Mitogen, Concanavalin A und Phytohämagglutinin der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12

Parameter ¹	Kontrollfutter	Versuchsfutter	P-Wert [*]
SI PWM ²	9,81 ± 3,2	11,4 ± 4,1	0.156
SI Con A ³	15,6 ± 5,8 ⁵	18,3 ± 8,5 ⁵	0.241
SI PHA ⁴	11,0 ± 4,1	14,2 ± 6,6	0.122

^{*} signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

¹ SI: Stimulationsindex

² PWM: Pokeweed Mitogen; ³ Con A: Concanavalin A; ⁴ PHA: Phytohämagglutinin

⁵ Ergebnisse aufgrund veränderter Streulichteigenschaften nicht auswertbar

Die Lymphozytenpopulation, welche durch Con A stimuliert werden sollte, wies in dieser Studie veränderte Streulichteigenschaften auf (Abb. 4). Die Zellen lagen außerhalb der erwarteten Position in Gate R2. Dieses Zellverhalten zog sich durch alle Lymphozytenpopulationen der Hunde, welche durch Con A stimuliert werden sollten. Die proliferierten Lymphozyten durch PHA (Abb. 5) und PWM (Abb. 6) lagen im Vergleich dazu auf der erwarteten Position im Scatterbild und waren somit, im Gegensatz zu denen mit Con A stimulierten, auswertbar.

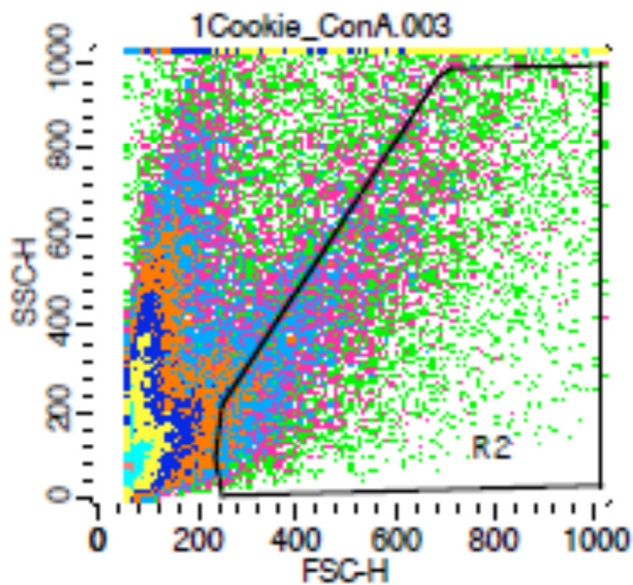


Abb. 4: Prolifizierte Lymphozyten durch das Mitogen Con A am Beispiel eines Hundes nach Fütterung des Kontrollfutters

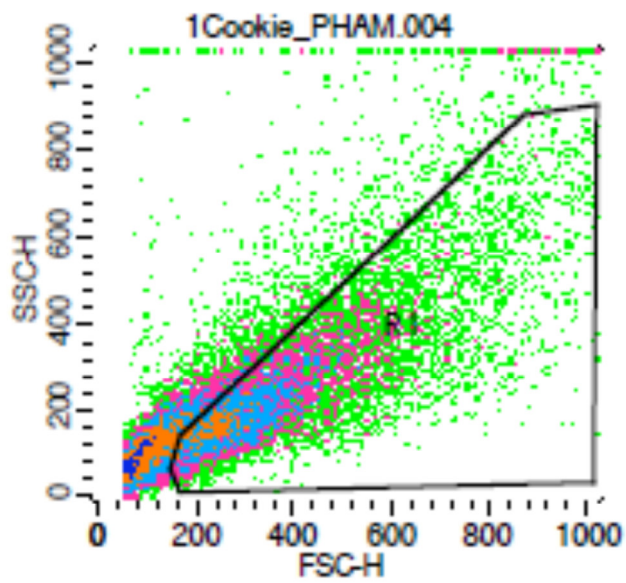


Abb. 5: Proliferierte Lymphozyten durch das Mitogen PHA am Beispiel eines Hundes nach Fütterung des Kontrollfutters

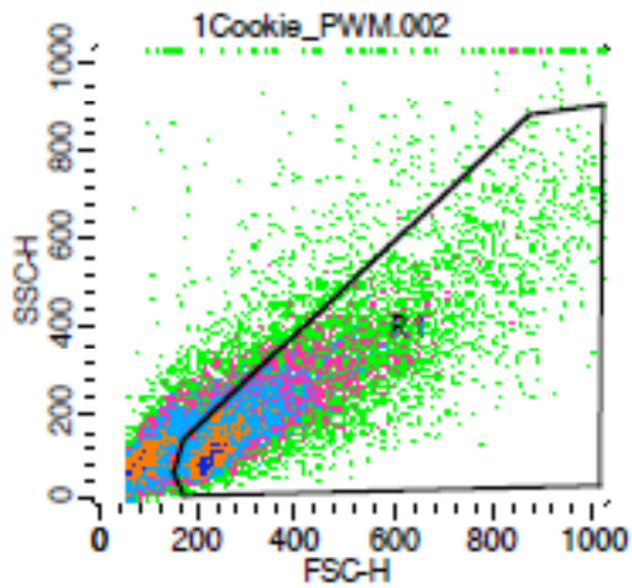


Abb. 6: : Proliferierte Lymphozyten durch das Mitogen PWM am Beispiel eines Hundes nach Fütterung des Kontrollfutters

4.7 Futtermittelantigeninduzierter Lymphozytenproliferationstest

Es zeigten sich durch den futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstest keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit der Lymphozyten (Stimulationsindex) zwischen den beiden Fütterungsgruppen (Tab. 61).

Tab. 61: Vergleich der Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten (Stimulationsindex) mit dem Proteinextrakt (*Hermetia illucens* Larvenmehl) in verschiedenen Konzentrationen (30, 75, 125, 250 und 500 µg/ml) der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12

Parameter ¹	Kontrollfutter	Versuchsfutter	P-Wert*
SI 30	0,66 ± 0,3	0,70 ± 0,2	0.649
SI 75	0,91 ± 0,3	0,99 ± 0,3	0.549
SI 125	1,20 ± 0,5	1,26 ± 0,5	0.801
SI 250	2,06 ± 1,3	2,19 ± 1,2	0.788
SI 500	4,44 ± 2,1	4,46 ± 2,4	0.980

* signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

¹ SI: Stimulationsindex

Bei der Zugabe von hohen Antigenkonzentrationen (250 µg/ml und 500 µg/ml) wurde eine Verschiebung der gesamten Zellpopulation auf der y-Achse nach oben beobachtet, sodass mögliche BrdU positive und negative Populationen nicht mehr eindeutig voneinander zu unterscheiden waren (Abb. 7).

Diese Verschiebung kann ein Zeichen davon sein, dass die Lymphozyten ihre Vitalität verloren haben, da eine höhere Fluoreszenz auch ein Hinweis auf nicht vitale Zellen ist. Da auch nicht vitale Zellen den Anti-BrdU-Antikörper binden können, wäre eine durchflusszytometrische Messung trotzdem möglich. Damit wäre das Ergebnis falsch-positiv.

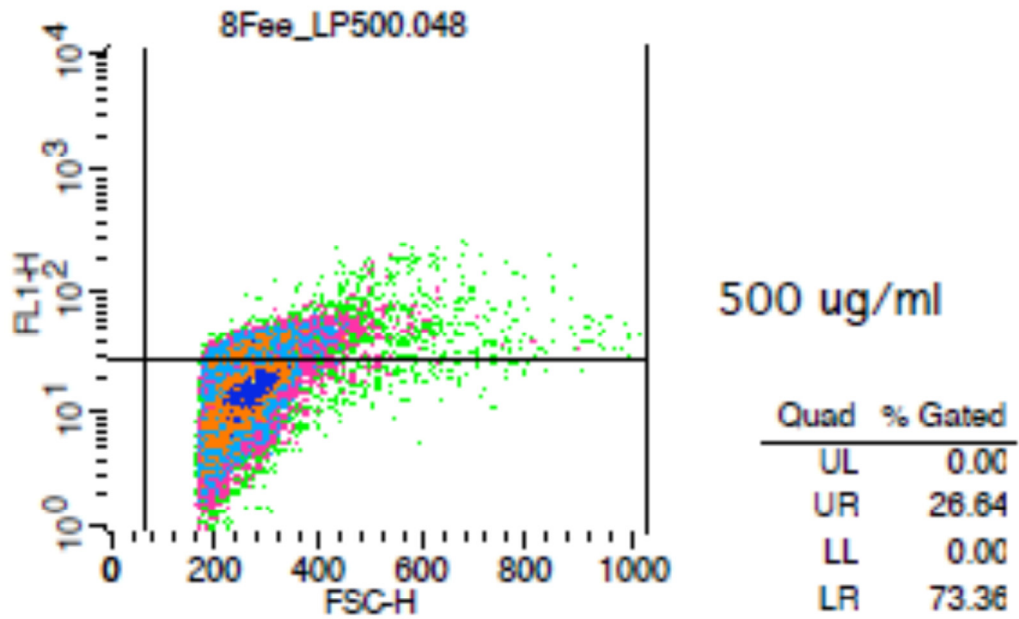


Abb. 7: Antigenkonzentration von 500 µg/ml im futtermittelinduzierten Lymphozytenproliferationstest von Fee nach Kontrollfutterfütterung

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden weitere Zellkulturen ohne zugesetztes BrdU angesetzt (Abb. 8).

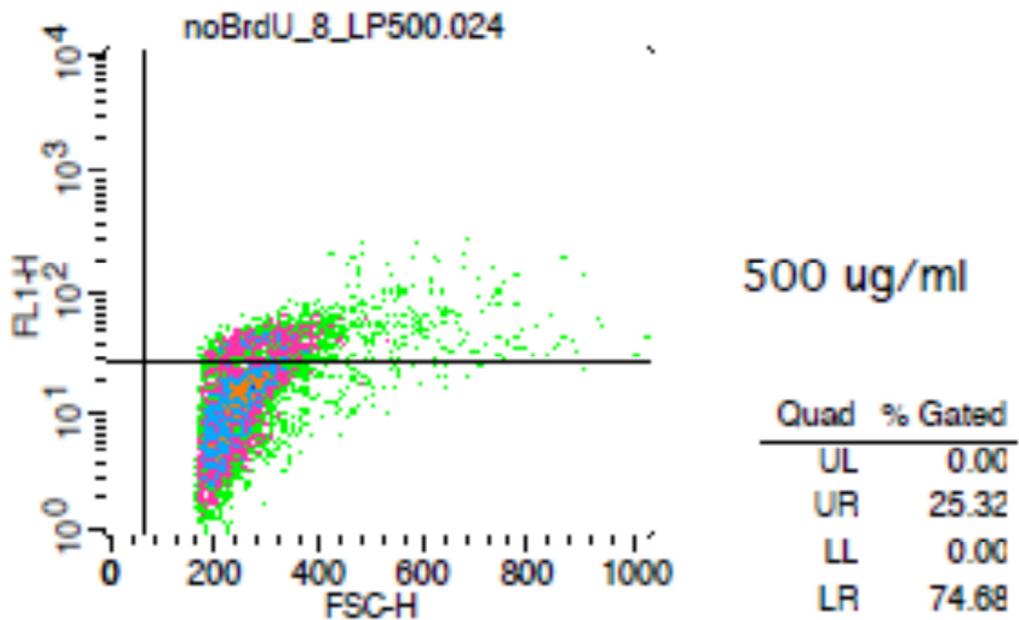


Abb. 8: Antigenkonzentration von 500 µg/ml im futtermittelinduzierten Lymphozytenproliferationstest von Fee nach Kontrollfutterfütterung ohne BrdU Zusatz

Dadurch, dass kein BrdU zugesetzt wurde, kann es nicht sein, dass der Anti-BrdU-Antikörper an das BrdU gebunden hat. Eine Fluoreszenz ist trotz dessen sichtbar. Vermutlich handelt es sich hier, wie angenommen, um nicht mehr vitale Lymphozyten, die den Anti-BrdU-Antikörper ebenfalls gebunden haben könnten.

Ähnlich verhält es sich mit den Lymphozyten der Hunde, die das Versuchsfutter Hermetia und Reis bekamen (Abb. 9 und 10).

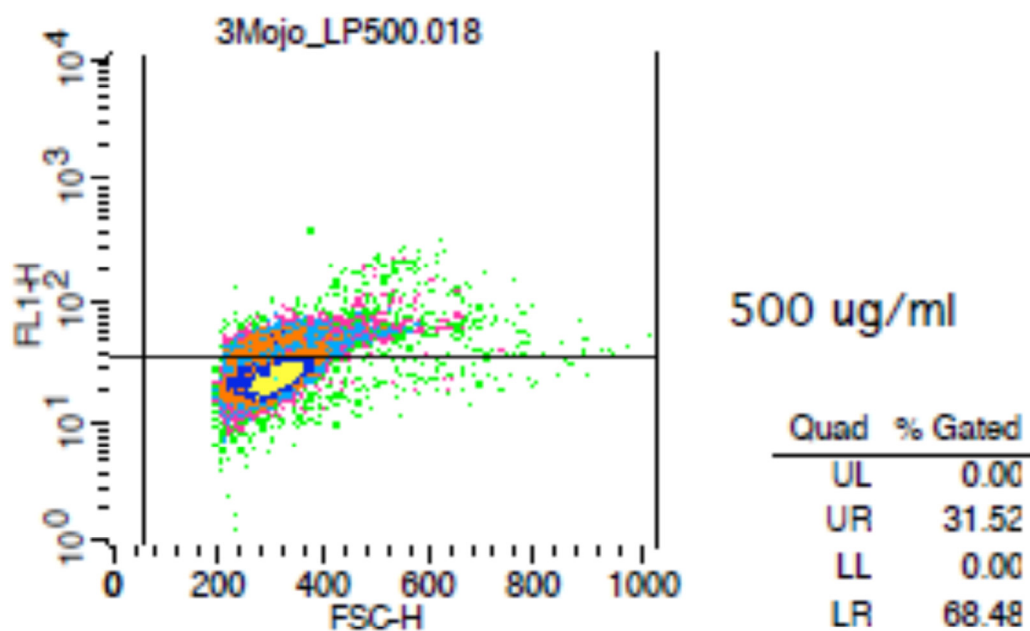


Abb. 9: Antigenkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ im futtermittelinduzierten Lymphozytenproliferationstest von Mojo nach Versuchsfutterfütterung

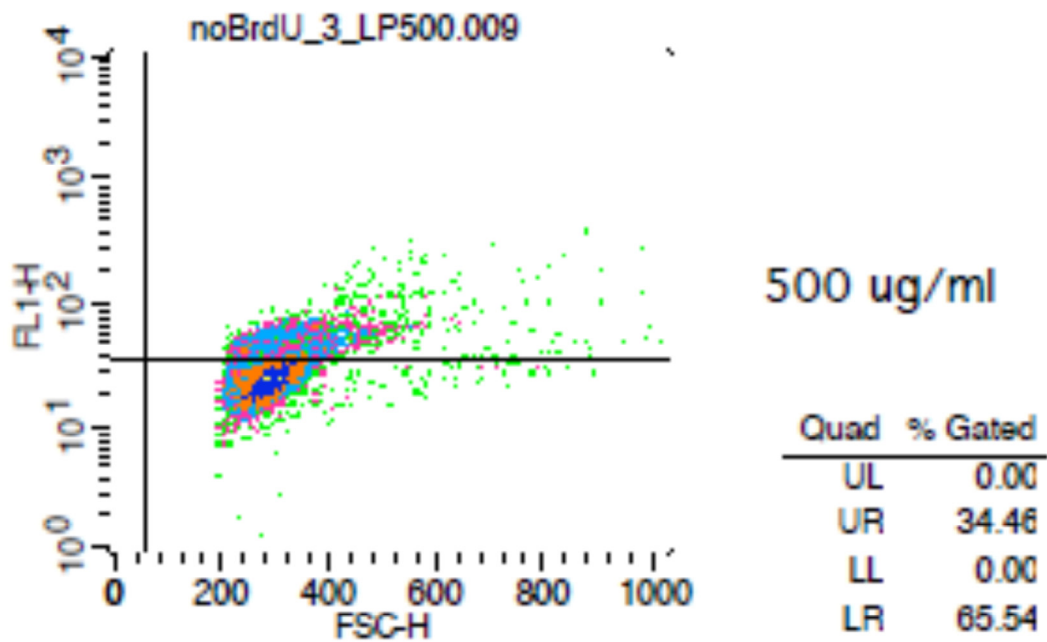


Abb.10: Antigenkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ im futtermittelinduzierten Lymphozytenproliferationstest von Mojo nach Versuchsfutterfütterung ohne BrdU Zusatz

Zusätzlich wurde ein Proliferationstest gemacht, bei dem BrdU, aber kein Antikörper hinzugegeben wurde. Der Anteil der proliferierten Lymphozyten zwischen den Zellkulturen die BrdU+Anti-BrdU-Antikörper (Abb. 11) und BrdU, aber keinen Anti-BrdU-Antikörper (Abb. 12) enthielten, war annähernd gleich. Es kann jedoch zu keiner Detektion von proliferierten Lymphozyten ohne Antikörper kommen. Demnach sind die Zellen, die in Abb. 12 im oberen rechten Quadranten vorkommen, nicht proliferiert. Vermutlich handelt es sich um nicht vitale Lymphozyten mit stark erhöhter Autofluoreszenz.

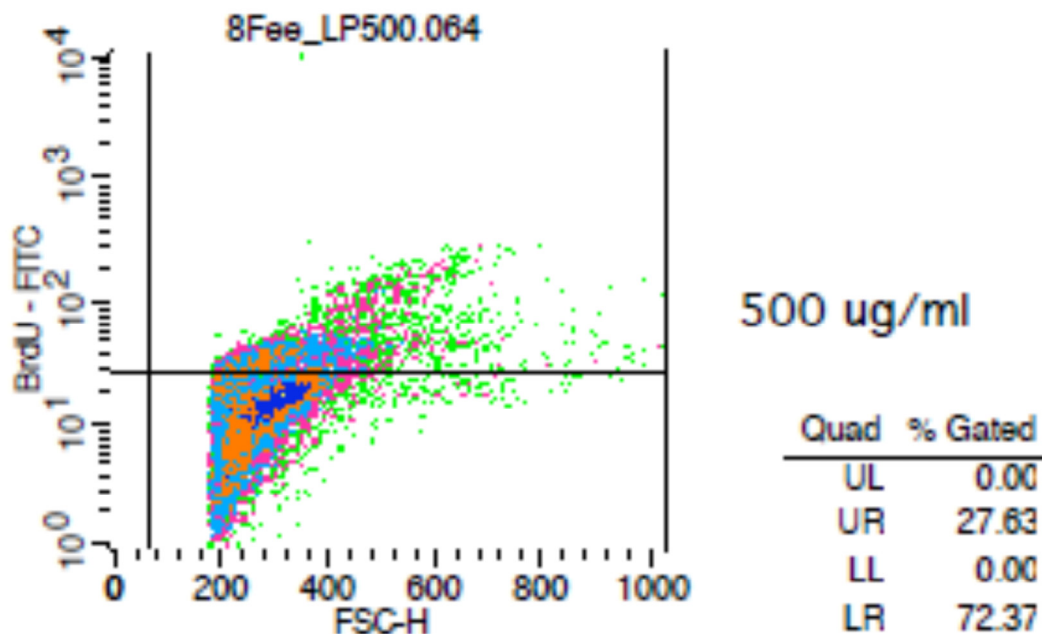


Abb. 11: Antigenkonzentration von 500 µg/ml im futtermittelinduzierten Lymphozytenproliferationstest von Fee nach Versuchsfutterfütterung

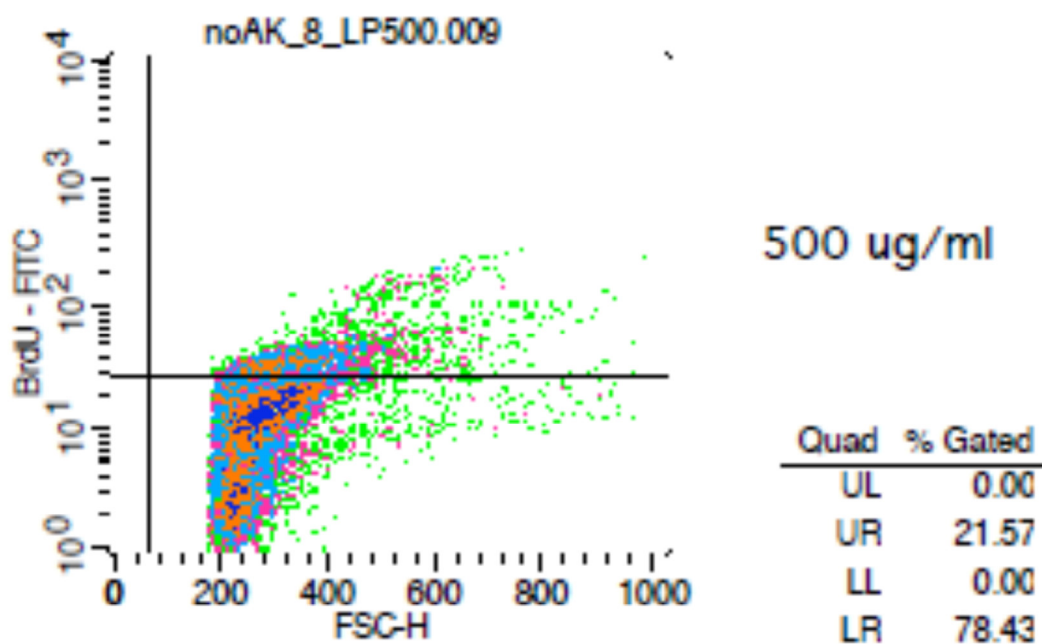


Abb. 12: Antigenkonzentration von 500 µg/ml im futtermittelinduzierten Lymphozytenproliferationstest von Fee nach Versuchsfutterfütterung ohne Anti-BrdU-Antikörper

Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Kontrollfutterfütterung beobachtet. Außerdem wären bei einer Sensibilisierung durch ein Futtermittelantigen vermutlich Reaktionen am Tier zu beobachten gewesen. Die allgemeine Untersuchung während der gesamten Versuchsdauer konnte dies aber nicht bestätigen.

4.8 Scheinbare Gesamtverdaulichkeit des Kontroll- und Versuchsfutters

Es konnten statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der scheinbaren Verdaulichkeit der Trockensubstanz zwischen beiden Fütterungsgruppen festgestellt werden. Auch die scheinbare Verdaulichkeit der Mengenelemente Kalzium, Phosphor, Natrium, Kalium und Magnesium und der Spurenelemente Zink und Eisen wiesen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen auf (Tab. 62). Die scheinbare Verdaulichkeit der Trockensubstanz und von Kalium, Zink, Phosphor und Natrium waren bei den Hunden höher, die das Versuchsfutter erhielten. Die scheinbare Verdaulichkeit von Kalzium, Magnesium und Eisen wies in der Kontrollgruppe höhere Werte auf.

Tab. 62: Scheinbare Gesamtverdaulichkeit (in %) nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter	P-Wert*
Trockensubstanz	81,8 ± 1,3	83,2 ± 1,6	0.021
Organische Substanz	86,7 ± 1,1	86,9 ± 1,5	0.831
Rohasche	27,9 ± 4,4	28,2 ± 5,4	0.898
Rohfett	97,3 ± 1,1	97,1 ± 0,4	0.386
Rohprotein	79,2 ± 2,5	77,3 ± 2,8	0.103
Rohfaser	11,2 ± 11	7,73 ± 12	0.464
Kalzium	19,0 ± 5,1	5,18 ± 2,2	< 0.001
Phosphor	33,3 ± 6,2	42,2 ± 3,0	< 0.001
Natrium	87,4 ± 3,9	90,3 ± 3,8	0.047
Kalium	78,7 ± 10	87,9 ± 6,0	0.014
Magnesium	27,2 ± 5,5	18,1 ± 5,8	0.001
Zink	9,80 ± 7,0	18,9 ± 5,0	0.002
Mangan	7,75 ± 5,7	6,92 ± 3,7	0.665
Kupfer	9,61 ± 11	13,7 ± 8,4	0.330
Eisen	14,2 ± 8,6	3,87 ± 6,7	0.002

* signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

¹ sV: scheinbare Verdaulichkeit

4.9 Kurzkettige Fettsäuren in den Kotproben

Die Konzentrationen der Essigsäure sowie der Gesamtfettsäuren im Kot waren höher bei den Hunden, die das Kontrollfutter erhielten. Hinsichtlich der absoluten Konzentrationen der übrigen kurzkettigen Fettsäuren fiel auf, dass die Werte der Kontrollgruppe nur numerisch höher waren, als die der Versuchsgruppe (Tab. 63). Beim Vergleich der prozentualen

Verteilung der kurzkettigen Fettsäuren in den Fäzes zwischen den Fütterungsgruppen konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden (Tab. 64).

Tab. 63: Absolute Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ ursprünglicher Substanz) der kurzkettigen Fettsäuren und der Gesamtfettsäuren in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung ($Mw \pm SD$); $n = 12$

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter	<i>P</i> -Wert*
Essigsäure	97,5 \pm 15	77,1 \pm 12	< 0.001
Propionsäure	33,3 \pm 12	27,7 \pm 11	0.233
i-Buttersäure	2,59 \pm 0,8	2,01 \pm 0,8	0.112
n-Buttersäure	24,3 \pm 8,9	22,3 \pm 18	0.739
i-Valeriansäure	4,08 \pm 1,2	3,57 \pm 1,5	0.363
n-Valeriansäure	4,18 \pm 3,7	3,79 \pm 3,2	0.794
Gesamtfettsäuren	166 \pm 24	137 \pm 19	0.002

*signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

Tab. 64: Prozentuale Verteilung (Mol. %) der kurzkettigen Fettsäuren in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung ($Mw \pm SD$); $n = 12$

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter	<i>P</i> -Wert*
Essigsäure	58,9 \pm 5,9	57,1 \pm 9,9	0.595
Propionsäure	19,8 \pm 5,4	20,4 \pm 7,3	0.812
i-Buttersäure	1,55 \pm 0,4	1,48 \pm 0,6	0.763
n-Buttersäure	14,6 \pm 5,2	15,7 \pm 11	0.768
i-Valeriansäure	2,45 \pm 0,5	2,64 \pm 1,0	0.552
n-Valeriansäure	2,69 \pm 2,5	2,67 \pm 2,1	0.985

*signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

4.10 D- und L-Laktat in den Kotproben

Weder die D- noch die L-Laktatkonzentrationen der Fäzes unterschieden sich signifikant zwischen den beiden Fütterungsgruppen. Numerisch höhere Werte erlangten die Tiere, die das Kontrollfutter erhielten (Tab. 65).

Ergebnisse

Tab. 65: D-Laktat- und L-Laktatkonzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ ursprünglicher Substanz) in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung ($Mw \pm SD$); $n = 11$

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter	<i>P</i> -Wert*
D-Laktat	1,01 \pm 0,6	0,89 \pm 0,9 ¹	0.760
L-Laktat	1,45 \pm 1,0	1,01 \pm 1,1	0.383

* signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

¹ $n = 10$

4.11 Ammonium in den Kotproben

Es konnte ein Unterschied zwischen den beiden Fütterungsgruppen hinsichtlich der Ammoniumkonzentration in den Fäzes nachgewiesen werden. Die Kontrollgruppe wies höhere Ammoniumgehalte in den Fäzes auf (Tab. 66).

Tab. 66: Ammoniumkonzentrationen ($\mu\text{mol/g}$ ursprünglicher Substanz) in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung ($Mw \pm SD$); $n = 12$

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter	<i>P</i> -Wert*
Ammonium	37,4 \pm 10	21,7 \pm 5,1	< 0.001

* signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

4.12 Aktivität der Chitinase in den Kotproben

Beim Vergleich der Aktivität der Chitinase in den Fäzes beider Fütterungsgruppen konnte kein Unterschied festgestellt werden (Tab. 67).

Tab. 67: Enzymaktivität (Unit¹) der Chitinase in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung ($Mw \pm SD$); $n = 12$

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter	<i>P</i> -Wert*
Chitinase	0,12 \pm 0,0	0,12 \pm 0,0	0.308

* signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

¹ 1 U entspricht einer Freisetzung von 1 mg N-Acetyl-D-Glucosamin des Chitins in einer Stunde bei einem zwei Stunden Test

4.13 Chitingehalt in Futter- und Kotproben

Die Chitinkonzentration (in g/kg TS) im Kot der Hunde (Tab. 69) unterscheidet sich zwischen den beiden Fütterungsgruppen. Die Chitinkonzentration im Kot der Versuchsgruppe war deutlich höher als in der Kontrollgruppe. In Tab. 68 ist die Chitinkonzentration (in g/kg TS) im Kontroll- und Versuchsfutter dargestellt.

Tab. 68: Chitinkonzentration (in g/kg TS) im Kontroll- und Versuchsfutter

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter
Chitinkonzentration	4,09	17,2

Tab. 69: Chitinkonzentration (in g/kg TS) in den Kotproben der Hunde nach Kontroll- und Versuchsfütterung (Mw ± SD); n = 12

Parameter	Kontrollfutter	Versuchsfutter	<i>P</i> -Wert*
Chitinkonzentration	2,90 ± 0,4	92,2 ± 16	< 0.001

* signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen

5 Diskussion

5.1 Versuchsdesign

Bei dem Versuchsdesign handelte es sich um ein Cross-Over-Design. Die Art des Studiendesigns ermöglichte die Gegenüberstellung von zwei Diäten, wobei jahreszeitliche bzw. meteorologische Einflüsse als Einflussfaktoren ausgeschlossen werden können.

5.2 Versuchstiere und Versuchsfutter

Die Analysewerte entsprachen nicht vollständig der vorab errechneten Zusammensetzung. Damit war die Ausgangssituation für die Untersuchungen nicht optimal. Besonders die Rohfaser-, Rohasche-, Kalzium- und Phosphorgehalte der Rationen unterscheiden sich sehr. Damit ist z. B. die Bewertung der scheinbaren Verdaulichkeit dieser Parameter nur bedingt aussagekräftig. Generell wäre es optimal, wenn sich die Werte der Rohnährstoffe und Mengen- und Spurenelemente ähneln würden.

Die Versuchstiere waren alle ähnlich alt und die Verteilung der Geschlechter war ausgeglichen (6 weibliche Tiere und 6 männliche Tiere). Alle Tiere waren während des gesamten Versuchszeitraums gesund und zeigten keine Einschränkungen im Allgemeinbefinden. Demnach ist keine vorhersehbare Beeinflussung durch ein Versuchstier zu erwarten gewesen.

5.3 Kotkonsistenz und tägliche Kotmenge

Die tägliche Kotmenge unterschied sich nicht zwischen den beiden Diätvarianten. In der Studie von Newton et al. (1977) hatten Schweine, die eine Diät mit einem Anteil von 33 % *Hermetia illucens* Larvenmehl erhielten, eine geringere tägliche Kotmenge als Tiere, die eine Diät mit Sojaextraktionsschrot erhielten. Dadurch, dass es über den gesamten Versuchszeitraum zu Koprophagie bei 8 von 12 Hunden kam, ist es möglich, dass es zu Verfälschungen der Ergebnisse der täglichen Kotmenge gekommen ist.

Aufgrund der Koprophagie mussten die Kotproben während der Einzelhaltung so schnell wie möglich gesammelt werden. Dadurch, dass mehrere Personen den Kot sammelten und die Kotkonsistenz einschätzten, ist es möglich, dass es zu individuellen Einschätzungen trotz des vorgegebenen Bewertungsschemas kam. Die Kotkonsistenz zwischen den beiden Fütterungsgruppen unterschied sich ($P=0.044$). Der Kot der Hunde, die das Larvenmehl als

tierische Proteinquelle in ihrem Futter aufnehmen, war etwas weicher (Score: 2,25), als bei Verwendung von Lammmehl (Score: 2,04). Obwohl es sich um einen statistisch signifikanten Unterschied handelt, waren die Unterschiede der beiden Fütterungsvarianten allenfalls marginal. Dieses konnte durch die Bestimmung der Trockensubstanz des Kotes bestätigt werden, da sich dieser Wert zwischen den Fütterungsgruppen nicht statistisch unterschied.

5.4 Blutbild und Differentialblutbild

Um den Gesundheitszustand der Hunde während des Versuches zu erfassen, wurde ein Blutbild inklusive Differentialblutbild angefertigt. Betrachtet man die Ergebnisse, sind keine fütterungsbedingten Unterschiede zwischen beiden Diäten zu verzeichnen und alle Werte liegen im Referenzbereich. Swanson et al. (2004) verfütterten eine auf pflanzlichen und eine auf tierischen Komponenten basierte Diät über einen Zeitraum von 12 Monaten und verglichen diese miteinander. Es wurde auch in dieser Studie kein fütterungsbedingter Unterschied zwischen den Erythrozyten, dem Hämatokrit und dem Hämoglobin beobachtet.

5.5 Lymphozytenphänotypisierung

Die Anzahl der einzelnen T-Lymphozyten Untergruppen und der B-Lymphozyten wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Bokemeyer (2003) fasste in seiner Dissertation die Ergebnisse von Normalwerten von Lymphozytenuntergruppen (Tab. 70) zusammen. Ob unterschiedliche Isolationstechniken der Lymphozyten (Dichtegradientenseparation oder direkte Vollblutlyse) Einfluss auf die Ergebnisse und ihre Vergleichbarkeit nehmen, wird diskutiert und findet kein einheitliches Ergebnis (Dean et al., 1991; Faldyna et al., 2001).

Tab. 70: Prozentualer Anteil der Lymphozytenuntergruppen (Mw \pm SD) (Bokemeyer, 2003)

Autoren	CD4 ⁺	CD5 ⁺	CD8 ⁺	CD21 ⁺	MHC II ⁺
Dirscherl et al. (1995)	40,0 \pm 7,5	71,0 \pm 10,4	19,0 \pm 3,6	-	97,0 \pm 2,9
Chabanne et al. (1995)	47,5 \pm 8,8	82,5 \pm 4,8	19,3 \pm 4,0	12,2 \pm 6,0	-
Byrne et al. (2000)	45,0 \pm 8,3	83,3 \pm 3,5	28,8 \pm 5,6	12,9 \pm 3,9	-

Die CD3⁺-T-Zellen wurden von Byrne et al. (2000) bei jungen und älteren Hunden bestimmt. Die Werte (in %) von jungen Hunden mit 79,5 \pm 2,5 und älteren Hunden mit 79,5 \pm 1,5 sind

annähernd gleich. Genauso verhält es sich mit den MHC II⁺-antigenpräsentierenden Zellen (junge Hunde: 97,2 ± 1,7; ältere Hunde: 98,3 ± 0,8).

Es konnten Altersunterschiede (CD8⁺- und CD21⁺-Lymphozyten), Rasse- und Geschlechtsunterschiede (Bokemeyer, 2003; Byrne et al., 2000; Faldyna et al., 2001; Greeley et al., 1996), aber keine Fütterungsunterschiede bei der Lymphozytenphänotypisierung belegt werden. Richter et al. (1991) untersuchten die Phänotypen der Lymphozyten bei Sportlern, die entweder eine fleisch- oder pflanzenbasierte Diät bekamen. Es wurden keine prozentualen Unterschiede im Vergleich beider Diätphasen bei den CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen verzeichnet. Auch Zinn et al. (2009) konnten keine Unterschiede der Lymphozytenphänotypen bei Gabe von unterschiedlichen Diäten feststellen. Sie verfütterten Hunden als Proteinquellen Geflügelnebenprodukte und drei verschiedene Fischprodukte.

Bokemeyer (2003) belegte Streuungen der Ergebnisse zwischen Einzeltieren in einer Gruppe von erkrankten und gesunden Hunden. Durch die großen Schwankungen zwischen den Einzeltieren in einer Gruppe ist eine Ergebnisbeurteilung besonders schwierig. Nur die Gruppe der Beagle zeigte relativ homogene Ergebnisse (Tab. 71).

Tab. 71: Prozentualer Anteil der Lymphozyten bei der Rasse Beagle (Mw ± SD)

Autor	Alter	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD5 ⁺	CD8 ⁺	CD21 ⁺
Bokemeyer (2003)	adult	-	42,39 ± 6,74	81,41 ± 4,35	31,92 ± 6,88	6,96 ± 1,20
Faldyna et al. (2001)	1-2 Jahre	81,7 ± 5,8	45,9 ± 7,4	-	18,9 ± 3,3	14,8 ± 4,0
Faldyna et al. (2001)	3-5 Jahre	83,7 ± 5,5	45,5 ± 7,5	-	17,5 ± 5,8	11,4 ± 3,8

Betrachtet man nun die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, sind keine fütterungsbedingten Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen zu verzeichnen. Im Vergleich zur Literatur liegen die Werte dieser Studie der MHC II⁺-, CD4⁺-, CD5⁺-, CD3⁺-T-Zellen im Bereich der beschriebenen Ergebnisse. Die Werte der CD8⁺-Zellen sind mit 18,7 % in der Versuchsgruppe und 19,9 % in der Kontrollgruppe zwar niedriger als in der Literatur von Bokemeyer (2003) beschrieben, aber ähnlich zu den Werten aus Tab. 71, sie steigen im Laufe des Lebens an (Faldyna et al., 2001). Bei den zitierten Publikationen in Tab. 70 und 71 handelt es sich um die Untersuchung der CD8^α Lymphozyten. Dadurch ist ein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Studie nicht möglich, da CD8^β Lymphozyten analysiert wurden. Die CD21⁺- Zellen liegen mit 22,2 % in der Versuchsgruppe und 21,4 % in der Kontrollgruppe über den beschriebenen Werten der Literatur. Die CD21⁺ Antigene werden größtenteils auf

reifen B-Zellen exprimiert (Bokemeyer, 2003). Junge Hunde im Durchschnittsalter von 2 Jahren zeigen in der Studie von Byrne et al. (2000) höhere Gehalte (22,7 %) an. Diese werden mit steigendem Alter niedriger (Faldyna et al., 2001). Das Durchschnittsalter der Hunde in der aktuellen Studie betrug 2,75 Jahre. Das Alter der Versuchshunde und die Beobachtung, dass Beagles oft höhere Lymphozytenwerte im Gegensatz zu anderen Rassen zeigen (Faldyna et al., 2001), erklären möglicherweise die höheren Werte der CD21⁺-Lymphozyten.

5.6 Mitogeninduzierter Lymphozytenproliferationstest

Der mitogeninduzierte Lymphozytenproliferationstest, im Speziellen die Stimulation durch Con A, dient der Positivkontrolle für den futtermittelinduzierten Lymphozytenproliferationstest. Dabei wird untersucht, ob es möglich ist, Lymphozyten *in vitro* durch Mitogene zu proliferieren (Kawano et al., 2013). PHA stimuliert T- und B-Lymphozyten, PWM nur die B-Zellen und Con A ausschließlich T-Zellen (Krakowka and Ringler, 1986).

Da die Ergebnisse des Proliferationstests durch das Mitogen Con A nicht auswertbar waren, konnte keine Positivkontrolle zum futtermittelantigeninduzierten Lymphozytenproliferationstest vorgenommen werden. Die Stimulation der Lymphozyten durch die Mitogene PHA und PWM wurde im aktuellen Versuch nicht durch die unterschiedliche Fütterung beeinflusst. Die Stimulationsindices sind zwar, bezogen auf die absoluten Werte, bei den Hunden, die das Versuchsfutter bekamen, höher, aber diese Unterschiede sind nicht statistisch signifikant. Generell gibt es bei Hunden wenige Studien in der Literatur zu der Stimulationsfähigkeit der Lymphozyten durch Mitogene in Abhängigkeit von Ernährungsfaktoren. Kearns et al. (1999) fanden aber heraus, dass es durch die Veränderung des n-3 zu n-6 Fettsäuren-Verhältnisses im Futter von jungen Hunden zu einer höheren Stimulation der Lymphozyten durch Mitogene kommen kann. Zusätzlich wurde die Stimulationsfähigkeit durch die Mitogene auch vom Alter der Tiere und von der Rasse beeinflusst. Auch Greeley et al. (1996) untersuchten den Einfluss des Alters auf die Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten durch Mitogene. Ältere Hunde zeigten in dieser Studie (im Mittel 9,1 Jahre) eine deutlich schwächere Stimulation der Lymphozyten nach Mitogenzugabe. Da sich das Alter der Hunde dieses Versuches nicht deutlich unterschied und keines der Tiere über 6 Jahre alt war, kann ein Alterseinfluss mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

5.7 Futtermittelinduzierter Lymphozytenproliferationstest

Der „Goldstandard“, um eine Futtermittelallergie festzustellen, ist die Eliminationsdiät mit nachfolgender Provokation. Der futtermittelinduzierte Lymphozytenproliferationstest zeigt eine hohe Korrelation zur Referenzmethode, da sich bei Hunden die positiven Ergebnisse eines futtermittelinduzierten Lymphozytenproliferationstests auf ein Allergen zu 82 % mit positiven Ergebnissen einer Eliminationsdiät mit nachfolgender Provokation deckten (Ishida et al., 2004). Auch in der Humanmedizin wird der futtermittelinduzierte Lymphozytenproliferationstest eingesetzt, um eine Allergie zu diagnostizieren (Kondo et al., 1990).

Reagiert der futtermittelinduzierte Lymphozytenproliferationstest positiv, ist davon auszugehen, dass ein Allergietyp IV, nicht IgE-vermittelt, durch Futtermittelallergene provoziert wurde (Fujimura et al., 2011). Ishida et al. (2004) und Masuda et al. (2002) werteten einen Stimulationsindex von ≥ 2 als positive Reaktion auf ein Futtermittelallergen.

Die Stimulationsindices blieben unter dem Wert 2 bis zur Antigenkonzentration 125 $\mu\text{g/ml}$. In beiden Versuchsgruppen wurden bei einer Antigenkonzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ und 500 $\mu\text{g/ml}$ Werte über 2 festgestellt. Diskussionswürdig ist in diesem Zusammenhang warum die Hunde, welche das Lammprotein bekamen, auf das *Hermetia illucens* Protein reagierten, obwohl sie noch keinen Kontakt mit diesem Antigen hatten. Bei einer immunologischen Reaktion sollte es nötig sein, dass eine vorherige Sensibilisierung durch das Antigen stattgefunden hat. Daher müssen in diesem Zusammenhang mögliche Kreuzreaktionen oder auch unspezifische Stimulationseffekte mit berücksichtigt werden.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, fanden sich auch ohne BrdU-Zusatz und auch beim Auslassen des Schrittes der Zugabe des Anti-BrdU-Antikörpers Stimulationsindices bei einer Antigenkonzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ und 500 $\mu\text{g/ml}$ von über 2. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass nicht vitale Zellen an den Anti-BrdU-Antikörper gebunden haben bzw. dass eine verstärkte Autofluoreszenz von nicht vitalen Zellen ausging und diese daraufhin durchflusszytometrisch gemessen wurden.

5.8 Scheinbare Gesamtverdaulichkeit der beiden Futtermittel

Aktuell gibt es keine publizierten Fütterungsversuche mit der Proteinquelle *Hermetia illucens* bei Hunden. Newton et al. (1977) untersuchten eine Diät mit einem Anteil von 33 % *Hermetia illucens* in Hinblick auf die scheinbare Verdaulichkeit bei Schweinen. Die Ergebnisse dieser

Studie zu der scheinbaren Verdaulichkeit der Rohasche (45,2 %), des Rohfettes (83,6 %) und der Rohfaser (53,8 %) differieren zu den berechneten scheinbaren Gesamtverdaulichkeiten dieses Versuches mit Hunden, was durch speziesspezifische Unterschiede und die Art der Rationsgestaltung zu erklären ist. Die *in vitro* Verdaulichkeit der organischen Substanz der Larve von *Hermetia illucens* wies in einer Studie von Bosch et al. (2014) ähnliche Werte auf (84,3 %), wie die scheinbare Gesamtverdaulichkeit der organischen Substanz des Versuchsfutters des aktuellen Versuches.

Khempaka et al. (2011) bewerteten den Einfluss von Chitin in unterschiedlichen Konzentrationen in Hinblick auf unterschiedliche Parameter in der Geflügelernährung bei 35 Tage alten Broilern. Ein Gehalt von 15 % Garnelenmehl bzw. 2,8 % Chitin hatte keinen negativen Einfluss auf das Wachstum oder die Verdaulichkeit einzelner Roh Nährstoffe im Vergleich zu einer mit Kontrollfutter ernährten Gruppe.

Mehrere Autoren nutzten andere alternative Proteinquellen in der Hundefütterung und verglichen diese mit häufig genutzten Proteinquellen (Tab. 72).

Diskussion

Tab. 72: Vergleich der scheinbaren Gesamtverdaulichkeiten verschiedener Proteinquellen in der Hundefütterung

	Proteinquelle	Rohproteingehalt im Futter (% der TS ¹)	Trockensubstanz	Organische	Rohprotein	Rohfett	Rohfaser
				Substanz			
Scheinbare Gesamtverdaulichkeit in %							
Huber et al. (1994)	Fleisch- und Knochenmehl	20,4	79,9	-	78,6	89,2	24,7
	Sojaextraktionsschrot	20,9	76,7	-	79,9	92,2	12,2
Clapper et al. (2001)	Sojaextraktionsschrot	31,9	81,8	81,7	83,9	92,5	-
	Geflügelmehl	30,5	81,9	84,7	76,9	92,9	-
Bednar et al. (2000)	Fleisch- und Knochenmehl	24,5	78,6	86,5	82,4	90,1	-
	Geflügelnebenprodukte	24,4	83,0	87,0	81,6	90,5	-
	Geflügelmehl	26,9	84,5	88,8	87,5	91,9	-
	Sojaextraktionsschrot	25,5	78,3	82,7	82,7	88,4	-
Forster et al. (2012)	Bohnen	29,9	68,6	77,6	78,2	94,5	-
	Fleisch- und Knochenmehl	31,2	68,9	74,9	79,5	93,9	-
Faber et al. (2010)	Rindfleisch	30,7	92,4	94,5	94,4	97,4	-
	Schweinefleisch	31,2	92,3	94,5	94,7	97,5	-
	Hühnchenfleisch	30,0	92,6	94,7	94,7	97,4	-
	Seelachs	32,0	92,5	94,6	94,8	97,5	-
	Lachs	30,8	92,7	94,7	94,7	97,5	-
Verlinden et al. (2006a)	Ente	14,4	90,7	-	83,4	96,1	-

Diskussion

Zentek and Mischke (1997)	Sojaproteinisolat	19,7	84,8	-	89,0	93,5	25,0
	Kasein	20,1	84,0	-	89,6	94,0	18,9
	<i>Hermetia illucens</i>						
Versuch	Larven	26,0	83,2	86,9	77,3	97,1	7,73
	Lamm	26,9	81,8	86,7	79,2	97,3	11,2

¹ TS: Trockensubstanz

Im Vergleich der scheinbaren Verdaulichkeit von Rohfett des Versuchsfutters mit der Verdaulichkeit der anderen Studien erreichte dieser Parameter einen hohen Wert. Die Verdaulichkeit der organischen Substanz lag mit 86,9 % im mittleren Bereich und ist vergleichbar mit der Verdaulichkeit der organischen Substanz einer Diät mit Fleisch- und Knochenmehl aus der Studie von Bednar et al. (2000).

Die Verdaulichkeit des Rohproteins des Versuchsfutters dieser Studie erreicht den niedrigsten Wert beim Vergleich der Verdaulichkeitswerte des Rohproteins in Tab. 72. Generell ist die Proteinqualität niedriger, wenn die scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins geringer ausfällt (Murray et al., 1997). Vier von den dargestellten Studien nutzen nur eine Proteinquelle in ihrer Fütterung (Bednar et al., 2000; Clapper et al., 2001; Faber et al., 2010; Zentek and Mischke, 1997). Da in den übrigen Studien und im Versuchs- und Kontrollfutter des aktuellen Versuches noch weitere Proteinquellen hinzugegeben wurden, kann die scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins nicht nur auf die angegebene Hauptproteinquelle bezogen werden und ist somit nur eingeschränkt aussagefähig.

Da bei der aktuellen Studie insgesamt 12 gesunde Tiere ähnlichen Alters beteiligt waren, können Beeinflussungen der Verdaulichkeit durch das Tier weitgehend ausgeschlossen werden. Die Rohnährstoffe der einzelnen Futtermittel können aber eine Rolle spielen. Je höher der Rohfasergehalt der Ration ist, desto geringer wird die scheinbare Verdaulichkeit der organischen Substanz. Auch die Art der pflanzlichen Zellwandbestandteile ist entscheidend (Kamphues et al., 2014). Die Rohfaseranteile der unterschiedlichen Futtermittel aus Tab. 72 waren, bis auf die Studie von Faber et al. (2010), höher als in der Ration des Versuchsfutters. Zudem wurden unterschiedliche Methoden für die Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit gewählt. Die scheinbare Verdaulichkeit wurde entweder mittels unverdaulichem Marker oder über die Gesamtkotmenge bestimmt. Deswegen ist der Vergleich der scheinbaren Verdaulichkeiten in Tab. 72 nur beschränkt aussagefähig.

Im Vergleich mit dem Kontrollfutter mit Lamm als Proteinquelle hatte das Versuchsfutter eine höhere scheinbare Verdaulichkeit der organischen Substanz, der Trockensubstanz und der Rohasche. Demgegenüber waren die scheinbaren Verdaulichkeiten der Rohfaser, des Rohfettes und des Rohproteins bei Gabe der Kontrolldiät höher. In den beiden Futtermitteln waren noch andere Proteinquellen (Tab. 11) enthalten, sodass die scheinbaren Verdaulichkeiten nicht nur auf die Hauptproteinquellen bezogen werden können. Außerdem sind die Rohfaser- und Rohaschewerte beider Futtermittel unterschiedlich, sodass die scheinbare Verdaulichkeit dieser Rohnährstoffe nur sehr eingeschränkt vergleichbar ist.

Die scheinbaren Verdaulichkeiten der Mengenelemente Kalzium, Phosphor, Kalium, Magnesium und Natrium und des Spurenelements Zink sind zwischen beiden Futtermitteln des Versuches unterschiedlich. Eine mögliche Erklärung wären die unterschiedlichen Gesamtanteile im Kontroll- und Versuchsfutter. Weiterhin ist es möglich, dass es aufgrund eines höheren Rohfasergehaltes in der Ration zu erniedrigten Verdaulichkeiten von Rohnährstoffen, Spuren- und Mengenelementen kommen kann.

5.9 Bakterielle Metaboliten in den Kotproben

Zwischen den Fütterungsgruppen gab es bei den Kotkonzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren und bei den Ammoniumgehalten einige Unterschiede. Betrachtet man die in der vorliegenden Studie gemessenen Laktatgehalte im Kot der Versuchstiere, zeigte sich kein fütterungsbedingter Einfluss.

5.9.1 Kurzkettige Fettsäuren in den Kotproben

Die kurzkettigen Fettsäuren sind im Wesentlichen Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels von Kohlenhydraten durch die Mikrobiota (Louis et al., 2007), allerdings können auch unverdaute Proteinanteile durch die Mikrobiota zu kurzkettigen Fettsäuren metabolisiert werden (Macfarlane and Macfarlane, 2003). Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure stellen den Hauptteil der kurzkettigen Fettsäuren dar (Cummings et al., 1987). Die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren wird durch Substratverfügbarkeit, Passagezeit, Mikrobiota, Aktivität, Stress, Alter, Medikamente und Erkrankungen beeinflusst. Komplexe Kohlenhydrate stellen den Hauptteil der Ausgangsstoffe der mikrobiellen Verstoffwechslung dar. Aber auch Proteine, die nicht im Dünndarm verdaut wurden, eventuell bedingt durch kurze Durchgangszeiten des Chymus oder geringere Proteinqualität, gelangen in den Dickdarm und werden von proteolytisch wirkenden Bakterien genutzt (Macfarlane and Macfarlane, 2003). Die im Dickdarm hauptsächlich mikrobiell fermentierten Kohlenhydrate sind Zellwandbestandteile pflanzlichen Ursprungs, die durch körpereigene Enzyme nicht abbaubar sind und Kohlenhydrate mit β -glycosidischen Verbindungen, wie Cellulose und Nicht-Cellulose-Polysaccharide, umfassen. Kohlenhydrate mit α -glycosidischen Verbindungen, wie Stärke, werden im Dickdarm nur in größerem Umfang mikrobiell fermentiert, wenn die Kapazität der kohlenhydratspaltenden Enzyme im Dünndarm überschritten ist (Bednar et al., 2011).

Duncan et al. (2007) untersuchten Zusammenhänge zwischen Diäten mit unterschiedlichen Kohlenhydratanteilen bei Menschen und den damit verbundenen Veränderungen in der

Zusammensetzung der kurzkettigen Fettsäuren in den Fäzes. Durch einen geringeren Kohlenhydratanteil in der Ration wurde der Gehalt der kurzkettigen Fettsäuren in den Fäzes der Probanden reduziert.

Auch die Proteinquelle kann die Gesamtfettsäurenkonzentration beeinflussen. Bosch et al. (2013) fütterten unter anderem drei unterschiedliche Proteinquellen (Sojaextraktionsschrot, Geflügelfleischmehl und Federmehl) an Hunde und untersuchten die Gesamtfettsäurenkonzentration. Die Konzentrationen im Kot der Hunde, die das Sojaextraktionsschrot bekamen, waren am höchsten. Die niedrigsten Konzentrationen der Fettsäuren wurden bei den Hunden gemessen, die das Federmehl bekamen. Der Rohproteingehalt von Sojaextraktionsschrot war am niedrigsten, der des Federmehls am höchsten. Der Fasergehalt dieser Rationen kann aufgrund nicht durchgeführter Untersuchungen nicht verglichen werden.

In einer weiteren Studie war der Gesamtgehalt der kurzkettigen Fettsäuren und der Essigsäure- und Propionsäureanteil im Kot nach der Fütterung der Rationen, die Sojaextraktionsschrot in einer Konzentration von 12 %, 24 % und 48 % enthielten, höher, als nach der Fütterung der Ration, die Geflügelnebenprodukte als Hauptproteinquelle beinhaltete. Der Faseranteil war in der Ration mit Geflügelnebenprodukten am niedrigsten. Im Gegensatz dazu war der Buttersäuregehalt im Kot der Hunde, die Geflügelnebenprodukte als Hauptproteinquelle erhielten, höher, als im Kot der Hunde, die Sojaextraktionsschrot erhielten (Beloshapka et al., 2016).

Trotz des höheren Rohfasergehaltes des Versuchsfutters mit *Hermetia illucens* in der vorliegenden Arbeit, konnten keine höheren Gehalte der kurzkettigen Fettsäuren im Kot der Hunde beobachtet werden, die dieses Futter erhielten.

Die Faserquelle nimmt zudem auch entscheidenden Einfluss auf den Gehalt der Fettsäuren im Kot (Wambacq et al., 2016). In der Studie von Wambacq et al. (2016) wurden zwei Diäten mit unterschiedlichen Faserquellen, aber ähnlichen Rohprotein-, Rohfaser- und Gesamtfasergehalten in Hinblick auf den Gehalt der kurzkettigen Fettsäuren im Kot von Hunden untersucht. Eine Diät enthielt Zuckerrüben und Guar und die zweite Diät enthielt Zellulose. Der Anteil der kurzkettigen Fettsäuren im Kot der Hunde, die die Diät mit Zellulose erhielten, war niedriger im Vergleich zu der Diät mit den anderen Faserquellen. Auch die Gehalte von Essig- und Propionsäure unterschieden sich signifikant. Die Diät mit Zellulose erzielte niedrigere Gehalte im Kot der Hunde. Der Gehalt der Butter- und Valeriansäure im Kot der Hunde unterschied sich nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Analysen der Rohfaserquellen in dem Versuchs- und Kontrollfutter durchgeführt, sodass eine mögliche Beeinflussung der kurzkettigen Fettsäuren im Kot durch verschiedene Faserquellen nicht geklärt werden kann.

Generell ist an den Ergebnissen der kurzkettigen Fettsäuren zu erkennen, dass es nach der Fütterung mit dem Kontrollfutter im Dickdarm der Hunde zu einer stärkeren Fermentation kam. Die prozentualen Verteilungen der kurzkettigen Fettsäuren, bezogen auf den Anteil der Gesamtfettsäuren, sind aber mit anderen Studien vergleichbar (Middelbos et al., 2007; Sunvold et al., 1995).

5.9.2 Ammonium in den Kotproben

Gelangen vermehrt Proteine in den Dickdarm, entstehen durch mikrobielle Fermentationsprozesse Endprodukte wie z. B. Ammoniak bzw. Ammonium (Meyer and Zentek, 2013). Bei einem pH Wert von 7 liegt Ammoniak zu einem Prozentsatz von 99,4 % als Ammonium vor. Nery et al. (2012) untersuchten den Zusammenhang zwischen Proteinquellen bzw. Proteinkonzentrationen in Diäten und Fermentationsprozessen im Dickdarm von Hunden. Die Ammoniumkonzentrationen im Kot der Hunde, die mit hohen Proteinkonzentrationen, unabhängig von der Proteinquelle, gefüttert wurden, waren höher, als bei Hunden, die eine proteinärmere Diät erhielten. Außerdem erhöhte sich die Ammoniumkonzentration im Kot bei der Fütterung von Geflügelmehl im Vergleich mit Weizenkleber. Auch Lupton und Marchant (1988) und Pinna et al. (2016) kamen zu dem Ergebnis, dass höhere Proteinkonzentrationen im Futter, im Vergleich zu proteinärmeren Rationen, zu höheren Ammoniumgehalten im Kot führten. In einer Studie von Tortola et al. (2012) war der Ammoniumgehalt im Kot der Hunde signifikant niedriger, die Sojaextraktionsschrot als Hauptproteinquelle erhielten. Die Kontrolldiät enthielt Geflügelnebenprodukte als Proteinquelle. Demnach können verschiedene Proteinquellen und ihre Konzentrationen einen Einfluss auf die Ammoniumkonzentration haben. Auch Beloshapka et al. (2016) beobachteten abnehmende Ammoniumkonzentration im Kot der Hunde bei zunehmenden Sojaextraktionsschrotgehalten im Futter. Der höchste Ammoniumgehalt im Kot wurde bei den Hunden erzielt, die als Hauptproteinquelle Geflügelnebenprodukte in ihrer Ration erhielten. Sie bekamen kein Sojaextraktionsschrot. Der Rohproteingehalt der Rationen in der Studie war ähnlich. Die scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins erreichte höhere Werte bei der Fütterung mit Sojaextraktionsschrot als Hauptproteinquelle im Vergleich zur Kontrolldiät, die Geflügelnebenprodukte als Hauptproteinquelle enthielt. Schlussfolgernd nehmen die Autoren der Studie an, dass der Ammoniumgehalt im Kot der Hunde höher war, je niedriger die Rohproteinverdaulichkeit der Ration war. Da die Rohproteinverdaulichkeit der vorliegenden Arbeit höhere Werte nach Kontrollfutterfütterung erzielte, aber auch die Ammoniumkonzentration im Kot nach der Fütterung des Kontrollfutters höher war, kann diese Annahme nicht bestätigt werden. Da sich die Proteinkonzentrationen nur unwesentlich zwischen den Futtermitteln dieser Arbeit

unterschieden, ist es wahrscheinlich, dass die Proteinquellen der Futtermittel im Versuch Einfluss auf den Ammoniumgehalt im Kot genommen haben.

Der Ammoniumgehalt im Kot reflektiert die Ammoniumproduktion nicht exakt wieder. Die Ammoniumkonzentration bzw. Ammoniakabsorption hängt vom pH-Wert im Darm ab. Außerdem ist die Geschwindigkeit der Produktion von Ammonium und damit die Konzentration im Kot auch von der Mikrobiota des Dickdarms und der verfügbaren Energie abhängig (Hesta et al., 2003).

5.10 Chitinaseaktivität in den Kotproben

Die Fragestellung, ob Hunde das Enzym Chitinase ausbilden und ob die Aktivität durch die Chitinzufuhr erhöht ist, sollte durch die Untersuchung der Chitinaseaktivität geklärt werden.

Schon Lundblad et al. (1974) wiesen Chitinaseaktivität im Serum von Ziege, Kuh, Huhn, Schaf und Schwein nach. Es konnte keine Chitinase im Serum von Menschen, Affen, Pferd, Katze, Hund, Kaninchen, Hamster oder Meerschweinchen nachgewiesen werden.

Diese Chitinase wurde später von Hollak et al. (1994) in Makrophagen bei Menschen nachgewiesen. Aber auch in neutrophilen Granulozyten wird Chitinase synthetisiert und in zytoplasmatischen Granula gespeichert (Boot et al., 1995; Boussac and Garin, 2000). Diese Chitinase spielt unter anderem bei der Abwehr von chitinhaltigen Bakterien eine Rolle (Suzuki et al., 2002).

Chitinolytische Enzyme im Verdauungstrakt können einerseits durch das Tier selbst gebildet werden, andererseits aus dem Futter stammen oder von der Mikrobiota synthetisiert werden (Simunek et al., 2001).

Die Chitinase, die vom Tier selbst im Gastrointestinaltrakt exprimiert wird und zur Verwertung von chitinhaltiger Nahrung beiträgt, wird auch als acidic mammalian chitinase (AMCase) bezeichnet. Nachgewiesen wurde dieses Enzym beim Menschen, der Maus, beim Huhn und der Kuh (Boot et al., 2001; Suzuki et al., 2002). Die AMCase wird bei Säugetieren und Vögeln entweder in den Speicheldrüsen, im Magen oder in der Leber produziert (Suzuki et al., 2002). Bei der Kuh wird die AMCase ausschließlich in den Hepatozyten produziert (Suzuki et al., 2002).

In einer Studie von Koh and Iwamae (2013) wurde die Aktivität von den in der Schleimhaut des Drüsenmagens und in den verschiedenen Dünndarmabschnitten vorkommenden Enzymen Chitinase und N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase nach Fütterung eines chitinhaltigen Futters und eines Kontrollfutters geprüft. Beide Enzyme wurden beim Huhn nachgewiesen. Der höchste Enzymgehalt wurde im Drüsenmagen gefunden. Das Enzym Chitinase war in

höheren Konzentrationen als die N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase im Drüsenmagen zu finden. Die Enzymgehalte in den Dünndarmabschnitten waren laut Autoren vernachlässigbar. Der Enzymgehalt stieg durch das chitinreiche Futter nicht an.

Auch im Plasma, Blut, Magen und Darm von Fischen wurden Chitinaseaktivitäten gemessen (Fänge et al., 1976; Fänge et al., 1979; Fines and Holt, 2010; Lindsay, 1984).

Das Ziel dieser Untersuchung war es, herauszufinden, ob Hunde das Enzym Chitinase im Gastrointestinaltrakt bilden und ob das Enzym durch chitinhaltiges Futter vermehrt gebildet wird. Chitinaseaktivitäten von 0,12 Einheiten wurden im Kot der Kontrollgruppe gemessen. Die Ergebnisse sind somit ein Beleg dafür, dass eine Chitinaseaktivität im Verdauungstrakt von Hunden vorkommt, diese aber durch chitinhaltiges Futter nicht vermehrt gebildet wird, da auch in der Versuchsgruppe eine ähnliche Aktivität gemessen wurde. Damit kam es durch das chitinhaltige Versuchsfutter zu keiner Förderung der bakteriellen Chitinaseaktivität.

Weitere Untersuchungen könnten klären, ob eine Chitinase konstitutiv im Magen-Darm-Trakt bei Hunden vorkommt. Dadurch, dass die Chitinase im Kot der Hunde bestimmt wurde, ist es zudem auch möglich, dass der tatsächliche Anteil der Chitinase nicht mehr im Kot nachweisbar war, wenn eine mögliche Chitinaseproduktion im Magen oder im Dünndarm stattfand und das Enzym möglicherweise im Laufe der Dickdarmpassage degradiert werden würde.

Warum sich nach der Fütterung mit dem Kontrollfutter eine Chitinaseaktivität messen lies, ist nur begrenzt zu beantworten. Es könnten chitinhaltige Futterbestandteile sein, die in das Kontrollfutter gelangt sind. Alternativ könnte eine Chitinaseaktivität im Magen-Darm-Trakt von Hunden vorkommen. Weitere Untersuchungen mit verschiedenen Futtermitteln wären für die Beantwortung nötig.

5.11 Chitingehalt in Futter- und Kotproben

Es gibt Untersuchungen, in denen der Chitingehalt in Insekten durch gravimetrische Verfahren gemessen wurde (Lovell et al., 1968). Da der Chitingehalt im Kot und im Futter im Gegensatz zu dem Chitingehalt in Insekten sehr niedrig ist, wurde für die vorliegende Studie eine neue Methode mittels Ionenchromatografie evaluiert.

Aufgeschlossen wurden die Proben, leicht modifiziert, wie von Black and Schwartz (1950) und Kaya et al. (2014) beschrieben. Chitin ist ein Polysaccharid, das aus N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten aufgebaut ist. Das durch die Hydrolyse entstandene Glucosamin steht damit im Zusammenhang zum Chitingehalt in den Proben.

Rahman and Koh (2016) setzten Garnelenmehl in unterschiedlichen Konzentrationen (5 %, 10 % und 15 %) in einer Broilerdiät ein. Das Garnelenmehl hatte einen Chitingehalt von 17,3 % in der TS. Die Verdaulichkeit des Chitins reichte von 19,3 % (Ration mit 15 % Garnelenmehl) zu 29,3 % (Ration mit 5 % Garnelenmehl). Je mehr Chitin sich in der Ration befand, desto geringer war die Verdaulichkeit von Chitin.

In der vorliegenden Studie bleibt fraglich, warum Glucosamin im Kontrollfutter und im Kot der Hunde, die das Kontrollfutter bekamen, gemessen wurde. Es ist wahrscheinlich, dass das Kontrollfutter N-Acetyl-D-Glucosamin in Form von anderen Polysacchariden und nicht in Form von Chitin enthält. N-Acetyl-D-Glucosamin ist Bestandteil einiger Glykosaminoglykane wie z. B. Hyaluronsäure, Heparansulfat und Keratansulfat. Diese Glykosaminoglykane finden sich unter anderem in Synovialflüssigkeit, Blutgefäßen, Knorpeln, Kornea oder im Nucleus pulposus (Thonar et al., 1985). Der Nachweis von Glucosamin nach Kontrollfutterfütterung kann vermutlich dadurch erklärt werden, dass es sich dann nicht um Chitin gehandelt hat, sondern um andere Polysaccharide, die N-Acetyl-D-Glucosamin enthielten.

5.12 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand verschiedener Methoden die Verwendbarkeit eines Larvenmehls von *Hermetia illucens* in einem Alleinfutter für Hunde untersucht.

Die Ergebnisse belegten eine ähnlich hohe scheinbare Verdaulichkeit der Rohnährstoffe im Vergleich zu einem kommerziellen Alleinfutter mit Lamm als Hauptproteinquelle.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine Hinweise auf Unverträglichkeiten, sodass der Einsatz des untersuchten Larvenmehls als Eiweißkomponente in der Ernährung von Hunden möglich ist.

In anschließenden Studien könnten unterschiedliche Gehalte an *Hermetia illucens* Larven oder andere Larvenstadien weitergehend untersucht werden. Außerdem wäre es interessant, auch andere Insekten und deren unterschiedliche Stadien als alternative tierische Proteinquellen in der Hundeernährung zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Heide, Carolin:

Larvenmehl von *Hermetia illucens* als Proteinträger im Futter für Hunde

Larvenmehl von *Hermetia illucens* könnte als Alternative zu konventionellen Proteinquellen in der Ernährung von Hunden eingesetzt werden.

Ziel dieser Studie war es, den Einsatz der Proteinquelle *Hermetia illucens* Larvenmehl auf verdauungsphysiologische und immunologische Effekte bei Hunden zu untersuchen. Daher wurde das Versuchsfutter mit einem Kontrollfutter mit Lammehhl als Hauptkomponente verglichen. In einem Cross-Over-Versuchsdesign wurden 12 Beagles mit dem Kontroll- und Versuchsfutter gefüttert. Nach einer Anpassungszeit von 4 Wochen wurden in der 5. Woche Blut- und Kotproben genommen.

Anhand der Blutproben wurden immunologische Untersuchungen, wie die Phänotypisierung der mononukleären Zellen und der mitogen- bzw. futtermittelantigeninduzierte Lymphozytenproliferationstest durchgeführt. Mittels Analyse der Kotproben und der Futtermittel wurden die scheinbare Gesamtverdaulichkeit der Rohnährstoffe und der Mengen- bzw. Spurenelemente ermittelt. Weitere Untersuchungen, wie die Bestimmung der bakteriellen Metabolite und der Chitinaseaktivität, wurden mit Hilfe der Kotproben durchgeführt. Zudem wurde der Chitingehalt in beiden Futtermitteln und im Kot analysiert.

Weder immunologisch noch hämatologisch ließen sich Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen nachweisen. Es zeigte sich eine geringgradig niedrigere scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins bei Gabe des Futters mit Larvenmehl. Generell wiesen die scheinbaren Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe tendenziell ähnliche Werte zwischen beiden Fütterungsgruppen auf. Bei der Untersuchung der Konzentrationen mikrobieller Metaboliten in den Kotproben fielen höhere Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren und an Ammonium im Kot der Hunde nach Aufnahme des Kontrollfutters auf. Im Versuchsfutter wurde erwartungsgemäß mehr Chitin als im Kontrollfutter nachgewiesen. Die Chitinaseaktivität in den Fäzes wurde dadurch nicht beeinflusst.

Im Rahmen dieser Studie konnten im Fütterungsversuch keine negativen Effekte durch das Versuchsfutter mit *Hermetia illucens* Larvenmehl bei Hunden ermittelt werden, sodass im untersuchten Dosierungsrahmen von einer guten Verträglichkeit auszugehen ist. Diese

Befunde bestätigen, dass der Einsatz von *Hermetia illucens* Larvenmehl in der Fütterung von Hunden möglich ist.

7 Summary

Heide, Carolin:

Larvae of *Hermetia illucens* as a protein source in dog feed

This novel protein source may serve as an alternative to commercial protein sources for dog nutrition

The goal of the present study was to examine the impact of larvae meal from *Hermetia illucens* origin on the physiology of digestion and the immune system in dogs. The experimental diet was compared to a commercial diet based on lamb meal. Twelve beagles were fed a control and experimental diet in a cross-over trial. Faeces and blood samples were collected and analysed after an adaptation period of four weeks.

Immunological investigations, such as the phenotyping of the mononuclear cells and lymphocyte proliferative responses to food allergens and mitogens were carried out based on the blood samples. The apparent total tract digestibility was determined by analysing the faeces after the consumption of control and experimental diet. Faecal samples have been used for the determination of bacterial metabolites and chitinase activity. In addition, the chitin content was determined in faeces of the control and experimental group.

There were no significant differences between both groups regarding the immune system and haematology. There was a slightly lower apparent digestibility of the crude protein after the experimental diet has been fed. While the results of the apparent digestibility were generally similar in control and experimental groups, there were significant differences in metabolites. Ammonium concentration and the total content of short chain fatty acids were constantly higher in the faeces of dogs of the control group. As expected, more chitin was detected in the experimental diet. The chitinase activity in the faeces was not influenced.

No negative impact could be observed in the dogs fed the experimental diet with *Hermetia illucens* larvae meal. A good tolerability can be assumed for this dosage. These findings confirm that the use of *Hermetia illucens* larvae is possible in the feeding of dogs.

8 Literaturverzeichnis

Ackerman, L. (1988). Food hypersensitivity - a rare, but manageable disorder. *Veterinary Medicine* 83(11): 1142-1148.

Alegbeleye, W.O., Obasa, S.O., Olude, O.O., Otubu, K., Jimoh, W. (2012). Preliminary evaluation of the nutritive value of the variegated grasshopper (*Zonocerus variegatus* L.) for African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell. 1822) fingerlings. *Aquaculture Research* 43(3): 412-420.

Anderson, J.A. (1986). The establishment of common language concerning adverse reactions to foods and food-additives. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 78(1): 140-144.

Arp, L.H., Richard, J.L. (1979). Intoxication of dogs with the mycotoxin Penitrem-A. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 175(6): 565-566.

August, J.R. (1985). Dietary hypersensitivity in dogs - cutaneous manifestations, diagnosis, and management. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 7(6): 469-477.

Baker, E. (1974). Food allergy. *Veterinary Clinics of North America* 4(1): 79-89.

Banjo, A.D., Lawal, O.A., Songonuga, E.A. (2006). The nutritional value of fourteen species of edible insects in southwestern Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 5(3): 298-301.

Barroso, F.G., de Haro, C., Sanchez-Muros, M.J., Venegas, E., Martinez-Sanchez, A., Perez-Banon, C. (2014). The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture* 422: 193-201.

Bednar, G.E., Murray, S.M., Patil, A.R., Flickinger, E.A., Merchen, N.R., Fahey, G.C. (2000). Selected animal and plant protein sources affect nutrient digestibility and fecal characteristics of ileally cannulated dogs. *Archiv für Tierernährung* 53(2): 127-140.

Bednar, G. E., Patil, A. R., Murray, S. M., Grieshop, C. M., Merchen, N. R., Fahey, G. C. (2001). Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal digestibility and fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. *The Journal of Nutrition* 131(2): 276-286.

Beloshapka, A. N., de Godoy, M. R. C., Detweiler, K. B., Newcomb, M., Ellegård, K. H., Fahey, G. C., Swanson, K. S. (2016). Apparent total tract macronutrient digestibility, fecal characteristics and fecal fermentative endproduct concentrations of healthy adult dogs fed bioprocessed soy protein. *Journal of Animal Science* 94(9): 3826-3834.

Bernard, J.B., Allen, M.E., Ullrey, D.E. (1997). Feeding captive insectivorous animals: nutritional aspects of insects as food. *Nutrition Advisory Group Handbook, Fact Sheet 3: 1-7.*

Biourge, V.C., Fontaine, J., Vroom, M.W. (2004). Diagnosis of adverse reactions to food in dogs: efficacy of a soy-isolate hydrolyzate-based diet. *Journal of Nutrition* 134(8): 2062S-2064S.

Black, M.M., Schwartz, H.M. (1950). The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst* 75(889): 185-189.

Bokemeyer, J. (2003). Durchflußzytometrische Analyse von Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von Hunden mit immunsuppressiven Erkrankungen. Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertation, S. 74.

Bondari, K., Sheppard, D.C. (1981). Soldier fly larvae as feed in commercial fish production. *Aquaculture* 24(1-2): 103-109.

Boot, R.G., Renkema, G.H., Strijland, A., Vanzonneveld, A.J., Aerts, J.M.F.G. (1995). Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 270(44): 26252-26256.

Boot, R.G., Blommaart, E.F.C., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place, A., Aerts, J.M.F.G. (2001). Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *Journal of Biological Chemistry* 276(9): 6770-6778.

- Bosch, G., Wrigglesworth, D.J., Cone, J.W., Pellikaan, W.F., Hendriks, W.H. (2013). Effects of preservation conditions of canine feces on in vitro gas production kinetics and fermentation end products. *Journal of Animal Science* 91(1): 259-267.
- Bosch, G., Zhang, S., Oonincx, D.G.A.B., Hendriks, H. (2014). Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods. *Journal of Nutritional Science* 3(29): 1-4.
- Bosch, G., Vervoort, J.J.M., Hendriks, W.H. (2016). In vitro digestibility and fermentability of selected insects for dog foods. *Animal Feed Science and Technology* 221: 174-184.
- Boussac, M., Garin, J. (2000). Calcium-dependent secretion in human neutrophils: A proteomic approach. *Electrophoresis* 21(3): 665-672.
- Buchanan, B.B., Frick, O.L. (2002). The dog as a model for food allergy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 964(1): 173-183.
- Bukkens, S.G.F. (1997). The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food and Nutrition* 36(2-4): 287-319.
- Byrne, K.M., Kim, H.W., Chew, B.P., Reinhart, G.A., Hayek, M.G. (2000). A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 73(2): 167-182.
- Carlotti, D.N., Remy, I., Prost, C. (1990). Food allergy in dogs and cats. A review and report of 43 cases. *Veterinary Dermatology* 1(2): 55-62.
- Cave, N.J. (2006). Hydrolyzed protein diets for dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 36(6): 1251-1268.
- Chabanne, L., Marchal, T., Denerolle, P., Magnol, J.P., Fournel, C., Monier, J.C., Rigal, D. (1995). Lymphocyte subset abnormalities in German Shepherd Dog pyoderma (GSP). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 49(3): 189-198.
- Chesney, C.J. (2002). Food sensitivity in the dog: a quantitative study. *Journal of Small Animal Practice* 43(5): 203-207.

Clapper, G.M., Grieshop, C.M., Merchen, N.R., Russett, J.C., Brent, J.L., Jr., Fahey, G.C., Jr. (2001). Ileal and total tract nutrient digestibilities and fecal characteristics of dogs as affected by soybean protein inclusion in dry, extruded diets. *Journal of Animal Science* 79(6): 1523-1532.

Cordle, C.T. (1994). Control of food allergies using protein hydrolysates. *Food Technology* 48(10): 72-76.

Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P.E., Macfarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28(10): 1221-1227.

Day, M.J. (2005). The canine model of dietary hypersensitivity. *Proceedings of the Nutrition Society* 64(4): 458-464.

Dean, G.A., Quackenbush, S.L., Ackley, C.D., Cooper, M.D., Hoover, E.A. (1991). Flow cytometric analysis of lymphocyte-T subsets in cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 28(3-4): 327-335.

Dirscherl, P., Beisker, W., Kremmer, E., Mihalkov, A., Voss, C., Ziesenis, A. (1995). Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 48(1-2): 1-10.

Dordevic, M., Brana, R.D., Marijana, V., Baltic, M., Radislava, T., Ljiljana, J., Marija, V., Rajkovic, M. (2008). Effects of substitution of fish meal with fresh and dehydrated larvae of the house fly (*Musca domestica* L) on productive performance and health of broilers. *Acta Veterinaria (Beograd)* 58(4): 357-368.

Duncan, S.H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A.M., Flint, H.J., Lobley, G.E. (2007). Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and Environmental Microbiology* 73(4): 1073-1078.

Faber, T.A., Bechtel, P.J., Hernot, D.C., Parsons, C.M., Swanson, K.S., Smiley, S., Fahey, G.C. (2010). Protein digestibility evaluations of meat and fish substrates using laboratory, avian, and ileally cannulated dog assays. *Journal of Animal Science* 88(4): 1421-1432.

Faldyna, M., Leva, L., Knotigova, P., Toman, M. (2001). Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - a flow cytometric study. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82(1-2): 23-37.

Fange, R., Lundblad, G., Lind, J. (1976). Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. *Marine Biology* 36(3): 277-282.

Fange, R., Lundblad, G., Lind, J., Slettengren, K. (1979). Chitinolytic enzymes in the digestive system of marine fishes. *Marine Biology* 53(4): 317-321.

Fines, B.C., Holt, G.J. (2010). Chitinase and apparent digestibility of chitin in the digestive tract of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 303(1-4): 34-39.

Finke, M.D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology* 21(3): 269-285.

Forster, G.M., Hill, D., Gregory, G., Weishaar, K.M., Lana, S., Bauer, J.E., Ryan, E.P. (2012). Effects of cooked navy bean powder on apparent total tract nutrient digestibility and safety in healthy adult dogs. *Journal of Animal Science* 90(8): 2631-2638.

Fujimura, M., Masuda, K., Hayashiya, M., Okayama, T. (2011). Flow cytometric analysis of lymphocyte proliferative responses to food allergens in dogs with food allergy. *Journal of Veterinary Medical Science* 73(10): 1309-1317.

Gaschen, F.P., Merchant, S.R. (2011). Adverse food reactions in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41(2): 361-379.

Greeley, E.H., Kealy, R.D., Ballam, J.M., Lawler, D.F., Segre, M. (1996). The influence of age on the canine immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 55(1-3): 1-10.

Guilford, W.G., Markwell, P.J., Jones, B.R., Harte, J.G., Wills, J.M. (1998). Prevalence and causes of food sensitivity in cats with chronic pruritus, vomiting or diarrhea. *Journal of Nutrition* 128(12): 2790S-2791S.

- Guilford, W.G., Jones, B.R., Markwell, P.J., Arthur, D.G., Collett, M.G., Harte, J.G. (2001). Food sensitivity in cats with chronic idiopathic gastrointestinal problems. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15(1): 7-13.
- Hackstein, J.H.P., Stumm, C.K. (1994). Methane production in terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(12): 5441-5445.
- Hale, O.M. (1973). Dried *Hermetia illucens* larvae (Diptera: Stratiomyidae) as a feed additive in poultry. *Journal of the Georgia Entomological Society* 8: 16-20.
- Hall, E.J. (1994). Gastrointestinal aspects of food allergy - a review. *Journal of Small Animal Practice* 35(3): 145-152.
- Hall, E.J. (2002). Gastrointestinal adverse food reactions. *Praktische Tierarzt* 83(1): 30-36.
- Halliwell, R.E.W. (1992). Management of dietary hypersensitivity in the dog. *Journal of Small Animal Practice* 33(4): 156-160.
- Harvey, R.G. (1993). Food allergy and dietary intolerance in dogs - a report of 25 cases. *Journal of Small Animal Practice* 34(4): 175-179.
- Haupt, J., Haupt, H. (1998). *Fliegen und Mücken: Beobachtung, Lebensweise*. Augsburg, Naturbuch-Verlag, ISBN-10: 3894402784: S.351.
- Hesta, M., Roosen, W., Janssens, G.P.J., Millet, S., De Wilde, R. (2003). Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels. *British Journal of Nutrition* 90(6): 1007-1014.
- Hill, P. (1999). Diagnosing cutaneous food allergies in dogs and cats - some practical considerations. *In Practice* 21(6): 287-294.
- Hollak, C.E.M., Vanweely, S., Vanoers, M.H.J., Aerts, J.M.F.G. (1994). Marked elevation of plasma chitotriosidase activity - a novel hallmark of gaucher disease. *Journal of Clinical Investigation* 93(3): 1288-1292.

Huber, T.L., Laflamme, D., Comer, K.M., Anderson, W.H. (1994). Nutrient digestion of dry dog foods containing plant and animal proteins. *Canine Practice* 19(2): 11-13.

Hwangbo, J., Hong, E.C., Jang, A., Kang, H.K., Oh, J.S., Kim, B.W., Park, B.S. (2009). Utilization of house fly-maggots, a feed supplement in the production of broiler chickens. *Journal of Environmental Biology* 30(4): 609-614.

Ijaiya, A.T., Eko, E.O. (2009). Effect of replacing dietary fish meal with silkworm (*Anaphe infracta*) caterpillar meal on performance, carcass characteristics and haematological parameters of finishing broiler chicken. *Pakistan Journal of Nutrition* 8(6): 850-855.

Ishida, R., Masuda, K., Kurata, K., Ohno, K., Tsujimoto, H. (2004). Lymphocyte blastogenic responses to inciting food allergens in dogs with food hypersensitivity. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18(1): 25-30.

Jackson, H.A. (2007). Dermatologic manifestations and nutritional management of adverse food reactions. *Veterinary Medicine* 102(1): 51-64.

Jeffers, J.G., Meyer, E., Sosis, E. (1996). Responses of dogs with food allergies to single-ingredient dietary provocation. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209(3): 608-611.

Kamphues, J., Iben, C., Pallauf, J., Wanner, M., Coenen, M., Kienzle, E., Simon, O., Zentek, J. (2014). *Supplemente zur Tierernährung: Für Studium und Praxis*. Hannover, M. & H. Schaper, ISBN-10: 3794402405: S. 536.

Kaufmann, S.H. (2013). *Basiswissen Immunologie*. Heidelberg, Springer, ISBN 978-3-642-40325-5: S. 133.

Kawano, K., Oumi, K., Ashida, Y., Horiuchi, Y., Mizuno, T. (2013). The prevalence of dogs with lymphocyte proliferative responses to food allergens in canine allergic dermatitis. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 16(4): 735-739.

Kaya, M., Seyyar, O., Baran, T., Erdoğan, S., Kar, M. (2014). A physicochemical characterization of fully acetylated chitin structure isolated from two spider species: with new surface morphology. *International Journal of Biological Macromolecules* 65: 553-558.

Kearns, R.J., Hayek, M.G., Turek, J.J., Meydani, M., Burr, J.R., Greene, R.J., Marshall, C.A., Adams, S.M., Borgert, R.C., Reinhart, G.A. (1999). Effect of age, breed and dietary omega-6 (n-6): omega-3 (n-3) fatty acid ratio on immune function, eicosanoid production, and lipid peroxidation in young and aged dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 69(2-4): 165-183.

Khempaka, S., Chitsatchapong, C., Molee, W. (2011). Effect of chitin and protein constituents in shrimp head meal on growth performance, nutrient digestibility, intestinal microbial populations, volatile fatty acids, and ammonia production in broilers. *Journal of Applied Poultry Research* 20(1): 1-11.

Koh, K., Iwamae, S. (2013). Chitinolytic activity of mucosal enzymes in the different parts of the digestive tract in broilers. *Journal of Poultry Science* 50(1): 65-67.

Kondo, N., Agata, H., Fukutomi, O., Motoyoshi, F., Orii, T. (1990). Lymphocyte responses to food antigens in patients with atopic dermatitis who are sensitive to foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 86(2): 253-260.

Kovalkovicova, N., Sutiakova, I., Pistl, J., Sutiak, V. (2009). Some food toxic for pets. *Interdisciplinary Toxicology* 2(3): 169-176.

Krakovka, S., Ringler, S.S. (1986). Activation specificity of commonly employed mitogens for canine lymphocyte-B and lymphocyte-T. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 11(3): 281-289.

Kroeckel, S., Harjes, A.G.E., Roth, I., Katz, H., Wuertz, S., Susenbeth, A., Schulz, C. (2012). When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute - growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 364: 345-352.

Leistra, M.H., Markwell, P.J., Willemse, T. (2001). Evaluation of selected-protein-source diets for management of dogs with adverse reactions to foods. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219(10): 1411-1414.

Leopold-Temmler, B. (2001). Use of hydrolyzed proteins in dog and cat food. *Praktische Tierarzt* 82(12): 1030-1033.

Leppla, N.C. (2009). Chapter 218 - Rearing of insects. encyclopedia of insects (Second Edition). Cardé, V.H.R.T. San Diego, Academic Press.

Lindsay, G.J.H. (1984). Distribution and function of digestive tract chitinolytic enzymes in fish. *Journal of Fish Biology* 24(5): 529-536.

Loeffler, A., Lloyd, D.H., Bond, R., Kim, J.Y., Pfeiffer, D.U. (2004). Dietary trials with a commercial chicken hydrolysate diet in 63 pruritic dogs. *Veterinary Record* 154(17): 519-522.

Louis, P., Scott, K.P., Duncan, S.H., Flint, H.J. (2007). Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology* 102(5): 1197-1208.

Lovell, R.T., Lafleur, J.R., Hoskins, F.H. (1968). Nutritional value of freshwater crayfish waste meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 16(2): 204-207.

Lundblad, G., Hederste.B, Lind, J., Steby, M. (1974). Chitinase in goat serum - preliminary purification and characterization. *European Journal of Biochemistry* 46(2): 367-376.

Lupton J. R., & Marchant, L. J. (1989). Independent effects of fiber and protein on colonic luminal ammonia concentration. *Journal of Nutrition* 119(2): 235-41.

Macfarlane, S., Macfarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society* 62(1): 67-72.

Mahmoud, M.I. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technology* 48(10): 89-95.

Martin, A., Sierra, M.P., Gonzalez, J.L., Arevalo, M.A. (2004). Identification of allergens responsible for canine cutaneous adverse food reactions to lamb, beef and cow's milk. *Veterinary Dermatology* 15(6): 349-356.

Masuda, K., Sakaguchi, M., Saito, S., Deboer, D.J., Yamashita, K., Hasegawa, A., Ohno, K., Tsujimoto, H. (2002). Seasonal atopic dermatitis in dogs sensitive to a major allergen of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Veterinary Dermatology* 13(1): 53-59.

Maurer, V., Amsler, Z., Stamer, A., Leiber, F. (2015). Replacement of soybean oilcake by *Hermetia illucens* meal in diets for layers. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 24: 46.

May, B.M. (1961). The occurrence in New Zealand and the life history of soldier fly *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). New Zealand Journal of Science 4: 55-65.

Meyer, H., Zentek, J. (2013). Ernährung des Hundes Grundlagen - Fütterung - Diätetik. Stuttgart, Enke. ISBN-10: 3830410824: S. 336.

Middelbos, I.S., Fastinger, N.D., Fahey, G.C. (2007). Evaluation of fermentable oligosaccharides in diets fed to dogs in comparison to fiber standards. Journal of Animal Science 85(11): 3033-3044.

Mundt, H.C., Meyer, H. (1989). Pathogenesis of lactose induced diarrhoea and its prevention by enzymatic-splitting of lactose. Nutrition of the Dog and Cat: Waltham Symposium Number 7. New York, Cambridge University Press: 267-274.

Murray, S.M., Patil, A.R., Fahey, G.C., Merchen, N.R., Hughes, D.M. (1997). Raw and rendered animal by-products as ingredients in dog diets. Journal of Animal Science 75(9): 2497-2505.

Nery, J., Goudez, R., Biourge, V., Tournier, C., Leray, V., Martin, L., Thorin, C., Nguyen, P., Dumon, H. (2012). Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. Journal of Animal Science 90(8): 2570-2580.

Newton, G.L., Booram, C.V., Barker, R.W., Hale, O.M. (1977). Dried *Hermetia Illucens* larvae meal as a supplement for swine. Journal of Animal Science 44(3): 395-400.

Ng, W.K., Liew, F.L., Ang, L.P., Wong, K.W. (2001). Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture Research 32: 273-280.

Ocio, E., Viñaras, R., Rey, J.M. (1979). House fly larvae meal grown on municipal organic waste as a source of protein in poultry diets. Animal Feed Science and Technology 4(3): 227-231.

Ogunji, J.O., Kloas, W., Wirth, M., Neumann, N., Pietsch, C. (2008). Effect of housefly maggot meal (magma) diets on the performance, concentration of plasma glucose, cortisol and blood characteristics of *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92(4): 511-518.

Ojewola, G.S., Okoye, F.C., Ukoha, O.A. (2005). Comparative utilization of three animal protein sources by broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* 4(7): 462-467.

Oonincx, D. G., van Isterbeeck, J., Heetkamp, M. J., van den Brand, H., van Loon, J. J., van Huis, A. (2010). An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *Plos One* 5(12): e14445.

Oyegoke, O.O., Akintola, A.J., Fasoranti, J.O. (2006). Dietary potentials of the edible larvae of *Cirina forda* (westwood) as a poultry feed. *African Journal of Biotechnology* 5(19): 1799-1802.

Paßlack, N., Zentek, J. (2013). *Futtermittelallergien und -intoleranzen bei Hund und Katze*. Stuttgart, Veterinärspiegel-Verlag. ISBN 978-3-86542--022-0: S. 32.

Paterson, S. (1995). Food hypersensitivity in 20 dogs with skin and gastrointestinal signs. *Journal of Small Animal Practice* 36(12): 529-534.

Philipp, P.I. (2013). *Der Effekt einer unterschiedlichen Proteinversorgung auf immunologische und verdauungsphysiologische Parameter während der postnatalen Entwicklung von Beaglewelpen*. Freien Universität Berlin, Dissertation, S.147.

Picco, F., Zini, E., Nett, C., Naegeli, C., Bigler, B., Rufenacht, S., Roosje, P., Gutzwiller, M.E.R., Wilhelm, S., Pfister, J., Meng, E., Favrot, C. (2008). A prospective study on canine atopic dermatitis and food induced allergic dermatitis in Switzerland. *Veterinary Dermatology* 19(3): 150-155.

Pinna, C., Vecchiato, C. G., Zaghini, G., Grandi, M., Nannoni, E., Stefanelli, C., Biagi, G. (2016). In vitro influence of dietary protein and fructooligosaccharides on metabolism of canine fecal microbiota. *BMC veterinary research* 12(1): 53.

Proverbio, D., Perego, R., Spada, E., Ferro, E. (2010). Prevalence of adverse food reactions in 130 dogs in Italy with dermatological signs: a retrospective study. *Journal of Small Animal Practice* 51(7): 370-374.

Rahman, M., Koh, K. (2016). Effects of formic acid treated shrimp meal on growth performance and nutrient digestibility in broilers. *Journal of Poultry Science* 53(3): 208-212.

Ramos Elorduy, J. (1997). Insects: A sustainable source of food? *Ecology of Food and Nutrition* 36(2-4): 247-276.

Ramos-Elorduy, J., Gonzalez, E.A., Hernandez, A.R., Pino, J.M. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *Journal of Economic Entomology* 95(1): 214-220.

Ricci, R., Granato, A., Vascellari, M., Boscarato, M., Palagiano, C., Andrighetto, I., Diez, M., Mutinelli, F. (2013). Identification of undeclared sources of animal origin in canine dry foods used in dietary elimination trials. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 32-38.

Richter, E.A., Kiens, B., Raben, A., Tvede, N., Pedersen, B.K. (1991). Immune parameters in male athletes after a lacto-ovo vegetarian diet and a mixed western diet. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 23(5): 517-521.

Rosser, E.J. (1993). Diagnosis of food allergy in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 203(2): 259-262.

Roudebush, P., Cowell, C.S. (1992). Results of a hypoallergenic diet survey of veterinarians in North America with a nutritional evaluation of homemade diet prescriptions. *Veterinary Dermatology* 3(1): 23-28.

Roudebush, P. (2013). Ingredients and foods associated with adverse reactions in dogs and cats. *Veterinary Dermatology* 24(2): 293-294.

Rumpold, B.A., Schlueter, O.K. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 17: 1-11.

Sanchez-Muros, M.J., Barroso, F.G., Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *Journal of Cleaner Production* 65: 16-27.

Scott, D.W. (1978). Immunologic skin disorders in the dog and cat. *Veterinary Clinics of North America* 8(4): 641-664.

Shen, C.R., Chen, Y.S., Yang, C.J., Chen, J.K., Liu, C.L. (2010). Colloid chitin azure is a dispersible, low cost substrate for chitinase measurements in a sensitive, fast, reproducible assay. *Journal of Biomolecular Screening* 15(2): 213-217.

Simunek, J., Hodrova, B., Bartonova, H., Kopečný, J. (2001). Chitinolytic bacteria of the mammal digestive tract. *Folia Microbiologica* 46(1): 76-78.

St-Hilaire, S., Cranfill, K., McGuire, M.A., Mosley, E.E., Tomberlin, J.K., Newton, L., Sealey, W., Sheppard, C., Irving, S. (2007a). Fish offal recycling by the black soldier fly produces a foodstuff high in omega-3 fatty acids. *Journal of the World Aquaculture Society* 38(2): 309-313.

St-Hilaire, S., Sheppard, C., Tomberlin, J.K., Irving, S., Newton, L., McGuire, M.A., Mosley, E.E., Hardy, R.W., Sealey, W. (2007b). Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society* 38(1): 59-67.

Stanogias, G.B., Pearce, G.R. (1987). The effect of composition on diet digestibility by pigs and on the biodegradability of the resulting pig feces. *Biological Wastes* 21(2): 101-110.

Sunvold, G. D., Fahey, G. C., Merchen, N. R., Reinhart, G. A. (1995). In vitro fermentation of selected fibrous substrates by dog and cat fecal inoculum: influence of diet composition on substrate organic matter disappearance and short chain fatty acid production. *Journal of Animal Science* 73(4): 1110-1122.

Suzuki, M., Fujimoto, W., Goto, M., Morimatsu, M., Syuto, B., Iwanaga, T. (2002). Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50(8): 1081-1089.

Swanson, K.S., Kuzmuk, K.N., Schook, L.B., Fahey, G.C. (2004). Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs. *Journal of Animal Science* 82(6): 1713-1724.

Taylor, S.L., Lemanske, R.F., Bush, R.K., Busse, W.W. (1987). Food allergens - structure and immunological properties. *Annals of Allergy* 59(5): 93-99.

Thonar, E. J., Lenz, M. E., Klintworth, G. K., Caterson, B., Pachman, L. M., Glickman, P., Katz, R., Huff, J., Kuettner, K. E. (1985). Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism. *Arthritis & Rheumatology* 28(12): 1367-1376.

Tizard, I.R. (2013). *Veterinary Immunology*, Amsterdam, Elsevier Health Sciences. ISBN: 1416049894.

Tortola, L., Souza, N. G., Zaine, L., Gomes, M. O. S., Matheus, L. F. O., Vasconcellos, R. S., Pereira G. T., Carciofi, A. C. (2013). Enzyme effects on extruded diets for dogs with soybean meal as a substitute for poultry by-product meal. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97(1): 39-50.

van der Spiegel, M., Noordam, M.Y., van der Fels-Klerx, H.J. (2013). Safety of novel protein sources (insects, microalgae, seaweed, duckweed, and rapeseed) and legislative aspects for their application in food and feed production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12(6): 662-678.

Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United nations (FAO).

Veldkamp, T., van Duinkerken, G., van Huis, A. (2012). Insects as a sustainable feed ingredient in pig. *Food Chemistry* 50: 192-195.

Verlinden, A., Hesta, M., Hermans, J.M., Janssens, G.P.J. (2006a). The effects of inulin supplementation of diets with or without hydrolysed protein sources on digestibility, faecal characteristics, haematology and immunoglobulins in dogs. *British Journal of Nutrition* 96(5): 936-944.

Verlinden, A., Hesta, M., Millet, S., Janssens, G.P.J. (2006b). Food allergy in dogs and cats: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46(3): 259-273.

Walton, G. (1967). Skin responses in the dog and cat to ingested allergens. Observations on one hundred confirmed cases. *Veterinary Record* 81(27): 709-713.

Wambacq, W., Rybachuk, G., Jeusette, I., Rochus, K., Wuyts, B., Fievez, V., Nguyen P., Hesta, M. (2016). Fermentable soluble fibres spare amino acids in healthy dogs fed a low-protein diet. *BioMed Central Veterinary Research* 12(1): 130.

Wang, D., Zhai, S.W., Zhang, C.X., Bai, Y.Y., An, S.H., Xu, Y.N. (2005). Evaluation on nutritional value of field crickets as a poultry feedstuff. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18(5): 667-670.

Willemse, T. (2002). Dermatologische Krankheitsbilder bei Futtermittelunverträglichkeiten. *Praktische Tierarzt* 6(1): 24-29.

Yi, C., He, Q., Wang, L., Kuang, R. (2010). The utilization of insect resources in chinese rural area. *Journal of Agricultural Science* 2(3): 146-154.

Zentek, J., Mischke, R. (1997). Soya and casein as dietary proteins for dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 77(3): 139-148.

Zinn, K.E., Hernot, D.C., Fastinger, N.D., Karr-Lilienthal, L.K., Bechtel, P.J., Swanson, K.S., Fahey, G.C. (2009). Fish protein substrates can substitute effectively for poultry by-product meal when incorporated in high-quality senior dog diets. *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition* 93(4): 447-455.

9 Anhang

Tab. 73: Scoring System mit Abbruchkriterien zur Beurteilung des Allgemeinbefindens

Bewertungsparameter	Kriterien	Scoring
Körperhaltung	Aufrecht, alle 4 Gliedmaße werden gleichmäßig belastet	1
	Unphysiologisch	2
	Abbruchkriterium: Score 2 sollte nicht erreicht werden	
Verhalten	Apathisch	1
	Matt	2
	Ruhig und aufmerksam	3
	Übererregt	4
	Exzitationen	5
	Abbruchkriterium: Score 1 und 5 dürfen nicht erreicht werden	
Ernährungszustand	Sehr gut (adipös)	1
	Gut	2
	Mäßig	3
	Schlecht, eingeschränkte Futteraufnahme,	4
	Sehr schlecht (kachektisch), stark eingeschränkte bzw. nicht vorhandene Futteraufnahme	5
Abbruchkriterium: Score 4 und 5 darf nicht erreicht werden		
Pflegezustand	Haare: Glatt, anliegend, mattglänzend, unversehrt, geschlossen	1
	Haare: glatt, anliegend, stumpf, ggr. versehrt (Scheuerstellen), ggr. Haarausfall, ggr. Verfärbung der Haare	2
	Haare: struppig, stumpf, mgr. bis hgr. versehrt, großflächiger Ausfall oder starke Verfärbungen der Haare	3
	Abbruchkriterium: Score 3 darf nicht erreicht werden	
Allgemeinbefinden, Körpertemperatur	Physiologisch, bis 39,0 °C	1
	Allgemeinbefinden eingeschränkt, Körpertemperatur geringgradig erhöht	2
	Allgemeinbefinden stark eingeschränkt, Körpertemperatur stark erhöht (> 40 °C)	3
Abbruchkriterium: Score 3 darf nicht erreicht werden		

ggr.: geringgradig; mgr.: mittelgradig; hgr.: hochgradig

9.1 Publikationsverzeichnis

Kriesten, A., Heide, C., Kröger, S., Zentek, J.

Analysis of chitin from *Hermetia illucens* larvae by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). 20th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition. Berlin, Deutschland, 15.-17. September 2016. ISBN: 978-3-00-054258-9: S. 193.

Heide, C., Kröger, S., Zentek, J.

Larvenmehl von *Hermetia illucens* als Proteinquelle für Hunde. 71. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, Göttingen, Deutschland, 14.-16. März 2017. ISBN: 978-3-7690-4110-1: S. 149.

9.2 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Zentek für die Annahme als Doktorandin und die Überlassung dieses spannenden Themas sowie für seine Unterstützung während der gesamten Zeit bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Susan Kröger, für ihre stets freundliche Hilfe und Unterstützung in fachlicher und emotionaler Hinsicht.

Zudem gilt mein Dank der Firma Vet-Concept für die Bereitstellung des Versuchs- und Kontrollfutters und die Unterstützung während der gesamten Studie.

Besonders bedanken möchte ich mich, bei der hervorragenden technischen Assistenz durch Anett Kriesten, Petra Huck, Marita Eitinger, Katharina Topp und Luisa Ebersbach.

Vielen Dank für eure stetige Hilfsbereitschaft im Labor.

Mein besonderer Dank geht an die Tierpfleger Corinna Schmidt, Ines Bebert, Chris Schulze und Sandra Fischer bei Hilfe der Organisation und Durchführung des Versuches und für die liebevolle Betreuung der Hunde.

Zudem möchte ich mich bei Rene Bloßfeld für die Hilfe bei allen technischen Fragen bedanken.

Bei Dr. Wilfried Vahjen bedanke ich mich für die Unterstützung und Hilfe bei der Methodenentwicklung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung für die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich unermüdlich und immerwährend unterstützen und mir dadurch meinen bisherigen Weg und diese Arbeit ermöglicht haben.

9.3 Selbständigkeitserklärung

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

Berlin, den 20.07.2017

Carolin Heide