

Aus dem Institut für Tierernährung
und
der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Einsatz von *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199
bei Hunden mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

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

vorgelegt von
Birgit Schläfke
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3539

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

intestinal diseases, dogs, diarrhoea, inflammatory bowel diseases, probiotics,
Bifidobacterium, Bifidobacterium animalis, chronic diseases, microbial flora,
Firmicutes

Tag der Promotion: 17.01.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-160-4

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

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Inhalt

1	Einleitung.....	15
2	Literaturübersicht	16
2.1	Immunologische Grundlagen	16
2.1.1	Das Immunsystem.....	16
2.1.2	Das Immunsystem des Darmes.....	18
2.1.3	Die Orale Toleranz (OT) gegenüber Nahrungs- bzw. Futtermitteln.....	19
2.2	Chronische Enteropathien beim Hund	20
2.2.1	Einleitung	20
2.2.2	Ätiologie.....	21
2.2.3	Pathogenese	22
2.2.4	Klinik inflammatorischer Darmerkrankungen	23
2.2.5	Diagnose und Differentialdiagnose	24
2.2.6	Therapie.....	28
2.2.7	Prognose	30
2.3	Die Darmmikrobiota	30
2.3.1	Qualitative und quantitative Verteilung der kaninen Darmmikrobiota ...	31
2.4	Probiotika.....	32
2.4.1	Definition	32
2.4.2	Gesetzliche Vorgaben für den Einsatz von Probiotika in der Tierernährung.....	33
2.4.3	Anforderungen an Probiotika	33
2.4.4	Wirkungen von Probiotika	35
2.4.5	Bifidobakterien	39
2.4.5.1	Wachstum.....	40
2.4.5.2	Stoffwechsel	40
2.5	Der Einsatz von Probiotika bei chronischen Enteropathien.....	41
2.5.1	Probiotika im IBD-Tiermodell	41
2.5.2	Probiotische Mischpräparate im IBD-Tiermodell.....	42
2.5.3	Klinische Studien bei humanen IBD-Patienten	42
2.5.3.1	Ulzerative Kolitis (UC)	42
2.5.3.2	Pouchitis	43
2.5.3.3	Morbus Crohn (MC).....	43
2.5.4	Probiotika bei kaniner Diarrhoe	43
2.6	Fragestellung dieser Arbeit	46
3	Material und Methode.....	47
3.1	Versuchstierantrag.....	47
3.2	Antrag auf Ausnahmegenehmigung für die Zulassung eines Stoffes als Futtermittelzusatzstoff nach § 69 Abs. 1 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFBG)	47
3.3	Arbeitshypothese	47
3.4	Patienten, Ein- und Ausschlusskriterien.....	47
3.5	Studienprotokoll.....	48
3.6	Signalement, Anamnese und klinische Untersuchung.....	49

3.7	Tagebuch	50
3.8	Fragebogen.....	51
3.8.1	Canine Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI) .	51
3.8.2	Futterakzeptanz, Krankheitsentwicklung, Flatulenz, Borborygmus, Bauchschmerzen und Unbehagen	51
3.8.3	Body Condition Score (BCS)	52
3.9	Versuchsfutter	53
3.10	Probiotikum	53
3.11	Entnahme, Aufbereitung und Lagerung der Proben.....	54
3.11.1	Kotproben.....	54
3.11.2	Blutproben.....	54
3.11.3	Lymphozyten.....	54
3.12	Diagnostisch und differentialdiagnostisch durchgeführte Untersuchungen	54
3.12.1	Hämatologische Untersuchung und Differentialblutbild.....	54
3.12.2	Klinische Chemie	55
3.12.3	Trypsin-like Immunoreactivity (TLI).....	55
3.12.4	Cobalamin und Folsäure.....	55
3.12.5	C-Reaktives Protein (CRP).....	55
3.12.6	Kotuntersuchung	56
3.12.7	Röntgen	56
3.12.8	Ultraschall des Abdomens.....	56
3.12.9	Endoskopie	56
3.12.10	Histopathologische Untersuchung.....	57
3.13	Lymphozytenisolierung und –phänotypisierung im Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)	57
3.13.1	Herstellung der PBS-Lösung (Phosphate-Buffered Saline).....	57
3.13.2	Isolierung.....	57
3.13.3	Lymphozytenphänotypisierung.....	57
3.14	DNA-Extraktion und Real time-PCR zur Erfassung der eubakteriellen Gesamtkeimzahl, von Bakterien der <i>Clostridium leptum</i> - und der <i>Clostridium coccooides</i> -Gruppe, zur Bestimmung der Keimzahlen von Laktobazillen und Bifidobakterien und zum Nachweis probiotischer DNA.....	58
3.14.1	Herstellung der benötigten Materialien	58
3.14.2	Einwiegen der Proben	58
3.14.3	DNA-Extraktion.....	59
3.14.4	Bestimmung der DNA-Konzentration in den Proben	59
3.14.5	Real Time-PCR	60
3.15	Therapie der Hunde mit chronischer Enteropathie.....	65
3.16	Statistik.....	66
4	Ergebnisse.....	67
4.1	Signalement.....	67
4.1.1	Rasse, Alter und Geschlecht	67
4.2	Anamnese	67
4.3	Befunde der klinischen Untersuchung	67
4.4	In den Tagebüchern erhobene Daten	69

4.4.1	Aktivität	69
4.4.2	Appetit	70
4.4.3	Erbrechen	71
4.4.4	Konsistenz der Fäzes	72
4.4.5	Hämatochezie	72
4.4.6	Auftreten von Schleim in den Fäzes	73
4.4.7	Kotabsatzfrequenz	74
4.4.8	Zusammenfassung	75
4.5	Durch die Besitzer beurteilte und objektiv messbare Parameter der Fragebögen	76
4.5.1	Körpermasse der Probanden	77
4.5.2	Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI) der Probanden	78
4.5.3	Futterakzeptanz bei den Probanden	79
4.5.4	Einschätzung der Krankheitsentwicklung im Laufe der Studie	80
4.5.5	Flatulenz	81
4.5.6	Borborygmus	82
4.5.7	Bauchschmerzen	83
4.5.8	Unbehagen	84
4.5.9	Body Condition Score (BCS)	85
4.6	Ergebnisse der Blutuntersuchungen im Studienverlauf und Gruppenvergleich	86
4.6.1	Hämatologische Untersuchung	86
4.6.2	Differentialblutbild	87
4.6.3	Blutchemische Parameter	87
4.6.4	Trypsin-like Immunoreactivity (TLI), Vitamin B ₁₂ , Folsäure und C-Reaktives Protein (CRP)	90
4.7	Lymphozytenphänotypisierung	93
4.7.1	CD4 ⁺ -Lymphozyten	93
4.7.2	CD8β ⁺ -Lymphozyten	94
4.7.3	CD21 ⁺ -Lymphozyten	95
4.7.4	CD5 ⁺ -Lymphozyten	96
4.8	Röntgenbefunde	97
4.9	Ultraschallbefunde	97
4.10	Endoskopiebefunde	97
4.11	Histopathologische Untersuchung	99
4.12	Diagnose der histologischen Untersuchung	102
4.13	Therapie	103
4.14	Molekularbiologische Untersuchung ausgewählter Bakterien in den Fäzes ..	105
4.14.1	Eubakterien	105
4.14.2	Clostridien	106
4.14.3	Bifidobakterien	107
4.14.4	Laktobazillen	108
4.14.5	Probiotikum-DNA	108
5	Diskussion	109
5.1	Diskussion des Versuchsaufbaus	109

5.2	Diskussion der Methoden	110
5.2.1	Fütterung und Haltung	111
5.2.2	Probiotikum/Plazebo	111
5.2.3	Signalement	112
5.2.4	Anamnese	112
5.2.5	Klinische Allgemeinuntersuchung	114
5.2.6	Arzneimitteltherapie	115
5.2.7	Ausschlussdiagnostik	115
5.2.7.1	Hämatologie, Differentialblutbild, Klinische Chemie	116
5.2.7.2	Trypsin-like Immunoreactivity (TLI).....	117
5.2.7.3	Röntgen, Ultraschall.....	118
5.2.7.4	Endoskopie, Histologie	118
5.2.8	Fäzes.....	120
5.3	Diskussion der Ergebnisse	120
5.3.1	Tagebücher	120
5.3.2	Fragebogen	122
5.3.3	Diskussion der Ergebnisse der Blutparameter	124
5.3.3.1	Hämatologie, Differentialblutbild, Klinische Chemie	124
5.3.3.2	Cobalamin, Folsäure.....	124
5.3.4	Lymphozytenphänotypisierung.....	126
5.3.5	Diskussion der molekularbiologischen Daten	128
5.3.5.1	Eubakterien.....	128
5.3.5.2	Clostridien	129
5.3.5.3	Bifidobakterien.....	130
5.3.5.4	Laktobazillen.....	131
5.3.5.5	Probiotische DNA	132
6	Zusammenfassung	134
7	Summary	136
8	Literaturverzeichnis	138
9	Anhang	171
10	Danksagung	194
11	Selbständigkeitserklärung	195

Tabellen

Tab. 1: Zahlencodes der rekrutierten Patienten und rekrutierende Einrichtung	48
Tab. 2: Zeitliche Abfolge der durchgeführten Untersuchungen	49
Tab. 3: Mögliche Ausprägungen und Bewertung der Parameter der Tagebücher	50
Tab. 4: Aufschlüsselung der ausgewerteten Untersuchungstage pro Periode.....	50
Tab. 5: Parameter, mögliche Ausprägungen und Bewertung des Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI).....	51
Tab. 6: Bewertung der Parameter Futterakzeptanz, Krankheitsentwicklung, Flatulenz, Borborygmus, Bauchschmerzen und Unbehagen	52
Tab. 7: Referenzbereiche der verwendeten Parameter der klinischen Chemie.....	55
Tab. 8: Referenzbereiche (vom untersuchenden Labor angegeben) für die Parameter Trypsin- like Immunoreactivity, Vitamin B ₁₂ , Folsäure und C-Reaktives Protein	56
Tab. 9: Zur Lymphozytenphänotypisierung herangezogene Antikörper	58
Tab. 10: Reaktionskomponenten der Real Time-PCR Probenansätze zur Bestimmung von Eubakterien, Bakterien der Gruppen <i>Clostridium leptum</i> und <i>Clostridium coccooides</i> , von Bifidobakterien, Laktobazillen und der probiotischen DNA	61
Tab. 11: Reaktionsbedingungen und PCR-Parameter.....	62
Tab. 12: Gruppen- und speziesspezifische Oligonukleotide für die Detektion der ausgewählten Bakterien und der probiotischen DNA.....	64
Tab. 13: Häufigkeit [%] der möglichen Ausprägungen des Merkmals „Aktivität“ im Studienverlauf und Gruppenvergleich	70
Tab. 14: Gruppenvergleich der Medianwerte des Merkmals „Appetit“ im Studienverlauf Gruppenvergleich.....	70
Tab. 15: Häufigkeit [%] der möglichen Ausprägungen des Merkmals „Erbrechen“ im Gruppenvergleich und Studienverlauf	71
Tab. 16: Prozentualer Anteil der verschiedenen Konsistenzen der Fäzes im Gruppenvergleich und Studienverlauf	72
Tab. 17: Häufigkeit [%] des Auftretens einer Hämatochezie in den Gruppen im Studienverlauf	73
Tab. 18: Häufigkeit [%] des Auftretens von Schleim in den Fäzes in den Gruppen im Studienverlauf	73
Tab. 19: Häufigkeit [%] der möglichen Kotabsatzfrequenzen der Tiere im Gruppenvergleich und Studienverlauf	74
Tab. 20: Zusammenfassende Darstellung der signifikanten und tendenziellen Gruppenunterschiede der Tagebuchparameter im Studienverlauf.....	75
Tab. 21: Anzahl der Tiere pro Untersuchungstag und Gruppe, bei denen die Parameter der Fragebögen erhoben wurden	76
Tab. 22: Häufigkeit des Auftretens von Bauchschmerzen bei den Probanden [%] im Gruppenvergleich und Studienverlauf (n.s.)	83
Tab. 23: Häufigkeit des Auftretens von Unbehagen bei den Probanden [%] im Gruppenvergleich und Studienverlauf (n.s.)	84

Tab. 24: Zusammenfassende Darstellung der Mediane der Parameter der Fragebögen vor Beginn und zum Abschluss der Intervention	86
Tab. 25: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung des Blutes der Hunde zu Beginn und Abschluss der Studie im Gruppenvergleich.....	87
Tab. 26: Ergebnisse des Differentialblutbildes der Hunde zu Beginn und Abschluss der Studie im Gruppenvergleich.....	87
Tab. 27: Mittelwerte der blutchemischen Parameter der Hunde zu Beginn und zum Abschluss der Studie im Gruppenvergleich	89
Tab. 28: Anzahl unterhalb, innerhalb oder oberhalb des Referenzbereiches liegende Cobalaminwerte im Gruppenvergleich und Studienverlauf.....	90
Tab. 29: Anzahl unterhalb, innerhalb oder oberhalb des Referenzbereiches liegende Folsäurewerte im Gruppenvergleich und Studienverlauf mit Mittelwert und Standardabweichung	91
Tab. 30: Mittelwerte mit Standardabweichung des C-Reaktiven Proteins im Gruppenvergleich und Studienverlauf	92
Tab. 31: Beurteilung der Art der histopathologischen Untersuchungen für Magen, Duodenum und Kolon der Probanden im Gruppenvergleich	100
Tab. 32: Abschließende Diagnose nach zusammenfassender Beurteilung aller histopathologischer Veränderungen im Gastrointestinaltrakt für das Einzeltier	102
Tab. 33: Anzahl der medikamentell behandelten Hunde und mittlere Verabreichungsdauer verschiedener Arzneimittelgruppen pro Gruppe und Periode.....	103
Tab. 34: Mittlerer Gehalt an Bakterien der <i>Clostridium leptum</i> -Gruppe mit Standardabweichung in den Fäzes der Probanden pro Gruppe und Untersuchungstag	106
Tab. 35: Mittlerer Gehalt an Bakterien der <i>Clostridium coccooides</i> -Gruppe mit Standardabweichung in den Fäzes der Probanden pro Gruppe und Untersuchungstag	106
Tab. 36: Mittlerer Gehalt an Laktobazillen mit Standardabweichung in den Fäzes der Probanden pro Gruppe und Untersuchungstag	108
Tab. 37: Probiotikum-DNA-Gehalt in den Fäzes [ng/g] der Probiotikagruppe an Tag 30 und Tag 90 der Studie aller Tiere und derer, die keine Antibiose erhielten	108
Tab. 38: Materialien und Geräte, die zur Entnahme, Aufbereitung und Lagerung der Proben herangezogen wurden	171
Tab. 39: Geräte, die im Zuge der Differentialdiagnostik verwendet wurden	172
Tab. 40: Im Rahmen der Studie beauftragte Fremdlabore	173
Tab. 41: Materialien und Geräte zur Lymphozytenisolierung und -phänotypisierung	174
Tab. 42: Materialien und Geräte für die vorbereitenden Arbeiten und zur Durchführung einer Real-Time PCR	175
Tab. 43: Signalement der Probanden	180
Tab. 44: Vorhandensein anamnestisch erfasster Parameter der in die Studie eingeschlossenen Hunde mit chronischer Enteropathie.....	182
Tab. 45: Anamnese.....	183

Tab. 46: Befunde der hämatologischen Untersuchung, des Differentialblutbildes und der klinischen Chemie der Hunde 1-8 im Studienverlauf.....	184
Tab. 47: Befunde der hämatologischen Untersuchung, des Differentialblutbildes und der klinischen Chemie der Hunde 9-16 im Studienverlauf.....	185
Tab. 48: Befunde der hämatologischen Untersuchung, des Differentialblutbildes und der klinischen Chemie der Hunde 17-24 im Studienverlauf.....	186
Tab. 49: Befunde der hämatologischen Untersuchung, des Differentialblutbildes und der klinischen Chemie der Hunde 25-32 im Studienverlauf.....	187
Tab. 50: Befunde von Trypsin-like Immunoreactivity, Vitamin B ₁₂ , Folsäure und C-Reaktives Protein der Hunde 1-8 im Studienverlauf	188
Tab. 51: Befunde von Trypsin-like Immunoreactivity, Vitamin B ₁₂ , Folsäure und C-Reaktives Protein der Hunde 9-16 im Studienverlauf	188
Tab. 52: Befunde von Trypsin-like Immunoreactivity, Vitamin B ₁₂ , Folsäure und C-Reaktives Protein der Hunde 17-24 im Studienverlauf	189
Tab. 53: Befunde von Trypsin-like Immunoreactivity, Vitamin B ₁₂ , Folsäure und C-Reaktives Protein der Hunde 25-32 im Studienverlauf	189
Tab. 54: Übersicht über die pathologischen Befunde der Probanden von Röntgen, Ultraschall und Endoskopie.....	190
Tab. 55: CIBDAI der Tiere der Plazebogruppe im Studienverlauf.....	193
Tab. 56: CIBDAI der Tiere der Probiotikagruppe im Studienverlauf.....	193

Abbildungen

Abb. 1: Körpermasse der Hunde im Gruppenvergleich und Studienverlauf (n.s), dargestellt sind Boxplots.....	77
Abb. 2: Darstellung des CIBDAI der Hunde im Gruppenvergleich an den Kontrolltagen, Darstellung als Boxplots	78
Abb. 3: Darstellung der Futterakzeptanz der Hunde im Gruppenvergleich und Studienverlauf, Darstellung als Boxplots	79
Abb. 4: Darstellung der Einschätzung der Entwicklung der Erkrankung der Hunde durch den Besitzer im Gruppenvergleich und Studienverlauf, Darstellung als Boxplots	80
Abb. 5: Darstellung des Auftretens von Flatulenzen seit der letzten Kontrolle bei den Hunden im Gruppenvergleich und Zeitverlauf (n.s.), Darstellung als Boxplots	81
Abb. 6: Darstellung der Häufigkeit von Borborygmen bei den Hunden im Gruppenvergleich und Studienverlauf (n.s.), Darstellung als Boxplots	82
Abb. 7: Darstellung des Body Condition Scores (BCS) der Hunde im Gruppenvergleich und Studienverlauf (n.s.), Darstellung als Boxplots	85
Abb. 8: CD4 ⁺ -Lymphozytensubpopulation der Hunde [%] im Gruppenvergleich vor Beginn und zum Abschluss der Intervention (n.s.), dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung	93
Abb. 9: CD8β ⁺ -Lymphozytensubpopulation der Hunde [%] im Gruppenvergleich vor Beginn und zum Abschluss der Intervention (n.s.), dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung	94
Abb. 10: CD21 ⁺ -Lymphozytensubpopulation der Hunde [%] im Gruppenvergleich vor Beginn und zum Abschluss der Intervention (n.s.), dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung	95
Abb. 11: CD5 ⁺ -Lymphozytensubpopulation der Hunde [%] im Gruppenvergleich vor Beginn und zum Abschluss der Interventionen (n.s.), dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung.....	96
Abb. 12: Eubakterielle Zellzahlen [log Zellen/g] im Gruppenvergleich und Studienverlauf	105
Abb. 13: Anzahl an <i>Bifidobacterium</i> spp. in den Fäzes [log Zellen/g] im Gruppenvergleich und Studienverlauf, dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung	107
Abb. 14: Tagebuch	179

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
APC	engl. antigen presenting cell: antigenpräsentierende Zelle
ARD	engl. antibiotic responsive diarrhea: antibiotika-responsive Diarrhoe
AST	Aspartat-Aminotransferase
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
BCS	engl. body condition score
bp	Basenpaare
Ca	Calcium
CD	engl. cluster of differentiation
CE	chronische Enteropathie
CIBDAI	engl. chronic inflammatory bowel disease activity index
CRP	C-reaktives Protein
Ct	Zyklussignal während einer Real Time-PCR, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt
Def.	Definition
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DSH	Deutscher Schäferhund
DSS	engl. dextran sulfate sodium
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGE	eosinophile Gastroenteritis
EIA	engl. enzyme immunoassay
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
EPI	exokrine Pankreasinsuffizienz
F6PPK	Fruktose-6-Phosphat-Phosphoketolase
FACS	engl. fluorescence activated cell sorter
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	engl. fetal calf serum: fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Florida
FRD	engl. food responsive diarrhea
G	Giga
GALT	engl. gut-associated lymphoid tissue
ggr.	geringgradig
GHLO	engl. gastric Helicobacter-like organisms
GIT	Gastrointestinaltrakt
GITC	Guanidinisothiocyanat
GLDH	Glutamatdehydrogenase
hgr.	hochgradig
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HLA	engl. human leukocyte antigen
IBD	engl. inflammatory bowel disease
IEC	engl. intestinal epithelial cell
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
IPAA	engl. ileal-pouch-anal-anastomosis
IRA	engl. ileorectal anastomosis
IU	engl. international unit
k.A.	keine Angaben
KAF	Kotabsatzfrequenz
KbE	koloniebildende Einheiten
kcal	Kilokalorien
kD	Kilodalton
KM	Körpermasse
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
l	Liter
LAB	engl. lactic acid bacteria
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LIA	Lumineszenzimmunoassay
Ln.	Lymphonodus
Lnn.	Lymphonodi
log	Logarithmus
LPC	engl. lymphoplasmacellular colitis; lymphoplasmazelluläre Kolitis
LPE	lymphoplasmazelluläre Enteritis
LPL	Lamina propria-Lymphozyten
m	männlich
MAdCAM	engl. mucosal addressin cell adhesion molecule
Max.	Maximum
MC	Morbus Crohn
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
mgr.	mittelgradig
MHC	engl. major histocompatibility complex
min.	Minute
Min.	Minimum
MJ	Megajoule
mk	männlich kastriert
ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
μM	Mikromol
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natural killer-Zellen
NOS	Stickstoff-Oxid-Synthase
n.s.	nicht signifikant
NSAID	nichtsteroidales Antiphlogistikum
OT	orale Toleranz
P	Periode
P1	Periode 1 (Untersuchungstage 1-14)
P2	Periode 2 (Untersuchungstage 15-30)
P3	Periode 3 (Untersuchungstage 31-60)
P4	Periode 4 (Untersuchungstage 61-90)
PBS	engl. phosphate-buffered saline

pg	Pikogramm
PLE	engl. protein-losing-enteropathy; Proteinverlustenteropathie
PLI	pankreatische Lipase Immunreaktivität
ROX	6-carboxy-X-rhodamine
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	engl. ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	engl. real time polymerase chain reaction
SAMP1	engl. senescence-accelerated mouse P1
s.c.	subcutan
SCFA	engl. short chain fatty acid
sec.	Sekunden
SIBO	small intestinal bacterial overgrowth
spp.	Spezies (Mehrzahl)
subsp.	Subspezies
Stabw.	Standardabweichung
sog.	sogenannt
TCR	engl. T-cell receptor: T-Zellrezeptor
TEER	transepitheliale Resistenz
TGF	engl. tumor growth factor
TLI	engl. Trypsin-like immunoreactivity
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
Tr1-Zelle	engl. T regulatory 1-Zelle
TRD	engl. tylosin responsive diarrhea
UC	engl. ulcerative colitis: ulzerative Kolitis
UCDAI	engl. ulcerative colitis disease activity index
var.	Varietas
vRp	verdauliches Rohprotein
w	weiblich
WHO	engl. World Health Organization
wk	weiblich kastriert
WSAVA	engl. World Small Animal Veterinary Association
x g	Erdbeschleunigung

1 Einleitung

Unter dem Begriff “Chronische Enteropathie“ wird eine Gruppe von Erkrankungen zusammengefasst, denen eine Infiltration mit Entzündungszellen in die Lamina propria des Darmes gemeinsam ist. Unter diesem Begriff werden sowohl fütterungsabhängige (Food Responsive Diarrhea, FRD) und antibiotikaresponsive Erkrankungen (Antibiotic Responsive Diarrhea, ARD) als auch die Inflammatory Bowel Disease (IBD) subsummiert (Allenspach et al. 2007). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen werden als häufigste Ursache für chronischen Vomit und Diarrhoe bei Hund und Katze angesehen (Guilford 1996). Da die Ätiologie ungeklärt ist, stellt das Management der Patienten oft eine große diagnostische und therapeutische Herausforderung dar. Die Diagnostik ist sehr aufwändig und die Therapie häufig unbefriedigend.

Mithilfe von Tiermodellen wurden drei kritische Bereiche identifiziert, die in die Pathogenese involviert sind. Dabei handelt es sich um die intestinale Mukosabarriere, ein fehlgesteuertes Immunsystem und eine Dysbiose der intestinalen Mikrobiota (German et al. 2003b). Da Probiotika einen positiven Einfluss auf diese Faktoren besitzen können, sollte die Wirksamkeit eines aus Hunden isolierten probiotischen Keimes unter klinischen Bedingungen geprüft werden. Dazu wurden in einer doppelblinden, plazebokontrollierten und randomisierten Interventionsstudie über einen Zeitraum von zwei Jahren an drei verschiedenen Einrichtungen 32 Hunde rekrutiert und über 90 Tage beobachtet. Ziel der Arbeit war es, anhand klinischer, verdauungsphysiologischer und immunologischer Parameter und anhand des Einflusses der Intervention auf die Mikrobiota des Verdauungstraktes die Effizienz des Probiotikums *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 als unterstützende Therapie bei Hunden mit chronischer Enteropathie zu evaluieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Immunologische Grundlagen

2.1.1 Das Immunsystem

Das Vorhandensein eines effektiven und effizienten Immunsystems ist für die Abwehr externer Noxen von zentraler Bedeutung. Das Immunsystem besteht prinzipiell aus zwei funktionellen Komponenten: dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie gegen Infektionserreger dar. Seine Aufgabe ist die Beendigung einer Infektion vor dem Ausbruch einer Erkrankung und es besteht aus ständig vorhandenen oder schnell reagierenden chemischen und zellulären Abwehrmechanismen. Es umfasst physikalische Barrieren (z.B. Haut und Schleimhaut), lösliche Faktoren wie antimikrobiell wirksame Peptide und phagozytierende Zellen. Es ist insofern unspezifisch und besitzt kein „Gedächtnis“, reagiert also bei erneuter Exposition mit demselben Antigen (AG) wie bei dem ersten Aufeinandertreffen.

Das erworbene Immunsystem hingegen hat die Fähigkeit, selektiv auf Antigene reagieren zu können. Lymphozyten sind die wesentliche Zellfraktion und werden in B- und T-Lymphozyten und Natural Killer (NK)-Zellen unterteilt (Playfair und Baron 1995; Tizard 2008). Eine Aktivierung des erworbenen Immunsystems hat die Bildung von Gedächtniszellen und Antikörpern (AK) aus und durch B-Lymphozyten bzw. der aktiven Form, der Plasmazelle zur Folge, die die Basis für eine effektive Immunantwort bei erneuter Exposition mit dem AG darstellen. Reife B-Zellen exprimieren Antikörper der Klasse IgM und IgD. Nach Ausdifferenzierung zur Plasmazelle werden Antikörper sezerniert. Geschieht dies in Abwesenheit von Zytokinen, wird IgM sezerniert. Unter dem Einfluss von Zytokinen reifen Plasmazellen heran, welche auch IgG, IgA und IgE sezernieren. Dies wird als „Isotype-Switch“ bezeichnet. Die verschiedenen Zellklone der T-Zellen generieren eine enorme Zahl strukturell einzigartiger Antigen-Rezeptoren, die ein weites Spektrum fremder Moleküle binden können. Die Bildung dieser Rezeptoren erfolgt nach dem Zufallsprinzip und begünstigt somit das Erkennen eines größeren Spektrums von Antigenen. Die Bildung ist nicht antigen-spezifisch, so dass auch unbekannte antigene Epitope erkannt werden können. Das erworbene Immunsystem braucht allerdings einige Tage, um effizient wirken zu können. Etwa 15 % der Lymphozyten im Blut von Säugetieren sind weder T- noch B-Lymphozyten, sondern gehören zur dritten Lymphozytenpopulation, den Natural-Killer-Zellen. Im Gegensatz zu T- und B-Zellen, die als ruhende Zellen zirkulieren und einige Tage zur Aktivierung benötigen, können NK-Zellen nahezu unmittelbar durch Interferon, das von virusinfizierten Zellen gebildet wird oder Il-12, das von Makrophagen gebildet wird, aktiviert werden. Sie gelangen schnell ins Gewebe und attackieren dort „unnormale“ Zellen. Sie exprimieren keinen antigen-spezifischen Rezeptor, sondern nutzen verschiedene Kombinationen von Rezeptoren veränderter Zellen. Eine Immunantwort auf eine Infektion umfasst angeborene und erworbene Mechanismen, die Art der Antwort hängt von Ursprung und Natur des Antigens ab (Playfair und Baron 1995; Calder 2007; Tizard 2008).

T-Lymphozyten besitzen auf ihrer Oberfläche einen antigen-spezifischen T-Zellrezeptor (TCR), der aus einer konstanten und einer variablen Domäne besteht. Die konstante Domäne, auch CD3 (CD = Cluster of differentiation) genannt, ist der signalübertragende Teil des TCR, die variable Domäne stellt den Kontakt zum Antigen her und besteht aus zwei V-förmig angeordneten Ketten. Anhand der Art dieser Ketten unterscheidet man zwei T-Zell-Populationen: die $\alpha\beta$ -T-Zellen besitzen eine α - und eine β -Kette, die $\gamma\delta$ -T-Zellen eine γ - und eine δ -Kette (Tizard 2008; Murphy et al. 2009). Die beiden Populationen unterscheiden sich bezüglich ihrer Verteilung im Körper. Im Blut finden sich beim Hund vor allem $\alpha\beta$ -T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen findet man unter anderem in der Darmmukosa und nur zu etwa 1-4 % im Blut (German et al. 1999b). Eng mit dem TCR assoziiert sind außerdem die Costimulatoren CD4 und CD8. Je nachdem, welches dieser beiden Moleküle sich auf der Oberfläche befindet,

unterscheidet man $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen, die sich wiederum in ihrer Funktion unterscheiden. $CD4^+$ -T-Zellen, auch T-Helfer (Th)-Zellen genannt, erkennen Antigene, wenn sie mithilfe eines Major Histocompatibility Complex- (MHC)II-Moleküls auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) präsentiert werden. $CD8^+$ -T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, erkennen das Antigen in Kombination mit dem MHCI-Molekül. Ob ein Antigen mit einem MHCI- oder MHCII-Molekül präsentiert wird, hängt von der Art des Antigens ab. Wird der Erreger aus dem Extrazellularraum aktiv in eine Zelle aufgenommen, wird er intrazellulär in Peptide abgebaut und anschließend mit einem MHCII-Molekül auf der Oberfläche präsentiert, wodurch $CD4^+$ -T-Zellen in Aktion treten. Hat der Erreger jedoch die Zelle selbstständig befallen, so werden seine Abbauprodukte durch ein MHCI-Molekül auf der Oberfläche präsentiert und aktivieren die $CD8^+$ -T-Zellen. Folglich müssen $CD4^+$ -T-Zellen Mechanismen ausüben, durch die extrazelluläre Antigene vernichtet werden und $CD8^+$ -T-Zellen solche, durch die intrazelluläre AG vernichtet werden. $CD4^+$ -T-Zellen werden anhand eines ihnen spezifischen Zytokinprofils in Th1- und Th2-Zellen unterteilt. Ob aus einer $CD4^+$ -T-Zelle eine Th1- oder eine Th2-Zelle wird, hängt von dem Zytokinmuster ab, das von der APC gebildet wird.

Eine Th1-Immunantwort zielt auf die Aktivierung von Makrophagen ab, die das AG phagozytieren und anschließend zerstören (Playfair und Baron 1995; Jungi 2000; Tizard 2008; Murphy et al. 2009).

Th2-Zellen werden als die eigentlichen T-Helfer-Zellen bezeichnet, da sie für die Antikörper-Produktion von B-Zellen unerlässlich sind. Th2-Zellen stimulieren die B-Zell-Proliferation und die Antikörperproduktion. Die Antikörper (Immunglobuline – Ig) IgG und IgM lösen den klassischen Weg der Komplementkaskade aus. Die Hauptwirkungen von Komplement sind die Freisetzung von Peptiden mit inflammatorischer Wirkung, die Anlagerung von C3b, einem Opsonin, mit folgender Phagozytose und Membranschädigung und anschließender Lyse der befallenen Zelle. Die Funktion von Antikörpern ist außerdem die Neutralisierung von Antigen (AG), indem sie sich mit dem AG verbinden und so die Anheftung an die Zielzelle verhindern (Playfair und Baron 1995; Jungi 2000; Tizard 2008; Murphy et al. 2009). Die Reaktionen von Th-Zellen sind relativ langsam, da ihre Zytokine nach Aktivierung erst synthetisiert werden müssen. Nach Erkennung des Antigens durch die variable Domäne des TCR mit anschließender Signaltransduktion wird ein komplexer intrazellulärer Mechanismus ausgelöst, der zur Dissoziation der Transkriptionsfaktoren NF κ B und I κ B führt, die im Ruhezustand aneinander gebunden vorliegen. Nach der Dissoziation wandert NF κ B in den Kern und führt zur Transkription der Zytokine. Einige Medikamente wie Kortikosteroide sind in der Lage, die Dissoziation von NF κ B und I κ B zu verhindern und wirken so antiinflammatorisch (Playfair und Baron 1995; Jungi 2000; Tizard 2008; Murphy et al. 2009). Die Reaktion von $CD8^+$ -T-Zellen ist im Vergleich zu der der $CD4^+$ -T-Zellen viel schneller. Nach erfolgter Bindung der $CD8^+$ -T-Zelle an den AG-MHCI-Komplex, der von der APC präsentiert wird, kommt es zur Freisetzung kalziumabhängiger lytischer Granula mit zytotoxischen Effektorproteinen (Perforine, Granzyme) durch die T-Zelle, die die Apoptose der APC induzieren. Die apoptotische Zelle wird anschließend von Makrophagen aufgenommen und abgebaut, ohne dass Erreger freigesetzt werden. Bei der Bindung des TCR an den Liganden kommt es zur Neusynthese der Granula. So kann eine $CD8^+$ -T-Zelle nacheinander zahlreiche Zielzellen vernichten. $CD8^+$ -T-Zellen sind aber auch zur Produktion von Zytokinen fähig, die die Lipiddoppelschicht der Zielzelle durchdringen und die Apoptose induzieren. Dies geschieht unter anderem durch den Fas-Liganden CD95L, der in der Zelle, die den nötigen Rezeptor besitzt, eine Apoptose auslöst. Ein weiterer Mechanismus, dessen sich die $CD8^+$ -T-Zelle bedient, ist die Produktion von IFN- γ , das die Virusreplikation hemmen und unter Umständen das Virus eliminieren kann, ohne die Zelle zu töten. Außerdem lockt es Makrophagen an, die die befallene Zelle phagozytieren und zerstören (Playfair und Baron 1995; Jungi 2000; Tizard 2008; Murphy et al. 2009)

2.1.2 Das Immunsystem des Darmes

Der Darm ist einer Vielzahl von Antigenen ausgesetzt, von denen die Mehrheit toleriert (endogene Mikrobiota, Nahrungsantigene) und andere kontrolliert bzw. eliminiert werden, insbesondere pathogene Bakterien, Viren und Pilze. Außer dem Immunsystem des Darmes (Gut-associated lymphoid tissue, GALT) tragen angeborene, protektive Mechanismen zur Gesunderhaltung des Darmes bei. Dazu zählen strukturelle Komponenten wie die epithelialen tight junctions, die schnelle Erneuerung der Darmepithelzellen, die Mikrovillimembran und die oberflächliche Mukusschicht. Funktionelle Komponenten sind die Peristaltik und Sekrete wie die Magensäure und proteolytische Enzyme (Guilford 1996; Haller 2005). Das GALT ist das größte zusammenhängende Immunsystem des Körpers und umfasst Orte, in denen eine Immunantwort induziert wird („inductive sites“) und Effektororte („effector sites“) (Bauer et al. 2006; Murphy et al. 2009). Zu den induktiven Orten zählen die Peyerschen Plaques und die lymphoiden Knötchen, die verteilt in der Darmwand liegen.

Die Effektororte sind das intestinale Epithel mit den sich dort befindenden Lymphozyten (Intraepitheliale Lymphozyten, IEL) und die Lymphozyten der Lamina propria (Lamina propria-Lymphozyten, LPL). Die intestinalen Epithelzellen (intestinal epithelial cells, IEC) bilden eine Barriere zwischen dem Lumen und den Lamina propria-Immunzellen. Sie erkennen Mikroorganismen über diverse Rezeptorsysteme (Stokes und Waly 2006).

Die Lymphozyten des GALT weisen eine Besonderheit auf: Sie besitzen auf ihrer Oberfläche das Molekül $\alpha 4\beta 7$, das für die Wanderung der Lymphozyten von den induktiven zu den Effektororten notwendig ist. Der Rezeptor des Selektins $\alpha 4\beta 7$ ist das MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule), das sich auf Venolen mit hohem Endothel, beispielsweise in den Peyerschen Plaques befindet. Dadurch bleibt eine Immunantwort, die im Darm ausgelöst wird, weitgehend darauf beschränkt. Aktivierte Lymphozyten können jedoch auch in die Zirkulation und anschließend in andere Schleimhautsysteme des Körpers gelangen (wenn dort der entsprechende Rezeptor exprimiert wird) und dort ihr Antigen präsentieren oder wieder zurück in den Darm gelangen. Das Einfangen von Lymphozyten mit dem Oberflächenmolekül $\alpha 4\beta 7$ mithilfe des Rezeptors MAdCAM-1 wird als *homing* bezeichnet. Im Epithel und in der Lamina propria befinden sich daher aktivierte Lymphozyten oder Gedächtniszellen (Halstensen et al. 1990), wobei es Hinweise gibt, dass es sich beim Hund zum Teil auch um naive Zellen handeln könnte (German et al. 1999a). Die IEL besitzen allerdings einen etwas anderen Oberflächenrezeptor, das $\alpha E\beta 7$. Dieses Molekül bindet an E-Cadherin, das sich an der basolateralen Membran der Enterozyten unter den tight junctions befindet. Die Lymphozyten, die ins Epithel migrieren und dann als IEL unter den Enterozyten lokalisiert sind, sind vorrangig $CD8^+$ -T-Zellen (Elwood et al. 1997; German et al. 1999a; Sonea et al. 2000). Die $CD8^+$ -Zellen bilden eine zytotoxische Effektorpopulation, die der ersten Abwehr viraler Infektionen dient und bei zellulärem Stress und neoplastischer Entartung aktiviert werden (Blumberg und Balk 1994; Blumberg 1998). Der TCR der $CD8^+$ -T-Zellen kann nicht nur aus einer α - und einer β -Kette, sondern auch aus einer γ - und einer δ -Kette bestehen. $\gamma\delta$ -TCR-positive- $CD8^+$ -T-Zellen können einen $\alpha\alpha$ -Corezeptor besitzen. Diese Zellen binden an eine besondere Art der MHC-Rezeptoren – das MHC Ib, das sich nur auf den Enterozyten befindet. Durch die Bindung kommt es zur Suppression der T-Zell-Funktion. Somit wird die Schädigung der Enterozyten durch T-Zellen verhindert (Tizard 2008). Besitzen diese T-Zellen aber einen aktivierenden NK-Rezeptor, kommt es zur Abtötung der Enterozyten (Murphy et al. 2009). Die Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

Die B-Zellen der Lamina propria liegen vor allem in ihrer ausdifferenzierten Form, der Plasmazelle vor (Halstensen et al. 1990; Jergens et al. 1996), die in 40-80 % der Fälle IgA produzieren (German et al. 2000a; Stokes und Waly 2006). IgA ist das häufigste Immunglobulin der mukosalen Sekrete (Brandtzaeg 1995). Es verhindert im Lumen die Diffusion von Antigenen durch die Gykokalix auf der Oberfläche der Epithelzellen, blockiert

die Bindung an Oberflächenrezeptoren von Epithelzellen, inhibiert die Motilität von Antigenen (AG) oder vermittelt den Einschluss des AG im Mukus (Corthesy und Kraehenbuhl 1999). Es ist außerdem möglich, dass sich IgA-Dimere an spezifische Antigene heften und so die Adhäsion mit der Mukosa verhindern, ohne dass das Komplementsystem oder die antikörper-abhängige Zytotoxizität vermittelt wird, um dann mit dem restlichen Darminhalt abtransportiert zu werden. IgA vermittelt also einen lokalen Schutz, ohne dass eine entzündliche Reaktion entsteht (Riemann und Martin 1996). Häufiger als Plasmazellen sind beim Hund T-Zellen in der Lamina propria anzutreffen (Jergens et al. 1996; Stonehewer et al. 1998). Die T-Zellen der Lamina propria sind vor allem CD4⁺-Lymphozyten (Elwood et al. 1997; German et al. 1999a). Der dort vorherrschende T-Helfertyp, die CD4⁺-Th2-Zellen (Abreu-Martin und Targan 1996), bilden bei entsprechender Stimulation Zytokine, die die Produktion von IgA fördern. Die Dichte der CD4⁺-Lymphozyten steigt von der Krypte zum Villus deutlich an (Duodenum, Spitze: 20,0 ± 4,4 %, Mitte: 12,0 ± 6,1 %, Basis 10,6 ± 4,5 %; angegeben ist der Anteil an positiven Zellen pro 10000 µm²) (German et al. 1999a). Es gibt keine signifikanten Unterschiede der Dichte der CD4⁺-Lymphozyten in den einzelnen Dünndarmabschnitten (Elwood et al. 1997). Die CD4⁺-T-Zellen sind weitgehend unempfindlich für TCR-medierte proliferative Signale und tragen durch die Produktion regulatorischer Zytokine zur Immunhomöostase bei (Khoo et al. 1997; Haller 2005).

2.1.3 Die Orale Toleranz (OT) gegenüber Nahrungs- bzw. Futtermitteln

Die OT ist definiert als eine spezifische immunologische Nichtreaktivität auf einen Stimulus mit einem Antigen, die durch seine vorherige Verfütterung induziert wurde (Weiner 1997; Garside 1999). Physiologischerweise reagiert das Immunsystem nicht auf Nahrungsmittelantigene und die kommensale Mikrobiota. Antigene, die mit Pathogenen assoziiert sind, lösen im Darm jedoch eine Immunantwort aus, was darauf hinweist, dass das mukosale Immunsystem zwischen potentiell schädlichen und harmlosen Antigenen unterscheiden kann (Mueller und Jenkins 1995; Finkelman et al. 1996; Healy und Goodnow 1998; Viney et al. 1998). Diese Fähigkeit ist essentiell, um eine protektive Immunantwort bilden und aber auch um die Entwicklung einer unangemessenen Immunantwort verhindern zu können (Garside und Mowat 2001). Ein Beispiel für eine unangemessene Immunantwort sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Inflammatory Bowel Disease (IBD)), die vermutlich aus einer Störung der oralen Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen oder kommensalen Bakterien resultieren (siehe 2.2) (Smith et al. 2000).

Es sind mehrere Mechanismen bekannt, die zu einer oralen Toleranz beitragen können, doch die genauen Zusammenhänge und exakten Mechanismen sind derzeit noch unklar. Bei den bekannten Mechanismen handelt es sich um die klonale Anergie von T-Zellen, um deren klonale Zerstörung und um die Induktion regulatorischer T-Zellen.

Klonale Anergie

Wird ein Antigen (AG) einer CD4⁺-Zelle mithilfe eines MHC-Moleküls präsentiert, ist nicht nur der Kontakt zwischen dem TCR und dem Antigen notwendig, um die T-Zelle zur Proliferation anzuregen, sondern es bedarf außerdem der Bindung eines costimulatorischen Moleküls auf der T-Zelle an seinen Liganden auf der antigen-präsentierenden Zelle (APC). Findet diese Costimulation nicht statt, kommt es zur Anergie – zur Nichtreaktivität der T-Zelle und somit zu keiner Effektor- oder Helferfunktion (Murphy et al. 2009). Eine Anergie kann experimentell durch die einmalige Verabreichung einer sehr großen Antigenmenge erzeugt werden (Mowat et al. 2004).

Klonale Zerstörung

Die einmalige Verabreichung einer sehr großen Antigenmenge kann jedoch auch zur klonalen Zerstörung antigenspezifischer T-Zellen führen. Dies konnte anhand der Zerstörung von CD4⁺-T-Zellen durch Apoptose nach oraler Verabreichung löslichen Ovalbumins an TCR-transgene Mäuse *in vivo* demonstriert werden (Chen et al. 1995). Allerdings konnte in einer

anderen Untersuchung eine orale Toleranz auch bei fas-defizienten Mäusen (fas = Apoptose-Rezeptor) induziert werden (Garside und Mowat 2001), die Bedeutung bleibt also unklar.

Regulatorische T-Zellen

Viele Studien haben bestimmte CD4⁺-T-Zellen als wichtigste regulatorische T-Zellpopulation identifiziert. Dazu zählen folgende Zellen: Th3-Zellen, regulatorische T-Zellen Typ1 (Tr-1), CD45RB^{low}CD4⁺- oder CD25⁺CD4⁺-T-Zellen. Sie erzeugen ihren Effekt vermutlich vor allem durch die Produktion regulatorischer Zytokine wie Il-10 und TGF- β (Weiner 1997; Garside et al. 1999; Smith et al. 2000; Garside und Mowat 2001; Mowat et al. 2004).

2.2 Chronische Enteropathien beim Hund

2.2.1 Einleitung

Unter dem Begriff „Chronische Enteropathien (CE)“ wird eine Gruppe chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zusammengefasst. Sie sind durch eine Infiltration von Entzündungszellen in die Lamina propria des Darmes gekennzeichnet und können als Gastritis, Gastroenteritis, Enteritis, Kolitis oder als Enterokolitis auftreten (Suter 2006). Die Diagnose beruht auf klinischen, bildgebenden und labordiagnostischen Verfahren, ist also eine Ausschlussdiagnose und ist letztlich durch die histologische Untersuchung von Schleimhautbiopsien einzugrenzen (Allenspach und Gaschen 2003). Zu dem Formenkreis der CE zählen die idiopathische Inflammatory Bowel Disease (IBD), die antibiotikaresponsive Diarrhoe (Antibiotic Responsive Diarrhea, ARD) und die futterreaktive Diarrhoe (Food Responsive Diarrhea, FRD) (Allenspach et al. 2007; Fogle und Bissett 2007). Früher zählte man auch die bakterielle Überwucherung des Dünndarms (Small Intestinal Bacterial Overgrowth, SIBO) dazu, bei der die Bakterienkonzentration im oberen Dünndarm erhöht ist und die angenommen wurde, wenn die Bakterienzahl im Chymus des Duodenums bei $> 10^4$ /ml Anaeroben oder bei einer Gesamtzahl von 10^5 KBE/ml lag (Williams et al. 1987; Batt et al. 1988). Da der Dünndarm des Hundes im Vergleich zum Menschen physiologischerweise relativ stark besiedelt ist (Johnston 1999) und da es Hunde gibt, die den Grenzwert überschreiten, ohne klinische Symptome zu zeigen (Simpson 1994; Willard et al. 1994b), besteht eine große Kontroversität über diese Begriffsdefinition. Möglicherweise existieren zwei Syndrome, die sekundäre SIBO und die idiopathische ARD. Die sekundäre SIBO entsteht sekundär durch Erkrankungen wie eine exokrine Pankreasinsuffizienz (EPI) oder eine Motilitätsstörung (German 2009). Die Unterscheidung in IBD, ARD und FRD erfolgt retrospektiv anhand der Reaktion auf die Therapie (Allenspach et al. 2007). Bessert sich eine chronische Enteropathie, nachdem eine Eliminationsdiät gefüttert wurde und erleidet das Tier einen Rückfall bei der Provokation mit einem vorher bekannten Antigen, spricht man von einer FRD. Verschwinden Durchfall und die chronische Entzündung im Verlauf einer diagnostischen Antibiotikatherapie, spricht man von einer ARD (Suter 2006), ansonsten von einer IBD. Die Begriffe FRD und Futtermittelallergie werden häufig synonym gebraucht. Eine Futtermittelallergie ist definiert als eine nichtsaisonale, juckende Hauterkrankung, die mit Aufnahme einer Substanz in der Diät des Hundes assoziiert ist (Paterson 1995). Bei 10-15 % der Tiere treten neben Hautproblemen auch Magen-Darm-Symptome auf (Scott et al. 1995). Um den Begriff „Allergie“ zu rechtfertigen, muss der Beweis erbracht werden, dass es sich um eine immunmedierte Erkrankung handelt (Guilford 1994a). Eine FRD wiederum zeichnet sich durch gastrointestinale Symptome aus, die sich auf eine Eliminationsdiät bessern und auf eine Provokation wieder verschlechtern. Sie kann mit oder ohne Hautsymptome auftreten (Allenspach et al. 2007).

Weiterhin wurde der Begriff tylosinreaktive Diarrhoe (Tylosin Responsive Diarrhea, TRD) für eine chronische Enteropathie eingeführt, die sich auf die Verabreichung von Tylosin bessert (Westermarck et al. 2005a). Es handelt sich vermutlich um eine spezielle Form der ARD.

Aufgrund der im histologischen Biopsiefund dominierenden Zellart werden morphologisch verschiedene Untergruppen unterschieden. Die häufigsten Zelltypen sind Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophile Granulozyten (German et al. 2003b), je nach Zelltyp unterscheidet man lymphozytäre-plasmazytäre, eosinophile, granulomatöse und histiozytäre Entzündungstypen (Suter 2006). Am häufigsten tritt die lymphoplasmazelluläre Enteritis (LPE) auf (Hayden und Van Kruiningen 1982; Guilford 1996). Seltener auftretende Unterformen beim Hund sind die granulomatöse Enteritis, Kolitis und Enterokolitis (Guilford 1996) und die regionale Enteritis bzw. transmurale granulomatöse Enterokolitis (Guilford 1996; Fogle und Bissett 2007).

Außerdem gibt es Enteropathieformen, die nur bei bestimmten Rassen auftreten. Man unterscheidet die immunproliferative Enteropathie des Basenjis (Fox et al. 1965), die Proteinverlustenteropathie/-nephropathie des Soft Coated Wheaten Terriers (Littman et al. 2000), das Diarrhoesyndrom des Lundehunds (Flesja und Yri 1977) und die glutensensitive Enteropathie des Irish Setters (Batt et al. 1984; Hall und Batt 1992). Zu den auf Antibiotika ansprechenden, rassespezifischen Enteropathien zählt die histiozytäre ulzerative Kolitis des Boxers (Van Kruiningen et al. 1965) und die Enteropathie des Shar Pei (Hall und German 2005b). Die canine chronische Enteropathie (CE) ähnelt nur wenig der humanen CE, es gibt aber gewisse Ähnlichkeiten auf klinischer Ebene und im Pathomechanismus der Erkrankung (German et al. 2003b). Man unterscheidet beim Menschen die Erkrankungen Morbus Crohn (MC), ulzerative Kolitis (Ulcerative Colitis, UC) und die Pouchitis (Riemann und Martin 1996).

2.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie einer IBD ist unbekannt, es handelt sich um eine idiopathische Erkrankung. Sie wird vermutlich von umweltbedingten, immunologischen und genetischen Faktoren beeinflusst (German et al. 2003b; Geier et al. 2007).

Umweltbedingte Faktoren werden in Analogie zur Situation beim Menschen angenommen. Die humane IBD hat eine höhere Prävalenz in westlichen Ländern. Eine intensivere Hygiene und ein gehobener Lebensstil scheinen das Risiko zu erhöhen (Loftus und Sandborn 2002; Geier et al. 2007). Da eine diätetische Therapie bei bestimmten Formen der caninen IBD hilfreich ist, werden diätetische und mikrobielle Antigene als mögliche Ursachen betrachtet. Einige Enteropathieformen bessern sich infolge einer Antibiotikatherapie (Guilford 1996; Westermarck et al. 2005a; Fogle und Bissett 2007). Gelegentlich werden Stress oder Futterwechsel als auslösende Ursache identifiziert (Hall und German 2005b).

Weiterhin werden **immunologische Faktoren** diskutiert. Möglicherweise kommt es bei disponierten Tieren zu einer dysregulierten Immunantwort auf die intestinale Mikrobiota, bei der eine Überreaktivität von Effektorlymphozyten auftritt und regulatorische Lymphozyten und antiinflammatorische Zytokine nicht mehr in der Lage sind, die Entzündung zu kontrollieren (German et al. 2003b; Bamias et al. 2005; Fogle und Bissett 2007).

Genetische Faktoren scheinen beteiligt zu sein, da bestimmte Hunderassen prädisponiert sind und bestimmte Formen nur bei bestimmten Rassen oder Zuchtlinien auftreten (Guilford 1996; Jergens 1999; German, Hall et al. 2003). Besonders Hunde kleiner Rassen wie Yorkshire Terrier, West Highland White Terrier oder Dachshunde sind von einer steroidresponsiven Enteropathie bzw. einer Proteinverlustenteropathie betroffen (Allenspach et al. 2007). Eine lymphoplasmazelluläre Enteritis (LPE) und eine Small Intestinal Bacterial Overgrowth (SIBO) treten beim Deutschen Schäferhund (DSH) gehäuft auf (Hayden und Van Kruiningen 1982; Batt et al. 1983; German et al. 2003b). Für eine lymphoplasmazelluläre Kolitis (LPC) scheinen Boxer und wiederum der DSH prädisponiert, für eine eosinophile Gastroenteritis (EGE) ebenfalls der DSH und der Rottweiler (Guilford 1996). Es gibt allerdings keine offensichtliche Geschlechtsprädisposition (Hall und German 2005b).

Eine FRD tritt vor allem bei jüngeren Hunden und auch in Kombination mit Hautsymptomen auf (Hall und German 2005b; Allenspach et al. 2007). Bei einer FRD ist der Dickdarm häufiger betroffen als der Dünndarm und die Schwere der klinischen Symptome ist geringer. Jüngere Hunde mit Dickdarmproblemen bessern sich häufig durch eine Eliminationsdiät (siehe 2.2.6) (Allenspach et al. 2007).

Die TRD betrifft vor allem mittelalte Hunde großer Rassen mit klinischen Symptomen, die auf eine Dünndarm- und Dickdarmerkrankung hinweisen. Der ätiologische Faktor ist bislang nicht identifiziert, reagiert aber sensitiv auf Tylosin (Westermarck et al. 2005a).

2.2.3 Pathogenese

Mit der Hilfe von Tiermodellen wurden drei „kritische Bereiche“ identifiziert, die in die Pathogenese von chronischen Enteropathien involviert sein können: die intestinale Mukosabarriere, das Immunsystem und die endogene Mikrobiota (German et al. 2003b).

Die Funktion einer gesunden Mukosa ist der Schutz vor Pathogenen und die Toleranz harmloser Antigene. Um die Relevanz der **Mukosabarriere** in der Pathogenese von IBD zu untersuchen, wurden Mäuse mit variabler Expression eines N-Cadherin-Mutanten im Dünndarm untersucht. Die Mutation resultiert im Verlust von E-Cadherin, verantwortlich für die Zelladhäsion und den Erhalt der epithelialen Integrität. Dort, wo diese Mutation exprimiert wurde, entwickelte sich eine chronische Entzündung (Hermiston und Gordon 1995). Kommt es durch eine unbekannte Ursache zu einer Störung der Integrität der Mukosabarriere, können normalerweise tolerierte Antigene, beispielsweise der endogenen Mikrobiota, körpereigene oder Futtermittelantigene die Mukosabarriere überwinden und in die Lamina propria gelangen. Dort wird eine Entzündung ausgelöst, in deren Verlauf sich CD4⁺-Zellen in Th1- und Th2-Zellen differenzieren. Die entstehende proinflammatorische Zytokinantwort der Th1-Zellen kann offenbar durch die regulatorischen T-Zellen und Th3-Zellen nicht ausreichend kontrolliert werden (Duchmann et al. 1995; Allez und Mayer 2004; Allenspach 2005). Es kommt zu einer überschießenden Produktion proinflammatorischer Zytokine, dadurch zu Gewebszerstörungen und einem Influx von Entzündungszellen (German et al. 2000; German 2001; German et al. 2001; Allenspach 2005), wodurch die Mukosabarriere beeinträchtigt wird. Die intraepithelialen Zellen, die als Antigen-präsentierende Zellen fungieren und selektiv Suppressorzellen aktivieren, werden vermindert und der Suppressormechanismus weiter beeinträchtigt (Guilford 1996). Einen großen Anteil an der Produktion proinflammatorischer Zytokine besitzen aktivierte Makrophagen. Die Gentranskription vieler inflammatorischer und immunregulatorischer Gene wird wiederum durch den Transkriptionsfaktor Nuclear Factor (NF)-κB reguliert (Atreya et al. 2008). In einer neueren Studie wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors eng mit der Pathophysiologie einer chronischen Enteropathie (CE) assoziiert ist und dass es durch eine erfolgreiche Therapie zu einer Herabregulierung kommt, da sich in der Lamina propria erkrankter Hunde deutlich mehr Makrophagen mit aktiviertem NF-κB fanden als in der Lamina propria gesunder Hunde und nach der Therapie deutlich weniger NF-κB-positive Makrophagen und Epithelzellen fanden als vor der Therapie. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung von NF-κB eng mit der Pathophysiologie einer CE assoziiert ist und dass es durch eine erfolgreiche Therapie zu einer Herabregulierung kommt (Luckschander et al. 2010). Auch Toll-like Rezeptoren (TLR) wurde bereits eine Rolle in der Pathogenese nachgewiesen. TLR spielen eine wichtige Rolle als primäre Sensoren eindringender Pathogene (McMahon et al. 2010). Eine Aktivierung führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Shibolet und Podolsky 2007). Die Expression von TLR 2 und TLR 4 ist im Epithel humaner IBD-Patienten heraufreguliert (Cario und Podolsky 2000; Frolova et al. 2008; Szebeni et al. 2008). Für den Hund gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Es zeigte sich zwar in zwei Studien übereinstimmend, dass der Spiegel an TLR 2 mRNA bei kaniner IBD im Vergleich zu gesunden Hunden erhöht ist

(Burgener et al. 2008; McMahon et al. 2010), doch der Spiegel an TLR 4 mRNA erwies sich in zwei Studien erhöht (Burgener et al. 2008; Allenspach et al. 2010), in einer anderen jedoch unverändert (McMahon et al. 2010) im Vergleich zu gesunden Hunden. Möglicherweise entsteht die IBD auch primär durch eine Fehlsteuerung der Suppressormechanismen des GALT, sodass eine Immunreaktion gegen ein mikrobielles, ein körpereigenes oder ein Futtermittelantigen ausgelöst wird. Die Bedeutung regulatorischer Zytokine in diesem Prozess wurde in Tiermodellen nachgewiesen. So entwickeln Mäuse mit Defekten der regulatorischen Zytokine Il-10 und TGF- β eine intestinale Entzündung (Kuhn et al. 1993; Elson et al. 1995). Durch die Entzündung kommt es zu einer Änderung des Zytokinprofils. Während in der Humanmedizin für Morbus Crohn ein Th1-Profil und für die Ulzerative Kolitis ein Th2-Profil identifiziert werden konnte, war das bisher für die kanine LPE nicht möglich (Niessner und Volk 1995; German et al. 2000), allerdings gibt es Hinweise auf ein Th1-Profil (Ridyard et al. 2002). Bei einer Futtermittelallergie spielt möglicherweise gegen Futtermittelantigene gerichtetes IgE eine Rolle. Das futtermittelallergen-spezifische IgE bindet an die Oberfläche von Mastzellen und schließt so die Sensibilisierung ab. Kommt es zum Kontakt mit dem jeweiligen Antigen, verbinden sich zwei IgE-Moleküle auf den Mastzellen und bewirken so die Freisetzung inflammatorischer Moleküle wie Serotonin, Leukotriene und Histamin in die Lamina propria. Es ist fraglich, ob diese Theorie alle klinischen Symptome von Hunden mit Futtermittelallergien erklärt, da viele Hunde unter Erbrechen, Durchfall und Juckreiz leiden, lange nachdem sie mit dem auslösenden Antigen gefüttert wurden (August 1985; Elwood et al. 1994; Guilford 1994a; Hall 1994; Paterson 1995).

Dass die **endogene Mikrobiota** eine Rolle in der Pathogenese spielt, wurde mithilfe von Tiermodellen nachgewiesen. Es zeigte sich, dass Il-10-defiziente Mäuse mit einer normalen Darmmikrobiota eine intestinale Entzündung entwickelten, keimfreie Il-10-defiziente Mäuse jedoch nicht (Sellon et al. 1998).

2.2.4 Klinik inflammatorischer Darmerkrankungen

Chronisch inflammatorische Darmerkrankungen sind charakterisiert durch einen zyklischen Verlauf von symptomatischen und symptomfreien Phasen (Guilford 1996; German et al. 2003b). Mit dem Fortschreiten der Schwere der Erkrankung werden die Abstände kürzer und die Symptomphasen länger (Garcia-Sancho et al. 2007). Anhand der Symptome lässt sich der vorrangig betroffene Darmabschnitt identifizieren, doch sind die klinischen Symptome nicht immer spezifisch.

Durchfall und/oder Erbrechen sind die häufigsten Symptome. Typisch für eine Dünndarmentzündung sind Vomitus, wässrige Fäzes, ein großes Kotvolumen und in schwereren Fällen auch Meläna (Hall und German 2005b). Flatulenzen und Borborygmen werden ebenfalls häufig bei Dünndarmentzündungen beobachtet (Zentek et al. 2007). Weniger häufig treten Bauchschmerzen auf (Jergens 1999). Infolge von Malabsorption und verminderter Futteraufnahme kann bei Dünndarmentzündungen in 50 % der Fälle ein Gewichtsverlust auftreten (Craven et al. 2004).

Auf eine Dickdarmentzündung deuten geringere Kotvolumina bei einer erhöhten Kotabsatzfrequenz, Tenesmus, mukoide Fäzes und in schwereren Fällen auch eine Hämatochezie hin.

Das Vorhandensein von frischem Blut im Erbrochenen oder im Durchfall ist mit einer schwereren Form der Erkrankung assoziiert, besonders mit eosinophilen Entzündungszellinfiltraten (Hall und German 2005a). Eine schwere Erkrankung zeigt sich außerdem durch Gewichtsverlust und Proteinverlustenteropathie, einhergehend mit einer Hypoproteinämie und Aszites (Hall und German 2005b).

Der Appetit ist variabel. Durch starken Gewichtsverlust kann es zur Polyphagie kommen, während es bei einer schweren Entzündung häufig zu vermindertem Appetit kommt (Hall und German 2005b).

Eine Komplikation stellt die sekundäre Lymphangiektasie dar. Sie resultiert aus einer Blockade der Lymphgefäße oder aus einem erhöhten Venendruck. Die Lymphblockade kann durch eine Entzündung der Darmwand, wie sie bei IBD auftritt, entstehen. Es kommt zur Entzündung der Lymphgefäße durch die Migration der Entzündungszellen über den Lymphweg (Fogle und Bissett 2007). Die Erweiterung der Lymphgefäße im Darm führt zu einem Verlust von Proteinen über den Darm, es kommt zu einer „Proteinverlustenteropathie“. Durchfall ist das häufigste Symptom. Es handelt sich meist um Störungen der Dünndarmfunktion, doch kann auch der Dickdarm betroffen sein oder eine Kombination aus beidem auftreten. Erbrechen, Gewichtsverlust und Aszites sind häufig, treten aber nicht immer auf (Kull et al. 2001). Außerdem können periphere Ödeme und Thoraxergüsse zu beobachten sein (Allenspach et al. 2007). Yorkshire Terrier besitzen ein erhöhtes Risiko, an einer Protein-losing-Enteropathie (PLE) zu erkranken (Kimmel et al. 2000).

2.2.5 Diagnose und Differentialdiagnose

Die Diagnose einer IBD ist häufig nur im Ausschlussverfahren zu stellen und erfordert eine komplexe Untersuchung (Guilford 1996). Der Verdacht einer chronischen Enteropathie ist bei der Beobachtung persistierender oder intermittierender Symptome einer gastrointestinalen Erkrankung über mehrere Wochen gegeben. Der Begriff idiopathische IBD beschränkt sich auf Fälle, in denen histologisch der Beweis einer Entzündung erbracht wurde, ohne dafür eine Ursache zu finden. Alle anderen Ätiologien, einschließlich FRD und ARD sollten ausgeschlossen werden (Hall und German 2005b). Um den Verdacht einer chronischen Enteropathie zu bestätigen, müssen also zunächst alle bekannten Ursachen einer intestinalen Entzündung ausgeschlossen werden (Guilford 1996).

Anamnese, klinische Untersuchung und Blutuntersuchungen

Die Anamnese und die klinische Untersuchung geben erste Hinweise auf den betroffenen Darmabschnitt und ermöglichen es zudem, differentialdiagnostisch in Frage kommende Erkrankungen zu erkennen. Durch die Palpation des Abdomens können eventuelle Tumore diagnostiziert oder auch verdickte Darmschlingen oder Bauchschmerzen festgestellt werden (Steiner 2005). Die Erfassung der Körperkondition (Body Condition Score, BCS) gibt Aufschluss über den Ernährungszustand (siehe 3.8.3) (Laflamme 1997).

Im **Blutbild** kann gelegentlich eine Neutrophilie mit oder ohne Linksverschiebung auftreten, eine Eosinophilie kann auf eine eosinophile Gastroenteritis hinweisen, ist jedoch nicht für sie pathognomonisch oder gar immer vorhanden. Eine normozytäre normochrome nichtregenerative Anämie kann auf eine chronische Entzündung und eine regenerative Anämie auf einen chronischen Blutverlust durch blutende Ulzera hindeuten, eine Thrombozytopenie stellt eine seltene extraintestinale Manifestation dar (Guilford 1996; Ridgway et al. 2001; Hall und German 2005b).

IBD ruft keine pathognomonischen Veränderungen der **blutchemischen Werte** hervor, allerdings können Erkrankungen anderer Organsysteme wie Nieren- oder Lebererkrankungen damit ausgeschlossen werden (Hall und German 2005b). Hypoalbuminämie und Hypoglobulinämie treten bei einer begleitenden Proteinverlustenteropathie, aber auch bei Blutungen auf. Im Zusammenhang mit einer Proteinverlustenteropathie kann vermutlich durch den Verlust von albumin-gebundenem Kalzium auch eine Hypokalzämie auftreten. Eine Malabsorption wiederum führt zu einer Hypocholesterinämie. Gelegentlich kann es durch die chronische intestinale Entzündung zu einer reaktiven Hepatopathie und somit zu einer milden Erhöhung der Leberenzymwerte kommen (Hall und German 2005b).

Die Kombination von hämatologischen und klinisch-chemischen Parametern ist zum Ausschluss eines Hypoadrenokortizismus sinnvoll. Hinweise sind eine nichtregenerative Anämie, Leukozytose, Lymphozytose, Eosinophilie und ggr. Neutropenie in Kombination mit Hyponatriämie und Hyperkaliämie (Nelson 2010).

Durch Untersuchungen des **Blutserums** sind Erkrankungen des Pankreas (exokrine Pankreasinsuffizienz (EPI) und chronische Pankreatitis) auszuschließen. Cobalamin (Vitamin B₁₂), Folsäure und das C-Reaktive Protein (CRP) sind Parameter mit einer Bedeutung im Krankheitsgeschehen, die ebenfalls im Serum bestimmt werden können. Unter physiologischen Bedingungen sezerniert das exokrine Pankreas Verdauungsenzyme und Zymogene, die über das Gangsystem des Pankreas' in den Darm gelangen. Ein kleiner Teil wird jedoch auch in das Blut abgegeben. Das in das Blut gelangende Trypsinogen kann mithilfe des TLI (Trypsin-like-Immunoreactivity)-Testes bestimmt werden. Werden zu wenige Verdauungsenzyme gebildet (EPI), gelangt auch ein geringerer Teil ins Blut, wodurch ein verringerter TLI-Wert entsteht. Die geringere Menge an Verdauungsenzymen führt zu einer Maldigestion und somit zu Durchfall (Wiberg et al. 1999; Westermarck et al. 2005b). Der TLI-Test wird derzeit als der am besten geeignete Pankreasfunktionstest angesehen (Wiberg et al. 1999).

Auch eine chronische Pankreatitis ist ein möglicher Auslöser für chronischen Durchfall. Allerdings werden andere klinische Symptome bei dieser Erkrankung häufiger beobachtet (Anorexie, Erbrechen). Der sicherste Nachweis dieser Erkrankung erfolgt über die Bestimmung der caninen PLI (Pankreatische Lipase Immunreaktivität), die sich als hoch spezifisch erwiesen hat (Steiner et al. 2001).

Cobalamin ist ein wasserlösliches Vitamin, das an Nahrungsproteine gebunden aufgenommen wird. Die Nahrungsproteine werden im Magen verdaut, das Cobalamin wird freigesetzt und an das R-Protein (Haptocorrin) gebunden. Dieses Protein wird im Dünndarm verdaut und durch die Bindung an einen intrinsischen Faktor und das Andocken dieses Komplexes an den Rezeptor Cubilin im Ileum absorbiert (Levine et al. 1984). Bei schweren distalen Dünndarmerkrankungen führt die Zerstörung dieser Rezeptoren zur Malabsorption (Batt und Morgan 1982; Batt et al. 1983), doch erst bei langanhaltender Malabsorption werden die körpereigenen Speicher geleert und es kommt zu einem Cobalaminmangel. Da Cobalamin für viele biochemische Reaktionen essentiell ist, kommt es bei einem Mangel zu schwerwiegenden metabolischen Veränderungen (Ruaux et al. 2001a; Ruaux et al. 2001b). Beim Menschen ist eine Villusatrophie, eine Infiltration der Darmmukosa mit Entzündungszellen, eine weitere Cobalaminmalabsorption und die Malabsorption anderer Nährstoffe als Reaktion auf einen Cobalaminmangel nachgewiesen (Arvanitakis 1978), auch beim Hund gibt es dafür Hinweise (Williams et al. 1987; Morgan und McConnell 1999). Diese Veränderung kann zu einem Circulus virtuosus führen, der nur therapeutisch zu durchbrechen ist. Der oben erwähnte intrinsische Faktor wird zu 90 % vom exokrinen Pankreas gebildet, was erklärt, warum der Cobalaminwert auch bei exokriner Pankreasinsuffizienz vermindert ist (Batt et al. 1991).

Folsäure, ein wasserlösliches Vitamin, wird über das Futter meist als Folsäurepolyglutamat aufgenommen. Im proximalen Dünndarm erfolgt die Abspaltung der Glutamatmoleküle durch eine spezifische Konjugase. Das verbleibende Folsäuremonoglutamat wird durch spezifische Rezeptoren des proximalen Dünndarms absorbiert. Die Konjugase oder die Rezeptoren können bei einer Entzündung geschädigt werden, was in hochgradigen Fällen zu einer Malabsorption und nach Leerung der körpereigenen Speicher nach längerer Zeit zu einem Mangel führt. Ein Folsäuremangel tritt also bei Erkrankungen des proximalen Dünndarms und diffusen Dünndarmerkrankungen auf (Batt und Morgan 1982; Pibot et al. 2006). Ein Vitamin B₁₂-Mangel und ein Folsäureüberschuss deuten auf eine bakterielle Überbesiedlung des Dünndarms hin (SIBO), da Bakterien Vitamin B₁₂ binden und Folsäure produzieren (Batt et al. 1983; Rutgers et al. 1995). Diese Parameter zeigen jedoch keine verlässliche Korrelation mit der Bakterienzahl oder der Ansprechbarkeit auf Antibiotika (Walkley und Neiger 2000; German et al. 2003a).

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Akute-Phase-Protein, dessen Serumkonzentration bei humaner IBD mit dem Krankheitsschweregrad und dem histologischen Entzündungsgrad

korreliert. So ist ein Rückfall prognostizierbar, die Unterscheidung von IBD und funktionellen Darmstörungen möglich und der Effekt der Arzneimitteltherapie beurteilbar (Solem et al. 2005). Das C-Reaktive Protein wird bei Entzündungen durch die Hepatozyten synthetisiert und sezerniert und dient der Opsonierung. Für den Hund gibt es widersprüchliche Ergebnisse zu dessen Nützlichkeit in der Diagnosestellung und im Monitoring. Es erwies sich einerseits als nützlich, um Rückfälle zu prognostizieren, aber nicht, um den Krankheitsschweregrad zu bestimmen (McCann et al. 2007). In einer weiteren Studie hingegen korrelierte es mit der Schwere der Erkrankung (Jergens et al. 2003). Außerdem ist es wenig spezifisch, da es auch bei Entzündungen an anderen Orten des Körpers erhöht ist.

Untersuchung der Fäzes

Eine parasitologische Untersuchung der Fäzes, die Testung auf Giardien mittels Antigen-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) und eine bakteriologische Untersuchung zum Ausschluss obligat pathogener Keime sollten durchgeführt werden. Manche Autoren empfehlen eine routinemäßige Therapie mit Fenbendazol, da Giardien intermittierend ausgeschieden werden und deshalb auch bei einer bestehenden Infektion nicht sicher nachgewiesen werden können (Hall und German 2005b).

Bildgebende Verfahren

Eine Röntgenuntersuchung dient dem Erkennen strukturell-anatomischer Veränderungen des Magen-Darm-Traktes und möglicherweise dem Ausschluss intestinaler Fremdkörper (Hall und German 2005b). Häufig fallen gas- oder flüssigkeitsgefüllte Darmschlingen auf. Ein sichererer Ausschluss von Obstruktionen und Invaginationen kann über Kontraströntgen mit Bariumsulfat erbracht werden. Bei einer lymphoplasmazellulären Kolitis findet sich möglicherweise eine mangelnde Dehnbarkeit des Kolons, eine generalisierte Verdickung und Unregelmäßigkeit des Kolons, Schleimhautulzerationen oder Strikturen und in schweren Fällen eine Verkürzung des Kolons (Guilford 1996; Hall und German 2005b).

Eine abdominale Ultraschalluntersuchung ist jedoch die sicherste Untersuchung zum Ausschluss intestinaler Fremdkörper und Invaginationen und sie erlaubt zudem die Beurteilung der Darmwanddicke (Penninck et al. 1989), ihrer Struktur und ihrer Schichtung sowie der regionalen Lymphknoten und ermöglicht die Suche nach Neoplasien oder Obstruktionen. Eine verdickte Darmwand korreliert nicht mit den Veränderungen bei einer IBD (Rudorf et al. 2005). Bei einer Lymphangiektasie treten hyperechogene Stippchen und Streifen in der Mukosa auf (Sutherland-Smith et al. 2007). Durch die Entzündung sind abdominale Lymphknoten häufig vergrößert. Um diese von einem Lymphom zu unterscheiden, ist eine Feinnadelaspiration möglich (Hall und German 2005b). Außerdem ist eine abdominale Ultraschalluntersuchung ein gutes diagnostisches Hilfsmittel zum Ausschluss einer Pankreatitis (Nelson 2010). Die unveränderte Magenwand ist etwa 3-5 mm dick (Penninck et al. 1989; Lamb 1990; Lüerssen und Janthur 1998). Nach Rudorf et al. (2005) beträgt die Darmwandstärke im Duodenum bis 4 mm, der Bereich 4-6 mm wird als „Grauzone“ bezeichnet. Werte über 6 mm weisen auf einen krankhaften Befund hin. Ebenso verhält es sich bei Werten über 4,7 mm im Jejunum. Die Wandstärke ist jedoch abhängig vom Körpergewicht des Hundes (Rudorf et al. 2005).

Endoskopie und histologische Beurteilung

Eine Endoskopie mit Biopsieentnahme ist zur abschließenden Diagnose nötig, um u. a. weitere intestinale Erkrankungen wie ein intestinales Lymphom auszuschließen und die beteiligten Entzündungszellen zu bestimmen. Wichtig ist die Probenentnahme von unterschiedlichen Lokalisationen, da die Veränderungen fokal auftreten können und stets die Entnahme aus allen erreichbaren Darmabschnitten, da auch Bereiche betroffen sein können, auf die die klinischen Symptome keinen Hinweis ergaben. Die Entnahme von Biopsien ist prinzipiell aus allen Darmabschnitten außer dem Jejunum möglich. Auch eine Entnahme von Ileumbiopsien ist möglich, indem von rektal her das Endoskop durch die Ileozäkklappe geführt wird. Sollte das mit dem Endoskop nicht möglich sein, kann die Biopsiezange auf

diesem Wege auch blind hindurchgeführt werden (Hall und German 2005a). Da bei einer Endoskopie nur oberflächliche Schleimhautproben entnommen werden können, ist nicht immer eine Diagnose möglich. In einigen Fällen ist die Entnahme einer Probe der gesamten Darmwand, einer sogenannten Full-thickness-Biopsie im Zuge einer Laparotomie nötig (Hall und German 2005b). Diese Art der Probengewinnung ist in einigen Fällen zur Diagnose einer Lymphangiektasie oder eines Lymphoms der endoskopischen Probengewinnung überlegen (Kleinschmidt et al. 2006). Makroskopisch erscheint das Duodenum in 50 % der Fälle normal (Guilford 1996).

Für die einer IBD entsprechenden histologischen Veränderungen wurden zwar verschiedene Bewertungsschemata vorgeschlagen, es gab aber lange Zeit keine allgemein anerkannten Richtlinien. Die Bewertung erfolgte subjektiv und hing stark von der individuellen Einschätzung des Untersuchers ab. Die histologische Evaluierung ist zudem nach wie vor stark von der Qualität der Biopsien abhängig (Willard et al. 2002). Bei der histologischen Untersuchung werden Schleimhautoberfläche/Epithelaufbau, zelluläre Zusammensetzung und Zelldichte der Lamina propria, Zotten- bzw. Kryptenaufbau sowie Qualität und Verteilungsmuster entzündlicher Infiltrate beurteilt (Münster et al. 2006). Der histologische Entzündungsgrad korreliert jedoch nicht mit der Prognose und der Schwere der Erkrankung (Craven et al. 2004). Aufgrund der fehlenden Richtlinien wurde von der WSAVA eine „Gastrointestinal Standardisation Group“ gebildet, in der sich Spezialisten bemühten, Richtlinien für die histopathologische Untersuchung und Beurteilung aufzustellen. Im Jahr 2008 veröffentlichte diese Gruppe einen Artikel, in dem für die am häufigsten biopsierten Bereiche des Magen-Darm-Traktes (Magenkorpus, -antrum, Duodenum, Kolon) Beispielbilder vorgestellt wurden, anhand derer die Beurteilung erfolgen soll. Für jeden dieser Abschnitte gibt es ein Beispielbild für den physiologischen Zustand, milde, moderate und schwere Manifestationen. Dabei sind morphologische Abnormalitäten und der Haupttyp des Entzündungszellinfiltrats abgebildet. Zu jedem Bild gibt es zusätzlich einen Text, in dem die Schlüsselmerkmale jedes Bildes beschrieben sind (Day et al. 2008). In einer aktuelleren Veröffentlichung wurden zudem die Verfahren für die Endoskopie und für Biopsieentnahme und -versand standardisiert (Washabau et al. 2010). Für eingehendere Informationen sei auf diese Veröffentlichungen verwiesen. Nach Schreiner et al. (2008) und German et al. (2001) ist eine Unterscheidung zwischen einer Food-Responsive Diarrhea und Inflammatory Bowel Disease (IBD) allein mit der histopathologischen Untersuchung von Schleimhautbiopsien nicht möglich. German et al. (2001) stellten eine signifikant niedrigere Anzahl an Mastzellen in der duodenalen Lamina propria bei Hunden mit IBD fest. Dies kann laut Kleinschmidt et al. (2007) entweder auf eine Degranulation von Mastzellen oder auf ein „Ausdünnen“ durch eine erhöhte Anzahl an T-Zellen zustande kommen. Das Vorhandensein von eosinophilen Granulozyten kann auf eine Hypersensibilität hindeuten (Fogle und Bissett 2007).

Beurteilung der Schwere der Erkrankung

Um die Schwere der Erkrankung zu beschreiben, eignet sich der Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI – siehe 3.8.1) (Jergens et al. 2003). Mittels CIBDAI lassen sich jedoch Dünndarm- nicht von Dickdarmerkrankungen unterscheiden. Deshalb gab es in jüngerer Zeit Versuche, den Aktivitätsindex zu modifizieren, um eine bessere Aussage zu ermöglichen (Allenspach et al. 2007; Garcia-Sancho et al. 2007).

Diagnosestellung

Letztlich ist auch durch die histologische Untersuchung der Schleimhautbiopsien keine Unterscheidung zwischen einer Inflammatory Bowel Disease (IBD), einer Food Responsive Diarrhea (FRD) und einer Antibiotic Responsive Diarrhea (ARD) möglich. Die Diagnose wird deshalb anhand des Ansprechens auf die Therapie gestellt. Reagiert ein Hund allein auf eine diätetische Therapie, ist von einer FRD auszugehen. Andere Autoren sprechen erst dann von einer FRD, wenn die Hunde bei der Rückkehr zur ursprünglichen Diät wieder Symptome entwickeln und bei erneuter diätetischer Intervention wieder in Remission gehen (Allenspach

2005). Von einer ARD spricht man, wenn der Hund unter diätetischer Therapie und Antibiose in Remission kommt. Von einer IBD wird gesprochen, wenn keine andere Ursache ermittelt werden kann.

2.2.6 Therapie

Bei der Therapie einer chronischen Enteropathie handelt es sich in der Regel um eine Probiotherapie, die zunächst dem Ausschluss einer FRD und ARD dient und mit diätetischen Interventionen beginnt. Dafür wird eine **Eliminationsdiät** zusammengestellt, die eine Proteinquelle enthält, mit der der Patient bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in Kontakt gekommen ist (Hall und German 2005b). Als Kohlenhydratquelle bieten sich Reis, Kartoffeln, Maisstärke oder Tapioka an, da sie kein Gluten enthalten (Hall und German 2005b; Meyer und Zentek 2010). Eine hypoallergene Diät ist nicht nur zum Ausschluss einer FRD von Vorteil, sondern ist auch bei einer IBD indiziert, da vermutet wird, dass Futtermittelantigene in der Pathogenese eine Rolle spielen könnten. Die Diät sollte außerdem hochverdaulich, bedarfsdeckend und nicht zu proteinreich sein (ca. 8-10 g vRp je 1 MJ umsetzbarer Energie), da viele Patienten Nährstoffdefizite aufweisen und die Gefahr einer Dysbiose der intestinalen Mikrobiota besteht (Guilford 1996; Meyer und Zentek 2010). Ebenfalls auf der Eliminierung von Futtermittelantigenen basieren Diäten mit hydrolysiertem Protein. Die Proteine in diesen Diäten werden durch Hydrolyse so verkleinert, dass sie kleiner sind als die üblichen Futtermittelantigene (10-70 kD) und deshalb theoretisch nicht mehr allergen wirken (Lehrer et al. 1996; Fogle und Bissett 2007). Es ist derzeit aber noch unklar, ab welcher Molekülmasse ein Protein keine Immunantwort auslöst. Es besteht auch die Befürchtung, dass die chemische Verdauung versteckte antigene Epitope aufdecken könnte, durch die sich neue adverse immunologische Reaktionen entwickeln könnten (Davis und Williams 1998). Die empfohlene Dauer der Eliminationsdiät schwankt je nach Autor zwischen 2 und 10 Wochen (Rosser 1993; Jergens 1999; Suter 2006; Fogle und Bissett 2007). Verschwinden die Symptome im Verlauf der Eliminationsdiät, sollte eine Provokation mit einem bereits bekannten Futtermittelantigen durchgeführt werden. Treten die Symptome wieder auf, kann die Diagnose FRD oder Futtermittelallergie gestellt werden.

Aufgrund der möglicherweise beeinträchtigten Vitaminabsorption sollte der Gehalt an Vitamin A und E und gegebenenfalls B-Vitaminen auf das 2-3fache der Empfehlung für den Erhaltungsbedarf angehoben werden. Pflanzliche Faserstoffe sind geeignet, um die Motilität anzuregen (Zentek 2000).

Bringt die Eliminationsdiät nicht den gewünschten Erfolg, ist der Einsatz eines **Antibiotikums** wie *Metronidazol*, *Tylosin* oder *Tetrazyklin* indiziert, da auch für bakterielle Antigene eine Rolle in der Pathogenese vermutet wird. Auch bei einer vermuteten bakteriellen Überbesiedlung, angedeutet durch einen verringerten Cobalamin- und einen erhöhten Folsäureserumspiegel, ist der Einsatz sinnvoll (Fogle und Bissett 2007). Die Wirksamkeit ist vermutlich durch eine Veränderung der Populationsdynamik der intestinalen Mikrobiota bedingt, bei der das Gleichgewicht in Richtung der Spezies oder Subtypen verschoben wird, bei denen es weniger wahrscheinlich ist, dass sie in die Pathogenese involviert sind (Fogle und Bissett 2007). Möglicherweise erreichen Tetrazykline ihre Effekte aber auch durch ihre immunmodulatorischen Eigenschaften (Amin et al. 1996; Attur et al. 1999; Patel et al. 1999). Sie reparieren biochemische Defekte (Batt et al. 1988) und bauen die normale Permeabilität wieder auf (Hall und Batt 1990). So können weniger Bakterien die Darmschranke überwinden. Auch für Metronidazol, Ciprofloxacin und einige Makrolid-Antibiotika wie Tylosin gibt es darauf Hinweise (Bahr und Ullmann 1983; De Simone et al. 1984; Shryock et al. 1998; Bamias et al. 2002; Westermarck et al. 2005a).

Spricht der Patient auf die antibiotische Therapie an, ist von einer ARD zu sprechen. Wird dadurch jedoch kein Erfolg erzielt und ist histologisch der Beweis einer idiopathischen Entzündung des Darmes erbracht, kommen **Immunsuppressiva** zum Einsatz. Am gängigsten

ist derzeit *Prednisolon*. Bei schwerer IBD sollte es parenteral verabreicht werden. Sobald die Symptome abgeklungen sind, wird die Dosis sukzessive reduziert (Fogle und Bissett 2007). Aufgrund der Kombination immunsuppressiver Effekte, v.a. auf die T-Lymphozyten, wird Prednisolon oft genutzt, um die intestinale Lymphozyteninfiltration zu reduzieren (Fogle und Bissett 2007). Nebenwirkungen sind ein iatrogenes Hyperadrenokortizismus, Polyurie/Polydipsie, aber auch thromboembolische Erkrankungen, opportunistische Infektionen und Muskelschwund (Fogle und Bissett 2007; Plumb 2011). Meiden sollte man lang wirkendes *Dexamethason*, da es eine suppressive Wirkung auf die Enterozyten hat (Hall und German 2005b).

Budenosid ist ebenfalls ein Glukokortikoid, das beim Menschen eine potente topische antiinflammatorische Aktivität auf die gastrointestinale Mukosa besitzt. Beim Hund zeigten sich keine signifikanten glukokortikoidassoziierten Nebenwirkungen (Tumulty et al. 2004). Allerdings beeinflusst es den Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere, was möglicherweise zu einer iatrogenen adrenalen Insuffizienz bei einem rapiden Therapieabbruch führen kann und sollte deshalb nur bei Hunden eingesetzt werden, bei denen unter der konventionellen Therapie intolerable Nebenwirkungen auftreten. Bis mehr pharmakokinetische und klinische Informationen für den Hund erhältlich sind, ist der Routineeinsatz von Budenosid nicht empfehlenswert (Fogle und Bissett 2007).

Das Zytostatikum und Immunsuppressivum *Azathioprin* wirkt als begleitende Therapie bei refraktärer IBD. Es wird angenommen, dass es seine meisten immunsuppressiven Effekte durch Induktion der T-Zellapoptose auslöst. Es kann eingesetzt werden, wenn Prednisolon allein ineffektiv ist oder ein iatrogenes Hyperadrenokortizismus aufgetreten ist. Außerdem ist der Einsatz sinnvoll, wenn die zur Erhaltung der Remission benötigte Prednisolondosis zu hoch wäre. Als Nebenwirkungen sind eine Knochenmarktoxikose und eine Hepatotoxikose bekannt (Fogle und Bissett 2007; Plumb 2011). Aufgrund der Knochenmarkspression sollte bei einer begleitenden Thrombozytopenie darauf verzichtet werden (Ridgway et al. 2001).

Mykofenolat Mofetil ist ein Immunsuppressivum, das beim Menschen zur Behandlung von Morbus Crohn und Ulzerativer Kolitis eingesetzt wird (Radford-Smith et al. 1999; Fellermann et al. 2000; Orth et al. 2000). Es kann die intestinale Lymphozyteninfiltration und die Teilung der Lymphozyten in der Lamina propria reduzieren. Es wird als Kombination mit anderen Arzneimitteln wie Glukokortikoiden eingesetzt, um eine Vielzahl autoimmuner Erkrankungen zu behandeln. Es gibt jedoch noch keine klinischen Studien über die Nutzung bei kaniner LPE (Fogle und Bissett 2007).

Cyclosporin A wird zur Behandlung einer schweren IBD eingesetzt, die auf die konventionelle Therapie nicht anspricht (German et al. 2003b). Es greift an der Funktion von T-Lymphozyten durch die Inhibition des T-lymphocyte-stimulating growth factors und die Beeinträchtigung der Il-2-Transkription an und induziert die Aktivität zytolytischer Lymphozyten (Hess et al. 1981; Vaden 1995). Cyclosporin A könnte auch bei Hunden hilfreich sein, die unempfindlich für andere Formen der immunsuppressiven Therapie sind. Bei steroidrefraktärer IBD zeigte sich eine Reduktion klinischer Symptome und der T-Zellzahl in duodenalen Biopsien. In 12 von 14 Fällen konnte ein zufriedenstellender Erfolg erzielt werden (Allenspach et al. 2006).

Bei Kolitis finden auch *Salicylate* wie Sulfasalazin, Olsalazin und Mesalazin als 5-Aminosalicylsäure freisetzende Präparate in der Therapie Anwendung. Sulfasalazin besteht aus 5-Aminosalicylat und Sulfapyridin. Die Mikrobiota des Dickdarms spaltet diese Verbindung (Leib 2000; Washabau und Holt 2005; Plumb 2011), Sulfasalazin kann also nur bei Dickdarmerkrankungen eingesetzt werden (Leib 2000; Fogle und Bissett 2007; Plumb 2011). 5-Aminosalicylat verursacht eine potente lokale Prostaglandin-Inhibition in der Dickdarmmukosa und wirkt antiinflammatorisch, antioxidativ, interferiert mit der Phagozytenchemotaxis und -funktion und inhibiert die Zytokin- und Immunglobulinproduktion. Eine wichtige Nebenwirkung ist die *Keratokonjunktivitis sicca*

(Plumb 2011). Bei einer gleichzeitigen Thrombozytopenie sollte aufgrund der Knochenmarksuppression auf Salicylate verzichtet werden (Ridgway et al. 2001).

Tritt Erbrechen als Symptom auf, ist der Einsatz von *Säureblockern* wie Ranitidin oder Omeprazol und von *Antiemetika* wie Maropitant oder Metoclopramid vorübergehend sinnvoll. Weist das Tier eine *Hypocobalaminämie* (<300 pg/ml) auf, erfolgt eine subkutane Substituierung des Vitamins. Hunde bis zu 5 kg erhalten dabei 250 µg, Hunde mit 5-15 kg 400 µg, Hunde mit 15-30 kg 800 µg, Hunde mit 30-45 kg 1200 µg und Hunde >45 kg 1500 µg (Schwierk und Steiner 2010). Die Substituierung erfolgt subkutan zunächst wöchentlich über 6 Wochen, 14tägig über ebenfalls 6 Wochen und einmalig nach weiteren 4 Wochen. Eine Korrektur des Wertes in einen normalen Bereich erfolgt innerhalb von 10 Wochen bei 100 % der Tiere (Allenspach et al. 2007).

Bei einer begleitenden Lymphangiektasie ist die Verabreichung einer fettreduzierten Diät sinnvoll. Liegen Ödeme und/oder Körperhöhlenergüsse vor, müssen Diuretika eingesetzt werden (Fogle und Bissett 2007).

2.2.7 Prognose

Bisher gibt es keinen Beweis dafür, dass die Art der enteralen Entzündung einen Einfluss auf das Behandlungsergebnis hat. Weder die Lokalisation der Entzündung (Dünndarm oder Dickdarm) noch die Qualität (wie z.B. ein eosinophiler Entzündungstyp) oder der histopathologische Schweregrad sind signifikant mit dem langfristigen Therapieergebnis assoziiert (Craven et al. 2004). Dennoch finden sich Assoziationen zwischen hohen Entzündungsgraden und ungünstigen Verläufen (Münster et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse erzielten Allenspach et al. (2007), die feststellten, dass stärker ausgeprägte Veränderungen im Duodenum einen Risikofaktor für einen negativen Ausgang darstellen. In dieser Untersuchung stellten sich ein hoher klinischer Aktivitätsindex, eine Hypocobalaminämie (<200 ng/l) und eine Hypoalbuminämie (<20 g/l) ebenfalls als Risikofaktoren heraus. Langfristig sind dauerhafte Remissionen in etwa 26 % der Fälle zu erwarten. In 50 % der Fälle kommt es zu rezidivierenden Verläufen, in etwa 12,5 % der Fälle zu therapierefraktären Verlaufsformen und in 4 % der Fälle zu einer unkontrollierbaren IBD (Craven et al. 2004). Etwas anders verhält es sich bei Hunden mit einer FRD. Reagieren diese schnell auf die Diät, besteht eine gute Langzeitprognose (Allenspach et al. 2007).

Die Prognose bei einer begleitenden Lymphangiektasie ist vorsichtig bis schlecht, ein Überleben von Monaten oder Jahren ist in Einzelfällen jedoch möglich (Fogle und Bissett 2007).

2.3 Die Darmmikrobiota

Der Gastrointestinaltrakt eines Fetus' ist *in utero* steril, wird jedoch vom Zeitpunkt der Geburt an besiedelt (Berg 1996). Die ersten Bakterien, die den Darm eines Neugeborenen besiedeln, stammen aus der Umwelt. Die maternale fäkale Mikrobiota stellt dabei die wichtigste Quelle dar. Die Mikrobiota Neugeborener unterscheidet sich noch stark von der Erwachsener (Moreau und Gaboriau-Routhiau 2000). Bei Säugetieren erfolgt beim Absetzen eine rapide Änderung der Zusammensetzung. Beim erwachsenen Tier findet sich schließlich eine dauerhafte, sich im Gleichgewicht befindende Darmmikrobiota (Berg 1996).

Die Mikrobiota des Gastrointestinaltraktes setzt sich nach Savage (1977) aus der autochthonen (endogenen) und der allochthonen Mikrobiota zusammen. Bei der autochthonen Mikrobiota handelt es sich um residente Mikroorganismen, die bei allen Individuen einer Spezies vorkommen. Sie wachsen fakultativ anaerob, sind das gesamte Leben im Gastrointestinaltrakt Adulter anzutreffen, kolonisieren bestimmte Habitate oder Nischen und bilden die Hauptpopulation. Die allochthone Mikrobiota besteht aus Mikroorganismen, die vorübergehend aufgenommen werden und deshalb nicht bei allen Individuen einer Spezies oder bei allen Tieren innerhalb einer Gemeinschaft vorhanden sind (Savage 1977; Berg 1996). Die Mikroorganismen sind nicht gleichmäßig im Gastrointestinaltrakt verteilt, sondern sind an

bestimmte Habitate angepasst. Bei den Habitaten handelt es sich um das intestinale Lumen, den Mukus über dem Epithel, tiefere Mukusschichten in den Krypten oder die Oberfläche des Mukosaepithels (Dubos et al. 1965; Berg 1996). Während der Magen und der obere Dünndarm aufgrund des niedrigeren pH-Wertes und der höheren Peristaltik relativ wenig besiedelt sind, ist das Kolon durch die geringere Motilität, die daraus resultierende längere Transitzeit und das sehr niedrige Redoxpotential Hauptsitz der Mikrobiota (Amtsberg et al. 1979; Berg 1996). Das Ileum stellt eine Übergangszone dar (Berg 1996). Die Mikroorganismen sind eng an ihr jeweiliges Habitat adaptiert und können somit in einem Darmabschnitt zur endogenen Mikrobiota gehören, in einem anderen aber nur transient vorhanden sein (Berg 1996).

Die Hauptmikrobiota des Dickdarms wird durch anaerobe Mikroorganismen gebildet, die die fakultativ anaerobe Population in ihrer Zahl um das 100-1000fache übersteigt. 99,9 % der endogenen Mikrobiota sind demnach obligat anaerob (Moore et al. 1969; Berg 1996). Die endogene Mikrobiota befindet sich hinsichtlich ihrer Zahl und ihrer Arten in einem Gleichgewicht, der sog. Eubiose (Amtsberg et al. 1979). Bei einer Dysbiose verschiebt sich das Gleichgewicht infolge pathologischer Zustände und es kommt zur Besiedlung ansonsten keimarmer Darmabschnitte oder zur qualitativen Verschiebung des Keimspektrums (Zentek 2000).

Studien an gnotobiotischen Tieren haben gezeigt, dass die Besiedlung des Gastrointestinaltraktes keimfreier Tiere mit nur einer Bakterienspezies grundlegende Einflüsse auf die morphologische, physiologische, biochemische und immunologische Entwicklung des Wirtes hat (Shroff et al. 1995; Berg 1996; Bauer et al. 2006). Die Mikrobiota besitzt demnach metabolische, trophische und protektive Funktionen und interagiert mit dem Immunsystem des Wirts (Guarner und Malagelada 2003). Metabolische Funktionen umfassen die Produktion von Vitamin K (Guarner und Malagelada 2003), Vitamin B₁₂ (Berg 1996), die Absorption von Ionen (Kalzium, Magnesium, Eisen) (Roberfroid et al. 1995; Guarner und Malagelada 2003) und vor allem die Fermentation von endogenem Mukus und unverdaulicher Reste (Roberfroid et al. 1995). Die Produktion kurzkettiger Fettsäuren führt dazu, dass Energie, die sonst für den Wirt verloren wäre, nutzbar gemacht wird. Der Wirt wird mit Substraten versorgt, die sofort absorbiert werden können, während die residente Mikrobiota vom Wirt mit Energie und Nährstoffen für das bakterielle Wachstum und die Proliferation versorgt wird (Leahy et al. 2005). Trophische Funktionen erfüllt die Mikrobiota durch die Förderung der epithelialen Zellproliferation und der Differenzierung (Gordon et al. 1997; Guarner und Malagelada 2003). Die Mikrobiota beeinflusst die Entwicklung und die Homöostase des Immunsystems (Guarner und Malagelada 2003) und bietet einen Schutz vor der Ansiedlung von Pathogenen durch die Ausbildung einer Barriere (Barriereeffekt), indem sie eine Konkurrenzsituation um Bindungsstellen (Bernet et al. 1994) und Wachstumsfaktoren innerhalb einer ökologischen Nische herstellt und auch Bakteriozine produzieren kann (Brook 1999; Lievin et al. 2000; Guarner und Malagelada 2003). Die Ausbildung einer Barriere verhindert zudem die Translokation von Bakterien aus dem Darm in den Körper (Berg 1996). Kommt es zu einer Störung des Ökosystems, kann es zu Überwucherungen und opportunistischen Infektionen kommen (Berg 1996).

2.3.1 Qualitative und quantitative Verteilung der kaninen Darmmikrobiota

Die oberen Dünndarmabschnitte sind physiologisch bedingt relativ wenig besiedelt, was auf die hohe Peristaltik, die antibakterielle Wirkung von Magen- und Gallensäure und den niedrigen pH-Wert zurückgeführt wird (Amtsberg et al. 1979). Im Vergleich zum Menschen jedoch ist der Dünndarm des Hundes stärker besiedelt (Johnston 1999; Zentek 2000). Die Keimzahlen steigen beim Hund vom Duodenum über das Jejunum zum Ileum deutlich an (Uchida et al. 1969; Zentek 2000), gleichzeitig nimmt der Anteil anaerober Mikroorganismen gegenüber aeroben zu (Zentek 2000). Die Gesamtzahl an aeroben und fakultativ aeroben

Keimen im Duodenum liegt etwa bei $\log 5,2-5,6/g$, anaerobe und fakultativ anaerobe liegen bei $\log 4,8/g$ (Zentek 2000). Im **Duodenum** bis **Jejunum** finden sich vor allem Laktobazillen (10^4-10^8 KbE/g Chymus) und Streptokokken (10^5-10^9 KbE/g Chymus). Bifidobakterien (10^4-10^6 KbE/g Chymus), *Bacteroides* spp. (10^4-10^7 KbE/g Chymus) und *Clostridium perfringens* (10^4 KbE/g Chymus) sind etwas weniger häufig vertreten (Uchida et al. 1969; Benno et al. 1992a). Neuere Studien, die mithilfe einer PCR 16SrRNA Genbibliotheken erstellten, identifizierten im Duodenum gesunder Hunde folgende bakterielle Phyla: *Firmicutes* (71,8 %, (Allenspach et al. 2010), 26,1 % (Suchodolski et al. 2010)), *Proteobacteria* (5,9 % (Suchodolski et al. 2010)), *Fusobacteria* (8,5 %, (Allenspach et al. 2010), 4,4 % (Suchodolski et al. 2010)), *Bacteroidetes* (7,7 %, (Suchodolski et al. 2010)), *Actinobacteria* (1,2 % (Allenspach et al. 2010), 4,4 % (Suchodolski et al. 2010)), *Deferribacteria* (0,3 % (Allenspach et al. 2010)), *Tenericutes* (0,3 % (Allenspach et al. 2010), 0,2 % (Suchodolski et al. 2010)), *Verrucomicrobia* (0,1 %, (Suchodolski et al. 2010)) und 5,3 % unklassifizierte Bakterien (Suchodolski et al. 2010). Im **Ileum** sind die Keimzahlen höher. Es finden sich regelmäßig *Escherichia (E.) coli* (10^7-10^8 KbE/g Chymus) und *Bacteroides* spp. (10^8 KbE/g Chymus). Sehr häufig finden sich auch Bifidobakterien, Laktobazillen und Eubakterien (je 10^7-10^8 KbE/g Chymus), aerobe Streptokokken (10^9 KbE/g Chymus) und *Clostridium perfringens* (10^7-10^9 KbE/g Chymus) (Zentek 1995). Am Ende des Dünndarms herrscht ungefähr ein Gleichgewicht zwischen aeroben und anaeroben Mikroorganismen (Zentek 1995; Zentek 2000).

Im Dickdarm begünstigen das sauerstoffarme Milieu und die geringe Peristaltik das Wachstum der Anaerobier (Amtsberg et al. 1979). Die Gesamtzahl an Bakterien beträgt im Kolon 10^9-10^{11} und im Rektum $10^{10}-10^{11}$ KbE/g Chymus (Uchida et al. 1969; Benno et al. 1992a).

Die Mikrobiota im **Dickdarm** besteht aus anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien. Die wesentlichen Keimgruppen unter den strikten Anaerobiern sind *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Coprococcus* spp. und *Ruminococcus* spp. (Williams Smith 1965; Uchida et al. 1969; Davis et al. 1977; Treschnak 1984; Benno et al. 1992a; Zentek 2000). Die fakultativ anaerobe Population wird vor allem durch *Enterobacteriaceae* in einer Konzentration von 10^6-10^{11} KbE/g Chymus, darunter besonders *E. coli* sowie durch *Lactobacillus* spp. und *Streptococcus* spp. gebildet (Zentek 2000). Staphylokokken kommen in geringerem Umfang vor (10^2-10^7 KbE/g).

In der **fäkalen Mikrobiota** finden sich weniger aerobe ($10^{8,2}-10^{9,6}/g$) als anaerobe ($10^{9,6}-10^{11}/g$) Mikroorganismen (Zentek 2000). Es wurden *Enterobacteriaceae* und Laktobazillen (Haenel und Müller-Beuthow 1956), Streptokokken, *Bacteroides* spp. und *Clostridium perfringens* (Williams Smith 1961; Amtsberg et al. 1979; Treschnak 1984; Ringel 1988) sowie *Enterococcus* spp. beschrieben (Zentek et al. 1998; Strompfova et al. 2004). Die Anzahl an Milchsäurebakterien wurde in einer neueren Studie mit $5,8 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^5$ KbE/g bestimmt (Beasley et al. 2006). Die fäkale Mikrobiota stellt sich individuell und saisonal unterschiedlich dar (Benno et al. 1992b).

2.4 Probiotika

2.4.1 Definition

Der Begriff „Probiotikum“ wurde erstmals von dem späteren Nobelpreisträger Ilya Ilyich Metchnikoff beschrieben. Metchnikoff nahm an, dass die Mikroorganismen in den Nahrungsmitteln es möglich machen, die Mikrobiota in unseren Körpern zu modifizieren und die schädlichen Mikroorganismen durch nützliche zu ersetzen (Metchnikoff 1907).

Etwa zur gleichen Zeit untersuchte der französische Pädiater Henry Tissier die infantile Diarrhoe. Er entdeckte in den Fäzes gesunder Kinder unregelmäßig Y-förmige Bakterien. Tissier nahm an, dass diese „bifiden“ Bakterien, die heute als *Bifidobacterium* bekannt sind,

genutzt werden können, um Patienten mit Diarrhoe zu behandeln und so den Wiederaufbau der gesunden Darmmikrobiota zu unterstützen (Tissier 1906).

Ein „Expert Consultation Meeting“ der FAO und WHO im Jahr 2001 entwarf eine einfache und derzeit oft genutzte Definition von Probiotika: „*Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die, wenn sie in einer adäquaten Menge verabreicht werden, dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen bieten*“ (FAO/WHO 2001).

2.4.2 Gesetzliche Vorgaben für den Einsatz von Probiotika in der Tierernährung

Der Einsatz von Probiotika in der Tierernährung wird mithilfe der **Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung** geregelt. Eingeordnet werden sie als Darmstabilisatoren (Def.: Mikroorganismen oder andere chemisch definierte Stoffe, die bei der Verfütterung an Tiere eine positive Wirkung auf die Darmflora haben) in der Gruppe der zootechnischen Zusatzstoffe (Def.: Jeder Zusatzstoff, der die Leistung von gesunden Tieren oder die Auswirkungen auf die Umwelt positiv beeinflussen soll) (Anhang I Abschnitt 4b).

Der Prozess der Zulassung ist sehr umfangreich und wird näher in der **Verordnung (EG) Nr. 429/2008 der Kommission vom 25. April 2008 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Erstellung und Vorlage von Anträgen sowie der Bewertung und Zulassung von Futtermittelzusatzstoffen** geregelt. Demnach liegt der Beantragung ein Dossier bei, dessen Inhalt sehr ausführlich in den Anhängen geregelt wird. In dem Antrag auf Zulassung müssen unter anderem eine Sicherheitsbewertung und eine Bewertung der Wirksamkeit enthalten sein. Sicherheitsbewertungen sind Untersuchungen, mit denen nachgewiesen werden soll, dass die Verwendung für die Zieltierart, den Verbraucher, exponierte Personen, Tier und Mensch insbesondere in Bezug auf Selektion und Verbreitung von Resistenzgenen und die Umwelt sicher ist. Die Bewertung der Wirksamkeit beruht auf Untersuchungen, mit denen die Wirksamkeit eines Zusatzstoffs im Hinblick auf die beabsichtigte Verwendung gemäß Artikel 6 Absatz 1 und Anhang I der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 (also in diesem Falle als zootechnischer Zusatzstoff) nachgewiesen werden soll (Verordnung (EG) Nr. 429/2008, Anhang II).

Für den Hund sind derzeit folgende Mikroorganismen zugelassen: Eine Zubereitung von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415, mikroverkapselt mit mindestens 5×10^9 KbE/g Zusatzstoff und eine Zubereitung von *Enterococcus faecium* DSM 10663/NCIMB 10415 als Pulver oder Granulat mit mindestens $3,5 \times 10^{10}$ KbE/g Zusatzstoff, gecoatet mit mindestens $2,0 \times 10^{10}$ KbE/g Zusatzstoff oder flüssig mit mindestens 1×10^{10} KbE/ml Zusatzstoff. Für den mikroverkapselten *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 liegt der Mindestgehalt pro kg Alleinfuttermittel bei $4,5 \times 10^6$ KbE und die Höchstdosis bei 2×10^9 KbE. Für alle anderen Zubereitungen von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 und *Enterococcus faecium* DSM 10663 liegt der Mindestgehalt pro kg Alleinfuttermittel bei 1×10^9 KbE und die Höchstdosis bei $3,5 \times 10^{10}$ KbE. Sonstige Bestimmungen sehen vor, dass in der Gebrauchsanweisung für den Zusatzstoff die Vormischung, die Lagertemperatur, die Haltbarkeit und die Pelletierstabilität anzugeben sind. Diese Probiotika sind nach den Verordnungen (EG) Nr. 102/2009 bzw. 1520/2007 unbegrenzt zugelassen (Anonym 2011).

2.4.3 Anforderungen an Probiotika

Um gesundheitsfördernde Effekte ausüben zu können, müssen Probiotika sicher sein und über gewisse technologische und funktionelle Eigenschaften verfügen (Saarela et al. 2000).

Die **Sicherheit** von Probiotika betreffend besteht die Anforderung der Apathogenität. Sie sollten in der Vergangenheit nicht mit Infektionen in Verbindung gebracht worden sein. Es gibt trotzdem einige Berichte über Infektionen mit Milchsäurebakterien beim Menschen. So wurden einige kommensale Bifidobakterien bereits mit bestimmten Zahn- und Lungeninfektionen, Bakteriämien, Abszessen und Endokarditiden in Zusammenhang gebracht

(Green 1978; Gasser 1994; Saarela et al. 2000). In den meisten Fällen war jedoch das einzige in Risikogruppe 2 eingeordnete *Bifidobacterium (B.) dentium* (früher *B. eriksonii*) betroffen (Meile et al. 2008). Das Risiko gesunder Konsumenten, die täglich Produkte mit Bifidobakterien zu sich nehmen, ist extrem gering. Da jedoch kein lebendes Bakterium als absolut sicher betrachtet werden kann und da Interaktionen eines jeden Stammes mit dem spezifischen Wirt beachtet werden müssen, ist es wichtig, alle neu eingesetzten Probiotika auf Stammebene klar zu identifizieren und Beweise für deren gesundheitlichen Nutzen und deren Sicherheit zu erbringen. Risiken bestehen vor allem für Individuen mit reduzierter Immunkompetenz (Meile et al. 2008).

Weiterhin sollten Probiotika keine Antibiotikaresistenzgene besitzen, die auf Bakterien der endogenen Mikrobiota und auf Enteropathogene übertragen werden könnten. Die meisten Bifidobakterien erwiesen sich resistent in verschiedenen Untersuchungen gegen Cefoxitin, Aztreonam, Kanamycin, Amikacin, Gentamicin, Fusidinsäure, Polymyxin B, Nalixidinsäure, Neomycin, Streptomycin, Vancomycin, Trimethoprim, Norfloxacin und Metronidazol (Miller und Finegold 1967; Matteuzzi et al. 1983; Charteris et al. 1998). Diese Antibiotikaresistenzen stellen jedoch ein natürlicherweise auftretendes, intrinsisches Speziescharakteristikum dar. Plasmidgebundene und damit übertragbare Antibiotikaresistenzen von Probiotika treten vor allem bei Enterobakterien und außerdem, allerdings seltener, bei Laktobazillen auf (Ishiwa 1980; Vescovo et al. 1982; Rinckel und Savage 1990).

Technologische Anforderungen an Probiotika bestehen unter anderem in einer Säurestabilität, da sie in der Humanernährung häufig in Form fermentierter Milchprodukte konsumiert werden (Lee und Salminen 1995). Sie sollten der Herstellung unter industriellen Bedingungen standhalten und ihre Lebensfähigkeit und Funktionalität bei Lagerung und im Lebensmittel erhalten. Außerdem dürfen sie Geschmack und Textur des Endproduktes nicht stören, müssen also gute sensorische Eigenschaften besitzen (Saarela et al. 2000).

Probiotika sollten weiterhin über gewisse **funktionelle Eigenschaften** verfügen. Dazu ist auch hier die Säurestabilität, aber auch eine Stabilität gegenüber Gallensäure zu zählen, um die Passage des Magens und Dünndarms zu überstehen und in lebender Form unter Erhaltung aller Funktionen am Wirkort anzukommen. Am Wirkort besteht die Notwendigkeit der Adhäsion an das intestinale Mukosaepithel (O'Sullivan et al. 1992; Saarela et al. 2000; Tuomola et al. 2001) und der Kolonisierung (Hoffmann und Kruis 2002). In diesem Zusammenhang wird häufig der Anspruch gestellt, dass das eingesetzte Probiotikum auch natürlicherweise bei der Spezies vorkommt, bei der es schließlich eingesetzt wird. Rinkinen et al. (2003b) zeigten allerdings, dass eine Adhärenz von Probiotika humanen Ursprungs auch bei Hunden möglich ist. Der Anforderung der Adhärenz liegt die Vermutung zugrunde, dass Probiotika einige ihrer Wirkungen über die durch die Adhärenz verursachte Verdrängung von Pathogenen und durch die Kommunikation mit dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe (gut-associated lymphoid tissue, GALT) erreichen (siehe auch 2.4.4). Außerdem persistieren Probiotika bei Adhärenz länger und können so besser ihre Wirkung entfalten (Saarela et al. 2000). Für die bisher beim Hund eingesetzten *Enterococcus*-Stämme konnten erhöhte Enterokokkenzahlen in den Fäzes (Molitor 1996; Weiß 2003; Mück 2007) und im Chymus (Molitor 1996; Zentek et al. 1998) nachgewiesen werden, was für eine Ansiedlung der Bakterien spricht. Auch probiotische Laktobazillen und *Bacillus cereus* konnten in den Fäzes nachgewiesen werden (Biourge et al. 1998; Baillon et al. 2004; Stropfova et al. 2006). Allerdings werden die meisten Probiotika kurz nach Ende der Verabreichung wieder vollständig ausgeschieden, da die Ansiedlung nur vorübergehender Natur ist (Molitor 1996; Biourge et al. 1998; Zentek et al. 1998; Weese und Anderson 2002; Manninen et al. 2006; Marcinakova et al. 2006; Stropfova et al. 2006; Mück 2007).

Probiotika müssen zudem einen **Effekt** besitzen – das heißt, ihre Wirksamkeit sollte *in vitro* und mithilfe von Tiermodellen und Untersuchungen am Menschen bestätigt und durch einen plausiblen Wirkmechanismus zu erklären sein (Sanders 2003).

2.4.4 Wirkungen von Probiotika

Probiotika werden folgende Wirkungen zugeschrieben: Sie führen zu einer Modifikation der Artenzusammensetzung, besitzen metabolische Effekte, üben einen Einfluss auf die Darmbarriere aus und nehmen Einfluss auf das lokale und systemische Immunsystem.

Die **Modifikation der Artenzusammensetzung** wird oft als Haupteffekt von Probiotika angesehen (Rolfe 2000; Isolauri 2001; Sanders 2003). Dies wird durch Erschöpfung oder Konkurrenz um Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Rezeptoren und Bindungsstellen, die Modifikation des Milieus und die Bildung von Bakteriozinen erreicht (Bourlioux et al. 2003; Parvez et al. 2006). Nährstoffe, die pathogene Mikroorganismen zum Leben benötigen, werden auch von Probiotika und den Mikroorganismen, deren Wachstum durch Probiotika stimuliert wird, verbraucht, wodurch eine Konkurrenzsituation entsteht (Fuller 1989).

Die kompetitive Inhibition bakterieller Adhäsionsstellen auf epithelialen Oberflächen als Folge der Veränderungen durch Probiotika ist ein weiterer möglicher Mechanismus zur Veränderung der Artenzusammensetzung (Rolfe 2000). Da die Adhäsion eine Voraussetzung für pathogene Mikroorganismen ist, um in die Darmschleimhaut eindringen zu können, wird ihnen so die Ansiedlung erschwert (Fuller 1989; Sissons 1989; Montes und Pugh 1993; Stavric und Kornegay 1995). Die Adhäsion von Probiotika erfolgt allerdings in der Regel an Muzinrezeptoren, nicht an Darmepithelzellen (Bourlioux et al. 2003). Der Antagonismus von Probiotika gegenüber pathogenen Keimen wurde mithilfe von *in vitro*-Untersuchungen am isolierten jejunalen Chymus von Hunden getestet. Verschiedene Milchsäurebakterien wurden dabei auf ihre Fähigkeit untersucht, die Adhäsion von *Staphylococcus intermedius*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Clostridium perfringens* und *Campylobacter jejuni* an die Darmschleimhaut zu verhindern. Alle verwendeten Milchsäurebakterien waren in der Lage, die Adhäsion von *Clostridium perfringens* signifikant zu reduzieren. Die untersuchten Stämme *Enterococcus faecium* M74 und *Enterococcus faecium* SF 273 zeigten allerdings eine Erhöhung der Adhäsion von *Campylobacter jejuni* (Rinkinen et al. 2003a). Auch *Lactobacillus animalis* LA4 bewirkte *in vitro* ein Absinken von *Clostridium perfringens* in fäkalen Kulturen (Biagi et al. 2007). Ein Absinken der fäkalen *Clostridium*-Zahlen beim Hund *in vivo* resultierte aus der Fütterung eines nicht näher definierten *Enterococcus faecium*-Stammes, von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415, *Enterococcus faecium* DSM 7134 und von *L. acidophilus* DSM 13241 (Vahjen und Männer 2003; Weiß 2003; Baillon et al. 2004; Mück 2007). Unbeeinflusst blieben sie durch einen *L. acidophilus*-Stamm in der Untersuchung von Pascher (2004).

Die Ausbildung eines ungünstigen Milieus für pathogene Bakterien wird durch die Produktion organischer Säuren als Stoffwechselprodukt (Milch-, Essig-, Propionsäure und Butyrat) (Bourlioux et al. 2003) und die Bildung von Wasserstoffperoxid erreicht. Organische Säuren senken den pH-Wert des Chymus, was zu ungünstigen Lebensbedingungen für potentiell schädliche Bakterien führt (Parvez et al. 2006). Die Produktion von Stoffwechselprodukten wurde bisher beim Hund sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Für *Enterococcus faecium* ergaben sich in Bezug auf die Laktatproduktion beim Hund *in vivo* und *in vitro* unterschiedliche Ergebnisse. So zeigte sich in der Untersuchung von Molitor (1996), dass die Laktatproduktion *in vitro* durch verschiedene Substrate (kohlenhydrat- oder proteinreich) und durch verschiedene Keimgehalte (10^6 - 10^9 KBE/g) beeinflusst wird. Beim Zusatz zu Ileumchymusproben stieg die Laktatproduktion tendenziell an. Auch Zentek et al. (1998) erzielten durch die Zugabe von *Enterococcus faecium* zu Ileumchymusproben tendenziell erhöhte Laktatwerte und einen gesenkten pH-Wert. *In vivo* jedoch blieben die Laktatwerte und auch der fäkale pH-Wert unbeeinflusst (Molitor 1996). *In vitro*-Versuche und die Verabreichung von Laktobazillen an Hunde *in vivo* riefen ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse hervor. Der Zusatz von *L. animalis* LA4 zu fäkalen Kulturen führte zu erhöhten Laktatwerten (Biagi et al. 2007), die Supplementierung von Hunden mit einem *L. acidophilus*-Stamm zu signifikant niedrigeren Laktatwerten in den Fäzes (Pascher 2004).

Für einige Probiotika ist desweiteren die Bildung von Bakteriozinen nachgewiesen. Bakteriozine sind plasmidkodierte Peptide, die das Wachstum anderer Bakterien hemmen (Tannock 1998). Sie sind definiert als proteinöse Substanzen, die von Bakterien synthetisiert werden und in der Regel ein enges Wirtsspektrum besitzen, da sie nur dieselben oder eng verwandte Spezies inhibieren (Tagg et al. 1976). Bakteriozine besitzen die Fähigkeit, andere Bakterien zu verdrängen oder ihr Wachstum zu unterdrücken (Boris und Barbes 2000). Bisher wurden nur wenige antimikrobielle Verbindungen von Bifidobakterien aufgereinigt und charakterisiert. Derzeit bekannte Bakteriozine sind das Bifidozin B von *B. bifidum* NCFB 1454 (Yildirim und Johnson 1998), Bifilact Bb-12 von *B. lactis* Bb-12 und Bifilong Bb-46 von *B. longum* Bb-46 (Saleh und El-Sayed 2004). Bifidozin B besitzt inhibitorische Aktivitäten gegenüber *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp. und *Leuconostoc* spp. (Yildirim und Johnson 1998). Bifilact Bb-12 und Bifilong Bb-46 inhibieren *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus* und *E. coli* (Saleh und El-Sayed 2004). Als bakteriozinähnliche Verbindungen werden antagonistische Substanzen bezeichnet, die noch nicht vollständig definiert sind oder nicht den Definitionsanforderungen eines Bakteriozins entsprechen (Boris und Barbes 2000). Verschiedenen Bifidobakterien werden zahlreiche bakteriozinähnliche Verbindungen zugeordnet, die noch nicht aufgereinigt und charakterisiert wurden. So produzieren beispielsweise *B. animalis* 30, 31 und 32 eine antimikrobielle Verbindung mit inhibitorischen Effekten gegenüber *Salmonella* Enteritidis (Bielecka et al. 1998).

Metabolische Effekte durch den Konsum von Probiotika werden durch die Produktion von Vitaminen (Folsäure, Niazin, Riboflavin) und kurzkettigen Fettsäuren, durch die Freisetzung protektiver Metabolite (Arginin, Glutamin, konjugierte Linolsäure) und den Einfluss auf Enzyme oder deren Produktion erzielt (Bourlioux et al. 2003; Parvez et al. 2006). Ein wichtiges Stoffwechselprodukt ist die kurzkettige Fettsäure Butyrat (die aber nicht durch Bifidobakterien gebildet wird; siehe 2.4.5.2), die als Energielieferant für die Epithelzellen des Kolons dient, so vermutlich die epitheliale Proliferationsrate erhöht und zur pH-Wertsenkung beiträgt (Salminen et al. 1998a; Tuohy et al. 2003). Der Einfluss von Probiotika auf Enzyme erhöht einerseits die Bioverfügbarkeit von Nährstoffen und kann möglicherweise beim Menschen der Krebsprävention dienen (Parvez et al. 2006). Der Abbau von Nahrungsantigenen und die Modifikation von Makromolekülen kann in der Behandlung von Nahrungsmittelallergien hilfreich sein (Schulz und Kunz 2002). Die Bildung der β -Galaktosidase kann man sich in der Behandlung der Laktoseintoleranz zunutze machen (Vesa et al. 2000). Es zeigte sich, dass Patienten mit einer Laktosemaldigestion die Laktose in Joghurt besser vertragen als die gleiche Menge an Laktose in Milch (Marteau et al. 1990). So zeigte *B. longum* zeigte einen positiven Effekt auf Patienten mit Laktoseintoleranz (Jiang et al. 1996). Probiotika sind aber auch dazu in der Lage, mutagene N-Nitrosamine abzubauen und so der Krebsprävention zu dienen (Rowland und Grasso 1975).

Der Einfluss von Probiotika auf verschiedene verdauungsphysiologische und metabolische Parameter des Hundes stellt sich unterschiedlich dar. So ergab sich ein positiver Einfluss eines *Lactobacillus acidophilus*-Stammes auf die Kotkonsistenz, die Kotabsatzfrequenz, die Trockensubstanz der Fäzes und die scheinbare Verdaulichkeit von Trockensubstanz, Rohprotein und Rohfett (Pascher 2004), während *Enterococcus faecium* DSM 7134, *Bacillus cereus* und ein anderer *L. acidophilus*-Stamm auf alle oder einige dieser Parameter keinen Einfluss nahmen (Biourge et al. 1998; Pasupathy et al. 2001; Mück 2007). Eine Senkung des Lipidgehaltes im Blut wurde durch *Enterococcus faecium* EE3 erzielt (Marcinakova et al. 2006), eine Erhöhung durch *L. fermentum* AD1 (Strompfova et al. 2006). *Enterococcus faecium* EE3 war außerdem dazu in der Lage, den Cholesterolspiegel in einen physiologischen Bereich zu korrigieren. Desweiteren zeigte sich der Gehalt an Gesamtprotein im Blut in einer Untersuchung erhöht (Strompfova et al. 2006), in einer anderen erniedrigt (Marcinakova et al. 2006).

Der Einfluss von Probiotika auf die **Darmbarriere** wird durch die Schaffung günstiger Lebensbedingungen für erwünschte Mikroorganismen und ungünstiger Lebensbedingungen für potentiell schädliche Mikroorganismen und durch die Beeinflussung der Synthese und Sekretion von Muzin erklärt (Parvez et al. 2006). Die Stärkung dieses „Barriereeffekts“ führt zu einer geringeren Translokation von Bakterien und Antigenen und senkt so das Risiko für Infektionen und Allergien (Parvez et al. 2006). Eine erhöhte Muzinproduktion erschwert die Anheftung und das Eindringen pathogener Bakterien an und in die Darmschleimhaut (Deplancke und Gaskins 2001). Das Prinzip des antidiarrhoischen Effekts von Probiotika könnte auch durch die Stimulation von Absorptionsvorgängen wie Glukose- oder Aminosäuren-/Peptid-gebundenen Transportvorgängen zustande kommen, bei denen es durch osmotische Vorgänge zu einer erhöhten Wasseraufnahme kommt (Ferraris et al. 1990; Winckler et al. 1999; Breves et al. 2000). Der Einfluss von Probiotika auf die Barrierenintegrität ist durch die Messung unidirektionaler Fluxraten der Markersubstanz Mannit als Prüfung der parazellulären Dichtheit der Darmschleimhaut möglich. In einer *in vivo*-Untersuchung mit *Bacillus cereus var. toyoi* und *Saccharomyces boulardii* an Schweinen konnten durch die postmortale Entnahme von Darmproben um 34 % reduzierte Mannitfluxraten durch *Bacillus cereus var. toyoi* im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Winckler 1997). In einer *in-vitro*-Studie zeigte sich, dass das probiotische Mischpräparat VSL#3 nach der Inkubation von T84-Zellmonolayers (eine humane Kolonkarzinomzelllinie) mit pathogenen *E. coli*- und *Salmonella* Dublin-Stämmen in der Lage ist, die Verminderung der transepithelialen Resistenz (TEER) zu verhindern (Otte und Podolsky 2004).

Mikroorganismen spielen eine Hauptrolle in der Entwicklung und Funktion des **intestinalen Immunsystems** (Bauer et al. 2006). Die initiale Kolonisierung des Darmes zum Zeitpunkt der Geburt mit einer ausgewogenen Darmmikrobiota ist von zentraler Bedeutung für die normale Entwicklung und Reifung des Immunsystems (Ouweland et al. 2002a). Probiotika üben einen Einfluss sowohl auf das unspezifische als auch auf das spezifische Immunsystem auf lokaler Ebene und aber auch systemisch aus (Parvez et al. 2006). Als Parameter zur Beurteilung des Aktivierungsstatus des Immunsystems wird häufig die Phagozytoseaktivität – ein Parameter des unspezifischen Immunsystems – herangezogen (Guilliams 1999). So führte die Verabreichung von *L. acidophilus* an pathogenfreie Mäuse, die eine Woche später mit *E. coli* infiziert wurden, zu einer erhöhten *E. coli*-Clearance durch Phagozyten bei den mit Probiotika behandelten Mäusen (Neumann et al. 1998). Bei Hunden zeigte sich im Lymphozytenproliferationstest eine erhöhte Phagozytenaktivität und eine erhöhte Stimulationsrate peripherer Monozyten nach oraler Verabreichung von *Enterococcus faecium* FK-23 (Kanasugi et al. 1997) und ein signifikanter Anstieg der Stimulationsindizes nach Lymphozytenproliferation durch *Enterococcus faecium* DSM 7134 (Mück 2007) und durch einen *L. acidophilus*-Stamm (Pascher 2004). Dies wurde sich in einer Untersuchung zunutze gemacht, in der *Bacillus subtilis* DB 9011 die Makrophagenaktivität und die Aktivität peripherer Lymphozyten im Blut signifikant erhöhte und so eine postoperative Immunsuppression verhindern konnte (Kuwabara et al. 2005). Der Einfluss von Probiotika auf die Bildung von Immunglobulinen konnte unter anderem an gnotobiotischen Ratten demonstriert werden, die zuvor mit *E. coli* und *L. plantarum* oder nur mit *E. coli* besiedelt worden waren. Es kam zu einem stärkeren Anstieg der Serum-IgA-Konzentration bei den mit *L. plantarum* besiedelten Ratten im Vergleich mit solchen, die nur mit *E. coli* besiedelt worden waren (Herias et al. 1999). Auch bei Hunden konnte ein solcher Effekt erzielt werden. In einer entsprechenden Studie wurde Hunden vom Zeitpunkt des Absetzens bis zum Alter von einem Jahr *Enterococcus faecium* SF 68 verabreicht. Es kam in der Versuchsgruppe zu erhöhten fäkalen Konzentrationen und Plasmawerten von IgA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Spiegel an vakzinespezifischen IgG und IgA nach Staupevirusimpfung stiegen an (Benyacoub et al. 2003). Dass Bifidobakterien ebenfalls dazu

in der Lage sind, die Ig-Spiegel zu modifizieren, wurde an gnotobiotischen Mäusen, die nur mit *B. animalis* DN-173 010 inokuliert waren, demonstriert. Sie wurden mit einem Affenrotavirusstamm (SA-11) infiziert und die intestinale IgA-Antirotavirusantwort mit der keimfreier Mäuse verglichen. Es ergab sich eine Steigerung der intestinalen Antirotavirus-IgA-AK-Antwort der inokulierten Mäuse – sowohl auf zellulärer Ebene als auch in den Fäzes (Moreau et al. 1998a; Moreau et al. 1998b). Die Untersuchung des Einflusses von Probiotika auf immunglobulinproduzierende B-Zellen beim Hund ergab einen signifikanten Anstieg von CD21⁺-B-Zellen (reifen B-Zellen) nach der Gabe von *Enterococcus faecium* SF 68 und *Enterococcus faecium* DSM 7134 (Benyacoub et al. 2003; Mück 2007). Ein Einfluss von Probiotika auf T-Zellen beim Hund konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Benyacoub et al. 2003; Baillon et al. 2004; Mück 2007).

Ein weiterer Effekt von Probiotika auf das Immunsystem ist der Einfluss auf die Zytokinproduktion und damit auch auf die Th1/Th2-Balance. Der Th1-Weg führt bei Überreaktivität zu organspezifischen Autoimmunerkrankungen. Der Th2-Weg jedoch liegt Allergien und IgE-basierten Erkrankungen zugrunde (Singh et al. 1999; Kidd 2003). Verschiedene Milchsäurebakterien induzieren bestimmte mukosale Zytokinprofile und haben somit einen Einfluss auf die Th1/Th2-Balance (Perdigon et al. 2002). Außerdem verschieben einige Probiotika das Gleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Richtung der antiinflammatorischen Zytokine (Isolauri 2001; Isolauri et al. 2001). So führte *L. rhamnosus* GG in einer klinischen Studie mit atopischen Kindern zu einer erhöhten Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch die mononukleären Zellen im peripheren Blut (Pessi et al. 2000). Die selektive Erhöhung pro- oder antiinflammatorischer Zytokine ist jedoch stammabhängig, *L. casei* Shirota induzierte in einer anderen Studie die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IFN- γ (Kato et al. 1999). Auch für Bifidobakterien ist ein stammabhängiger Einfluss auf die Zytokinproduktion nachgewiesen. In einer Untersuchung von He et al. (2002) wurde der Einfluss auf die Zytokinproduktion von Bifidobakterien, die hauptsächlich in der Mikrobiota erwachsener Menschen vorkommen (*B. adolescentis*, *B. longum*), mit Bifidobakterien verglichen, die hauptsächlich in der Mikrobiota von Kindern vorkommen (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*). Bifidobakterien Adulter induzierten in makrophagenähnlichen Zelllinien vor allem proinflammatorische Zytokine (IL-2, TNF- α). *B. adolescentis* war außerdem im Gegensatz zu den anderen untersuchten Bifidobakterien nicht in der Lage, die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zu stimulieren. Die Autoren schlossen daraus, dass Bifidobakterien von Adulter wahrscheinlich weniger dazu fähig sind, eine entzündliche Immunantwort herabzuregulieren. Der Einsatz von Probiotika ist auch in der Therapie von Allergien nützlich (Isolauri et al. 2001). In einer experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus rhamnosus* GG das Auftreten atopischer Ekzeme bei Kindern reduzieren konnte. Bei der Evaluierung der Effizienz von *L. rhamnosus* GG in der Prävention einer atopischen Dermatitis bei Hundewelpen ergaben sich, verglichen mit der Kontrolle, signifikant reduzierte Serumtitere von allergenspezifischem IgE und mildere Reaktionen auf einen intradermalen Allergietest in der Versuchsgruppe. Das Ausmaß der klinischen Symptome änderte sich jedoch nicht (Marsella 2009).

Ein möglicher Wirkmechanismus ist der Eingriff in den Transkriptionsmechanismus der Zytokine auf der Ebene des NF κ B/I κ B-Komplexes (siehe 2.1.1). So hemmt die bakterielle DNA des probiotischen Mischpräparates VSL#3 (siehe 2.5.2) *in vitro* die NF κ B-Aktivierung und stabilisiert die I κ B-Spiegel, was zur Reduktion der Transkriptionsrate führt (Jijon et al. 2004).

Die Wirkungen von Probiotika sind stammspezifisch (Salminen et al. 1998a), wahrscheinlich multifaktoriell und von verschiedenen Bedingungen abhängig (Tuohy et al. 2003). Einflussfaktoren sind der Erkrankungszustand (Immunstatus), das Lebensalter des Wirts, die

aufgenommene Dosis, eventuelle Kombinationen mehrerer probiotischer Keime und die Kontinuität der Aufnahme.

So werden bei gesunden Wirten nur geringe Veränderungen induziert. Bei erkrankten Wirten hingegen ermöglichen Probiotika es, die Immunantwort zu fokussieren (Salminen et al. 1998b). Bei einer Milchhypersensibilität wird eine überschießende Immunantwort gemildert, bei einer akuten Gastroenteritis hingegen wird die Immunantwort gesteigert (Pelto et al. 1998; Salminen et al. 1998b; Isolauri et al. 1999; Isolauri 2001). Bei einer Milchhypersensibilität verhinderte die probiotische Therapie in der Versuchs- im Gegensatz zur Kontrollgruppe die charakteristische inflammatorische Immunantwort (Pelto et al. 1998). Bei einer akuten Rotavirusdiarrhoe hingegen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Zellen, die gegen Rotaviren gerichtetes IgA produzierten (Kaila et al. 1992; Majamaa et al. 1995). Allerdings erwies sich *Enterococcus faecium* SF 68 als nicht effizient in der Kurzzeitbehandlung einer natürlich erworbenen, chronischen Giardiose. Das Probiotikum zeigte keinen Einfluss auf das angeborene oder erworbene Immunsystem, da es zwischen der Versuchs- und der Placebogruppe keinen Unterschied in der Menge der Zystenausscheidung, der Konzentration an fäkalem Giardia-Antigen und fäkalem IgA gab. Außerdem zeigte sich keine erhöhte Phagozytenaktivität zirkulierender Leukozyten (Simpson et al. 2009).

Eine Abhängigkeit vom Lebensalter und eine Dosisabhängigkeit wurden unter anderem für die Antikörperproduktion bei Hühnern festgestellt. So ergab die Verabreichung verschiedener Laktobazillusstämme an Mast- und Legehühner, dass die IgG- und IgM-Spiegel im Serum abhängig vom verabreichten Stamm und der verabreichten Dosis sind. Außerdem zeigte sich bei bis zu drei Wochen alten Broilern ein stimulatorischer Effekt auf die humorale und zelluläre Immunantwort durch hohe und kontinuierlich verabreichte Dosen von Laktobazillen. Bei älteren Legehühnern hingegen war bereits eine geringere Dosis effektiv, die nur temporär verabreicht werden musste. Das Alter hat also einen Einfluss auf den probiotischen Effekt (Koenen et al. 2004).

Eine kontinuierliche Aufnahme ist indiziert, da die Besiedlung des Magen-Darm-Traktes nur vorübergehend erfolgt (Johansson et al. 1993). Dauerhafte Effekte sind also nur durch eine dauerhafte Verabreichung zu erwirken.

Zusammenfassend betrachtet haben Probiotika das Potential, einen Schutz vor Erkrankungen wie Magen-Darm-Infektionen, IBD und neoplastischen Erkrankungen zu bieten (**prophylaktischer Einsatz**), können aber auch zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden, bei denen durch umweltbedingte Faktoren oder durch antimikrobielle Therapie die Mikroökologie des Darmes gestört ist (**therapeutischer Einsatz**).

2.4.5 Bifidobakterien

Bifidobakterien gehören ebenso wie die Laktobazillen zu den milchsäureproduzierenden Bakterien (lactic acid bacteria (LAB)) (Donnet-Hughes et al. 1999; Ouwehand et al. 2002b). Alle Mitglieder des Genus *Bifidobacterium* sind gram-positive, unbewegliche, nicht sporulierende, kein Gas produzierende, anaerobe (obwohl einige Spezies Sauerstoff tolerieren), katalase-negative (außer *B. indicum* und *B. asteroides*) und saccharolytische Mikroorganismen (Ventura et al. 2004).

Sie sind morphologisch sehr unterschiedlich und können als gebogenes Stäbchen, keulenförmig oder gegabelt Y-förmig auftreten (Gomes und Malcata 1999). Zudem weisen sie unter feindlichen Lebensbedingungen einen hohen zellulären Pleomorphismus auf (Rasic und Kurmann 1983). Bifidobakterien haben eine typische gram-positive Zellwand, die aus einem dicken Peptidoglykanmantel besteht, der Polysaccharide, Proteine und Teichonsäure enthält (Gomes und Malcata 1999).

Bifidobakterien wurden in den Fäzes und Chymusproben verschiedener Tiere und des Menschen nachgewiesen, *B. subtilis* und *B. minimum* wurden bisher ausschließlich aus Abwässern isoliert (Ventura et al. 2004).

Man glaubt, dass Bifidobakterien eine entscheidende Rolle in der Gesunderhaltung des GIT spielen. Die erst kürzlich durchgeführte Genomsequenzierung stellt einen wesentlichen Schritt in Richtung eines besseren Verständnisses der Biologie dieser Mikroorganismen dar (Leahy et al. 2005).

2.4.5.1 Wachstum

Temperatur- und Sauerstoffansprüche: Bifidobakterien, die aus dem menschlichen Darm isoliert wurden, benötigen zum Wachstum eine Temperatur von 36-38 °C. Im Gegensatz dazu wachsen Bifidobakterien, die aus Tieren isoliert wurden bei höheren Temperaturen (41-43 °C) (Dong et al. 2000; Leahy et al. 2005). Bifidobakterien sind strikt anaerob, die Sensibilität gegenüber Sauerstoff kann jedoch zwischen verschiedenen Stämmen in einer Spezies variieren (Scardovi 1986; Shimamura et al. 1992; Ahn et al. 2001; Talwalkar und Kailasapathy 2003).

pH-Optimum: Bifidobakterien sind säuretolerant. Ihr pH-Optimum für Wachstum liegt zwischen pH 6,0-7,0. Ab einem pH von 8,5 können sie nicht mehr überleben (Gomes und Malcata 1999).

Nahrungsansprüche: Bifidobakterien können Ammoniumsalze als alleinige Stickstoffquelle nutzen (Hassinen et al. 1951; Scardovi 1986). Das Wachstum wird durch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren stimuliert, die vom Wirtskörper oder von der Mikrobiota des vorderen Gastrointestinaltraktes produziert werden (Threonin, Hefeextrakt, Cystein, Pepton, Dextrin, Maltose und β -Glyzerolphosphat) und durch bifidogene Faktoren, die dem direkten Metabolismus durch den Wirt entkommen sind, den Dickdarm erreichen und bevorzugt von Bifidobakterien metabolisiert werden (Modler 1994). Als Beispiel seien Fruktooligosaccharide genannt, die demnach als Präbiotikum fungieren (Roberfroid 1996).

2.4.5.2 Stoffwechsel

Kohlenhydratmetabolismus: Bifidobakterien sind saccharolytisch - sie fermentieren Glukose, Laktose, Galaktose, Mannitol und Fruktose und spielen so eine Rolle in der Kohlenhydratfermentation im Kolon. Die Fruktose-6-Phosphat-Phosphoketolase (F6PPK) ist das charakteristische Enzym von Bifidobakterien (De Vries und Stouthamer 1968; Gomes und Malcata 1999; Ventura et al. 2004). Milch- und Essigsäure, Ethylalkohol und Formiat werden als metabolische Hauptendprodukte der Fermentation von Hexosen gebildet, Laktat und Azetat in einem Verhältnis von 2:3 (Schlegel 2006).

Vitaminmetabolismus: Bifidobakterien produzieren Thiamin (B₁), Pyridoxin (B₆), Folsäure (B₉), Nikotinsäure und in geringerem Umfang auch Vitamin B₁₂ (Tamura 1983; Deguchi et al. 1985). *B. breve* und *B. infantis* produzieren hohe Spiegel an Nikotinsäure und Biotin, *B. bifidum* und *B. infantis* viel Vitamin B₁, B₉ und Nikotinsäure (Tamura 1983).

Fermentation im Kolon: Durch die Fermentation im Kolon wird bakterielles Wachstum stimuliert, organische Säuren (Milchsäure und kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids, SCFA)) und Gase wie H₂, CO₂ und CH₄ werden produziert. Milchsäure wird von vielen Spezies der endogenen Mikrobiota, aber hauptsächlich von Laktobazillen und Bifidobakterien produziert. Kurzkettige Fettsäuren (vor allem Azetat, Propionat und Butyrat) sind die Hauptendprodukte bakterieller Fermentationsreaktionen im Kolon und die wichtigsten Anionen im Dickdarm (Mortensen und Clausen 1996; Picard et al. 2005). Bifidobakterien können Butyrat nicht direkt produzieren, sie produzieren aber Laktat, das in Butyrat transformiert werden kann (Duncan et al. 2004). Butyrat reduziert konzentrationsabhängig die Zahl abnormen Zellwachstums und begünstigt die Expression von Differenzierungsmarkern *in vitro*, was Zellen von einem neoplastischen Phänotyp in einen nicht-neoplastischen Phänotyp zurückführt (Gibson et al. 1992; Salminen et al. 1998a). Butyrat dient außerdem der immunologischen Regulation der Kolonmukosa (Chapman 2001) – einschließlich der Repression proinflammatorischer Zytokine durch die Inhibition der Aktivierung von NF- κ B (Inan et al. 2000). Propionat kann die Kontraktilität der *Tunica muscularis* des Kolons

steigern und so Einfluss auf die Motilität nehmen, die kapilläre Durchblutung der Kolonschleimhaut fördern und den Elektrolyttransport beeinflussen. Diese peristaltikregulierende Wirkung ist eine mögliche Erklärung für die geringere Prävalenz und die verkürzte Dauer von Durchfallerkrankungen beim Einsatz von Probiotika (Topping 1996).

2.5 Der Einsatz von Probiotika bei chronischen Enteropathien

Die Ätiologie humaner IBD ist unbekannt, es spielen aber genetische Prädispositionen (Hampe et al. 2001; Ogura et al. 2001) und die intestinale Mikrobiota (Sartor 1997; Shanahan 2001; Guarner und Malagelada 2003) eine Rolle im Ausbruch der Erkrankung. Das distale Ileum und das Kolon sind die Orte mit der höchsten Bakterienkonzentration und auch die Orte, an denen häufig die Entzündung lokalisiert ist (Sartor 1997). Man beobachtet bei IBD-Patienten eine immunologische Reaktivität auf die Mikrobiota durch Verlust der oralen Toleranz (Duchmann et al. 1995). Es kommt zu einer Erhöhung der Zahl an Koliformen bei Patienten mit schwerer und diffuser ulzerativer Kolitis (Gorbach et al. 1968). Einigen *E. coli*-Stämmen wurde eine Beteiligung in der Pathogenese von Morbus Crohn nachgewiesen, vor allem einigen Stämmen mit speziellen Adhäsionsfähigkeiten, die in ilealen Läsionen vermehrt vorhanden sind (Keighley et al. 1978; Darfeuille-Michaud et al. 1998). Auch wurde beobachtet, dass Morbus Crohn-Patienten eine reduzierte Zahl an Bifidobakterien besitzen (Favier et al. 1997). Ein Nukleinsäuresequenzvergleich ergab, dass sich die bakterielle Zusammensetzung der dominanten fäkalen Mikrobiota bei Patienten mit Morbus Crohn von der gesunder Menschen unterscheidet (Seksik et al. 2001). Das führt zu dem Schluss, dass die Modifizierung der Zusammensetzung und der Aktivität der normalen Mikrobiota die Symptome der Erkrankung mildern könnte (Ouweland et al. 2002b). Damit haben Probiotika aufgrund ihrer Eigenschaften das Potential, förderlich in der Therapie von IBD zu sein.

2.5.1 Probiotika im IBD-Tiermodell

Es wurden vielfach Tiermodelle genutzt, um die Rolle der intestinalen Mikrobiota und pathogener Bakterien in der Entstehung einer chronischen Enteropathie zu evaluieren und um mögliche Effekte von Probiotika im Zusammenhang mit einer chronischen Enteropathie zu untersuchen. Für diesen Zweck wurden vor allem zwei Tiermodelle verwendet. 1.) Tiere, die aufgrund genetischer Defekte eine chronische Enteropathie entwickeln (Il-10-knockout-Modell, HLA-B27-Ratten, SAMP1/Yit-Mäuse (Senescence-accelerated mouse P1/Yit-Stamm) und 2.) Tiere mit einer Kolitis durch Dextran-Sulfat-Natrium- (Dextran Sulfate-Sodium - DSS-Modell) oder Iodoacetamid-Provokation.

Im Il-10-knockout-Modell wurde nachgewiesen, dass die endogene Mikrobiota und pathogene intestinale Bakterien in der Steuerung der Immunantwort eine Rolle spielen, denn während besiedelte Mäuse, denen das immunregulatorische Zytokin Il-10 fehlte, eine spontane Kolitis entwickelten, blieben keimfreie Mäuse mit demselben Defekt gesund (Sellon et al. 1998). Die Entwicklung der intestinalen Entzündung in normal besiedelten, Il-10-defizienten Tieren geht mit der Reduktion der Laktobazilluspopulation einher (Madsen et al. 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass *L. plantarum* 299v in der Lage ist, die Entwicklung einer spontanen Kolitis bei monoassozierten Il-10-knockout-Mäusen zu verhindern (Schultz et al. 2002), *L. rhamnosus* GG aber keine Wirkung zeigte (Veltkamp et al. 1999). Die Vorbehandlung mit *L. plantarum* DSM 9843, *Bifidobacterium* sp. 3B1 und *B. infantis* DSM 15158 bei Ratten mit anschließender Provokation einer Kolitis durch Dextran-Sulfat-Natrium führte wiederum zu einer Reduktion der Schwere der Erkrankung, ausgedrückt durch eine Senkung des Krankheitsaktivitätsindex und der bakteriellen Translokation (Osman et al. 2004). Im Il-10-knockout-Modell konnte gezeigt werden, dass *B. infantis* 35624 und *L. salivarius* 433118 eine mukosale Entzündung durch Senkung der proinflammatorischen (Th1-) Zytokine Il-12, TNF- α und IFN- γ reduzieren können (McCarthy et al. 2003). Eine Unterdrückung der Entzündung und der Th1-Antwort (TNF- α ,

IFN- γ) konnte auch für *B. bifidum*, *B. breve* und *L. acidophilus* bei SAMP1/Yit-Mäusen nachgewiesen werden (Matsumoto et al. 2001).

Die Kolitis von Tieren im Il-10-knockout-Modell kann zu einer Dysplasie oder sogar zu einer neoplastischen Entartung fortschreiten. In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass *L. salivarius* subsp. *salivarius* UC118 (NCIMB 40829) das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen konnte (O'Mahony et al. 2001).

Untersuchungen, ob Probiotika die Remission aufrechterhalten können, wurden an HLA-B27-Ratten durchgeführt. Zunächst wurde die Kolitis mit Antibiotika therapiert. *L. rhamnosus* GG war in der Lage, den Rückfall zu vermindern – ausgedrückt durch eine Reduktion der Krankheitsaktivität, reduzierte histologische Scores und eine Reduktion der Il-1 β - und der zäkalen TNF-Spiegel. *L. plantarum* war dazu nicht in der Lage (Dieleman et al. 2003). Am Beispiel von *L. rhamnosus* GG lässt sich erkennen, dass der Effekt eines Probiotikums davon abhängt, in welchem Erkrankungsstadium es eingesetzt wird. So verschlechterte *L. rhamnosus* GG einige Parameter einer Dextran-Sulfat-Natrium-Kolitis (Moon et al. 2004; Geier et al. 2005), hatte sogar schädliche Effekte bei akuter DSS-Kolitis, spielte aber eine Rolle in der Senkung der Krankheitsaktivität einer chronischen Kolitis (Moon et al. 2004).

2.5.2 Probiotische Mischpräparate im IBD-Tiermodell

Ein in der Humanmedizin häufig eingesetztes probiotisches Mischpräparat ist das Präparat VSL#3 (VSL Pharmaceuticals, Fort Lauderdale, FL, USA). Dieses Präparat ist eine Mischung aus vier *Lactobacillus*-Stämmen (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrückii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*), drei *Bifidobacterium* spp. (*B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*) und einem *Streptococcus thermophilus*-Stamm (*S. salivarius* subsp. *thermophilus*) (Gionchetti et al. 2000b). VSL#3 reduziert die Schwere einer Kolitis bei Il-10-knockout-Mäusen durch eine Normalisierung der physiologischen Funktion des Kolons, der Barriereintegrität und der Darmhistologie und durch eine reduzierte Produktion von TNF- α und INF- γ (Madsen et al. 2001). In einem Iodoacetamid-Kolitis-Modell wurden die Schäden im Kolon nach Vorbehandlung mit *L. rhamnosus* GG und VSL#3 signifikant reduziert. Das wiederum zeigte sich unter anderem durch eine Verkleinerung des betroffenen Bereiches (Shibolet et al. 2002). Obwohl der Mechanismus ungeklärt ist, weisen die Ergebnisse von Madsen et al. (2001) auf einen vermutlich von den eingesetzten probiotischen Bakterien (VSL#3) produzierten löslichen Faktor hin, der eine Rolle in der Normalisierung der Darmmikrobiota spielt.

2.5.3 Klinische Studien bei humanen IBD-Patienten

2.5.3.1 Ulzerative Kolitis (UC)

Die ulzerative Kolitis ist eine entzündliche Erkrankung des Kolons, die sich kontinuierlich vom Rektum oralwärts ausbreiten kann. Die entzündlichen Veränderungen werden lediglich in den oberflächlichen Schichten der Mukosa nachgewiesen. Bei einer höheren Krankheitsaktivität werden Erosionen und zunächst oberflächliche, später bis in die Lamina propria reichende, konfluierende Ulzerationen beobachtet (Hartmann 2000). Veränderungen der Mikrobiota wie die Reduktion der Konzentration an Bifidobakterien und der Anstieg von *Bacteroides* spp. sind offensichtlich mit dem Schweregrad einer UC assoziiert (Ishikawa et al. 2003). Probiotika wurden bisher bei UC eingesetzt, um eine bestehende Remission zu verlängern oder um die Effizienz von Probiotika in der Therapie zu untersuchen.

Dabei ergab sich, dass *E. coli* Stamm Nissle 1917 in der Erhaltung einer Remission der Standardmedikation Mesalazin äquivalent ist. Das probiotische Mischpräparat VSL#3 erwies sich außerdem als Alternative zu Mesalazin bei allergischen und intoleranten Menschen in der Erhaltung einer Remission (Kruis et al. 1997; Rembacken et al. 1999; Venturi et al. 1999; Kruis et al. 2004).

Im therapeutischen Einsatz bei einer aktiven ulzerativen Kolitis ergab sich, dass mit Bifidobakterien fermentierte Milch (*B. breve* Stamm Yakult, *B. bifidum* Stamm Yakult und *L. acidophilus* Yit 0168) in Kombination mit der üblichen medikamentellen Therapie im

Vergleich zur alleinigen medikamentellen Therapie effektiv eine Verschlimmerung der Symptome und möglicherweise einen Rückfall verhindern konnte und in einer weiteren Studie zum Studienabschluss einen signifikant niedrigeren Aktivitätsindex im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielte. Zudem war in der Probiotikagruppe der histologische Entzündungsgrad zum Abschluss der Studie signifikant niedriger als zu Beginn, nicht so in der Kontrollgruppe (Ishikawa et al. 2003; Kato et al. 2004). VSL#3 induzierte bei Patienten mit aktiver milder bis moderater ulzerativer Kolitis, die nicht auf die konventionelle Therapie reagiert hatten, eine Remission bzw. eine positive Reaktion auf die Therapie in 77 % der Fälle, ohne dass unerwünschte Wirkungen beobachtet wurden (Bibiloni et al. 2005).

2.5.3.2 Pouchitis

Bis zu 50 % der Patienten mit ulzerativer Kolitis entwickeln nach der Proktokolektomie und der anschließenden Pouchrekonstruktion mit ileoanaler Anastomose eine akute oder chronische Entzündung, eine Pouchitis (Kruis 2004). Dies geht mit einer Verschiebung der Mikrobiota zu aeroben Keimen, einer reduzierten fäkalen Konzentration an Laktobazillen und Bifidobakterien und einem erhöhten luminalen pH-Wert einher (Ruseler van Embden et al. 1994).

Als effektiv in der Prävention eines Ausbruchs einer Pouchitis erwies sich das probiotische Mischpräparat VSL#3. 10 % der Patienten der VSL#3-Gruppe und 40 % der Placebogruppe entwickelten innerhalb eines Jahres nach der Operation eine Pouchitis. Außerdem berichteten die Patienten der VSL#3-Gruppe im Rahmen eines Fragebogens über eine signifikant bessere Lebensqualität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gionchetti et al. 2003).

Das gleiche Präparat war ebenfalls in der Aufrechterhaltung einer Remission wirksam. Diese konnte in zwei Untersuchungen in der VSL#3-Gruppe in 85 % der Fälle aufrecht erhalten werden, in der Placebogruppe in 6 % (Mimura et al. 2004), bzw. in 0 % der Fälle (Gionchetti et al. 2000a). Die Lebensqualität der Patienten blieb in der VSL#3-Gruppe gut und wurde in der Placebogruppe schlechter (Mimura et al. 2004).

Die fermentierte Milch „Cultura“ (*Lactobacillus* La-5, *Bifidobacterium* Bb12) bewirkte bei einer aktiven Erkrankung bei Patienten mit einer IPAA (ileal-pouch-anal-anastomosis) aufgrund einer ulzerativen Kolitis oder einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP) eine signifikante Reduktion der klinischen Symptomatik nach der Intervention im Vergleich zur Ausgangssituation und einen positiven Effekt auf die endoskopisch festgestellte Entzündung bei Patienten mit einer IPAA aufgrund einer ulzerativen Kolitis (Laake et al. 2005).

2.5.3.3 Morbus Crohn (MC)

Es gibt nur wenige Studien über den Einsatz von Probiotika bei Morbus Crohn. Positive Ergebnisse erzielte die Verabreichung von *E. coli* Stamm Nissle 1917 in der Remissionserhaltung eines Morbus Crohn, da nur 33 % der Patienten der Probiotikagruppe, aber 63,6 % der Placebogruppe innerhalb eines Jahres einen Rückfall erlitten (Malchow 1997). Auch *Saccharomyces boulardii* in Kombination mit Mesalazin erwies sich der alleinigen Mesalazintherapie überlegen, da in der Mesalazingruppe 37,5 % der Patienten einen Rückfall erlitten, in der Probiotikagruppe hingegen nur 6,3 % (Guslandi et al. 2000).

2.5.4 Probiotika bei kaniner Diarrhoe

Probiotika wurden bereits in verschiedenen Studien bei Durchfallerkrankungen des Hundes eingesetzt, doch nur ein Teil der Untersuchungen unterschied dabei zwischen einem akuten und einem chronischen Geschehen bzw. berücksichtigte die auslösende Ursache. Bei den Probiotika, die in den Studien eingesetzt wurden, die keine Unterscheidung vornahmen, handelte es sich um *Lactobacillus acidophilus* LB (Enterolac[®]) über 7-10 Tage und *Bifidobacterium pseudolongum* in einer Dosierung von $1,13 \times 10^8$ lebende Zellen/kg KM/Tag. Enterolac[®] bewirkte ein Sistieren der Diarrhoe bei 60 % der Patienten (27 Hunde und 3 Katzen) innerhalb von 72 Stunden (Gualtieri 2006), *Bifidobacterium pseudologum* erzielte

eine exzellente oder gute Reaktion bei 22 von 30 Tieren, während 2 Tiere nur milde und 6 Tiere geringgradige Reaktionen zeigten. Es konnten keine unerwünschten Wirkungen beobachtet werden (Kogure et al. 1976). Weitere Angaben über Dosierung oder Dauer der Verabreichung waren in den genannten Publikationen nicht ersichtlich.

In einer anderen Untersuchung wurden Tiere mit einer unspezifischen Futtersensibilität, die definiert ist als eine Überempfindlichkeit auf bestimmte Futterinhaltsstoffe oder Diättypen mit *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 behandelt. Die Erkrankung ist durch eine weiche Fäzeskonsistenz charakterisiert (Rolfé 1999; Rolfé et al. 2002; Münster et al. 2006). Dabei verbesserte *L. acidophilus* DSM 13241 die Fäzeskonsistenz, erhöhte die Trockensubstanz der Fäzes und reduzierte die Defäkationsfrequenz. Die Konzentration an kultivierbaren Laktobazillen und Bifidobakterien in den Fäzes erhöhte sich numerisch. Die Zahl an *Clostridium perfringens* und *Escherichia* spp. sank, doch auch hier war der Gruppenunterschied nicht signifikant. Die Autoren schlossen daraus, dass *L. acidophilus* DSM 13241 den Verdauungsprozess bei Hunden mit unspezifischer diätetischer Sensibilität stabilisiert (Pascher et al. 2008).

Der Einsatz von Probiotika bei ausschließlich chronischen Enteropathien wurde bisher in nur drei Untersuchungen behandelt, von denen sich zwei mit dem Einsatz *in vivo* befassen. In der *in vitro*-Studie wurde in einem *ex vivo*-Kultursystem duodenaler Proben von Hunden mit chronischen Enteropathien die Wirksamkeit von Probiotika auf die Zytokinexpression untersucht. Als Kontrolle dienten Proben darmgesunder Tiere. Untersucht wurde ein probiotisches Mischpräparat aus *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2766 und *Lactobacillus johnsonii* NCC 2767. In der Kontrollgruppe erhöhte sich nach der Zugabe des probiotischen Mischpräparats der Il-10 mRNA-Spiegel ($p < 0,1$), in der Versuchsgruppe erhöhte das probiotische Mischpräparat die mRNA- und Proteinspiegel von Il-10 ($p < 0,05$). Auf mRNA-Ebene sanken die Quotienten aus TNF- α /Il-10, IFN- γ /Il-10 und Il-12p40/Il-10 nach der Zugabe des probiotischen Mischpräparats ($p < 0,05$) in der Enteropathiegruppe. Die Autoren interpretierten die Ergebnisse als erwünschte Effekte des probiotischen Mischpräparats auf regulatorische (Il-10, TGF- β 1) und proinflammatorische (IFN- γ , TNF- α , Il-12p40) Zytokine, die zur Reduktion einer intestinalen Entzündung beitragen könnten (Sauter et al. 2005).

Es wurden bisher nur zwei Studien veröffentlicht, die sich mit dem Einsatz von Probiotika bei Hunden mit chronischen Enteropathien *in vivo* befassen. In einer der beiden Studien wurde die Fähigkeit von *Lactobacillus rhamnosus* GG untersucht, die Remission einer TRD aufrechtzuerhalten (Westermarck et al. 2005a). Durch die Verabreichung dieses Probiotikums konnte die Remission nicht verlängert werden. In der zweiten Studie wurde die Hypothese getestet, dass probiotische Bakterien die mRNA-Spiegel regulatorischer Zytokine im Darm hinaufregulieren und die Mikrobiota positiv beeinflussen können. Hierzu wurden die Effekte eines Mischpräparats aus *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2766 und *Lactobacillus johnsonii* NCC 2767 auf das klinische Bild einer Food Responsive Diarrhea, auf die intestinale Mikrobiota und auf die intestinalen Muster proinflammatorischer (Il-5, Il-12p40, Il-13, IFN- γ , TNF- α) und regulatorischer Zytokine (Il-10, TGF- β 1) untersucht. Als Kontrolle diente eine Placebogruppe. Das probiotische Mischpräparat wurde in einer Dosierung von 10^{10} KBE jedes Stammes pro Tag verabreicht. Außerdem erhielten die Tiere eine kommerzielle Eliminationsdiät (Sauter et al. 2006). Alle Hunde beider Gruppen zeigten am Ende der Studie eine Besserung der klinischen Symptomatik. Es konnten nur milde Effekte des Mischpräparats auf die Zytokinmuster und die intestinale Mikrobiota festgestellt werden: tendenziell gesunkene duodenale Il-10-mRNA-Spiegel und erhöhte IFN- γ -mRNA-Spiegel im Kolon. Die Zahl der *Enterobacteriaceae* sank in beiden Gruppen während der Therapie. Die Zahl an *Lactobacillus* spp. stieg in der Probiotikagruppe tendenziell an. Da die Eliminationsdiät einen starken Einfluss auf die

klinische Besserung der Hunde hatte, bleibt unklar, in welchem Ausmaß die Probiotika an den Änderungen beteiligt waren.

2.6 Fragestellung dieser Arbeit

Da Probiotika potentiell einen Einfluss auf die Membranintegrität der Darmbarriere haben, immunmodulatorische Effekte besitzen und über die Fähigkeit verfügen, die Darmmikrobiota zu modifizieren, ist ein positiver Effekt auf eine Erkrankung möglich, in deren Pathogenese diese Faktoren eine Rolle spielen. Da sie außerdem in vorangegangenen Tierversuchen und in dem Management humaner Formen chronischer Enteropathien bereits einen Nutzen gezeigt haben, sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob dies unter klinischen Bedingungen auch auf den Hund zutrifft. Dafür wurde erstmals ein Bifidobakterium eingesetzt, das aus dem kaninen Gastrointestinaltrakt isoliert worden war.

Folgende Fragestellungen dienten als Grundlage für die Untersuchungen:

- Ist *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 in Kombination mit einer Arzneimitteltherapie der alleinigen Arzneimitteltherapie in der Milderung der klinischen Symptome überlegen?
- Führt *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 eine Remission schneller herbei oder ist es in der Lage, eine bestehende Remission zu verlängern?
- Welche Mechanismen könnten für einen potentiellen positiven Effekt verantwortlich sein?
 - Besteht ein Einfluss auf verdauungsphysiologische Parameter?
 - Übt es einen Effekt auf immunologische Faktoren im Blut aus?
 - Besitzt es die Fähigkeit, die Darmmikrobiota zu modifizieren?

3 Material und Methode

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine doppelblinde, plazebokontrollierte Interventionsstudie zur Testung der klinischen Wirksamkeit einer Zufütterung von *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 bei Hunden mit chronischen Darmerkrankungen. Die Tiere wurden in eine Kontroll- und eine Probiotika-Gruppe eingeteilt. Es wurden die Effekte auf klinische Befunde, verdauungsphysiologische Parameter und die Mikrobiota des Gastrointestinaltraktes untersucht.

3.1 Versuchstierantrag

Die Genehmigung für diesen Tierversuch wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin erteilt (GZ: I C 1 – A 0274/06).

3.2 Antrag auf Ausnahmegenehmigung für die Zulassung eines Stoffes als Futtermittelzusatzstoff nach § 69 Abs. 1 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFBG)

Die Genehmigung der zeitlich begrenzten Verfütterung des probiotischen Keimes *Bifidobacterium animalis* (NCIMB 41199) wurde durch das Bezirksamt Steglitz-Zehlendorf von Berlin erteilt (GZ: Vet 11 – 109/06).

3.3 Arbeitshypothese

Die **Arbeitshypothese** lautete: Der verwendete Stamm attenuiert klinische Symptome und beeinflusst die intestinale Mikroflora von Hunden mit chronischer Diarrhoe. Er bewirkt eine schnellere und dauerhaftere Remission.

3.4 Patienten, Ein- und Ausschlusskriterien

In der Studie wurden 32 Hunde untersucht, die folgende Einschlusskriterien erfüllen mussten: Chronische oder chronisch intermittierende Diarrhoe auf Grund einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (IBD, FRD oder ARD), die nicht infektiös, parasitär, tumorös oder medikamentell hervorgerufen sein durfte. Betroffen sein konnten der Dünndarm und/oder der Dickdarm. Die Krankheitsdauer musste zu Studienbeginn mindestens 4 Wochen betragen, die Tiere mussten im Verlauf der Studie das erste Lebensjahr vollenden und ein Normalgewicht von über 5 kg haben.

Eine Nichtaufnahme bzw. ein Ausschluss von Patienten erfolgte, wenn einer oder mehrere der folgenden Punkte zutrafen:

- eine so stark intermittierende Erkrankung, dass eine Beurteilung der Krankheitsentwicklung in einem Zeitraum von 90 Tagen nicht möglich war
- eine Erkrankung, die durch ihren Grad ungeeignet war, im Rahmen der geplanten Interventionen verantwortungsvoll therapiert zu werden
- andere Primärerkrankungen, die für die Symptomatik verantwortlich waren oder den Gesundheitszustand des Hundes so beeinflussten, dass andere langwierige Therapien eingesetzt werden mussten als im Rahmen der Studie geplant
- bei Unverträglichkeit
- bei Nicht-Befolgen der Anweisungen

Die Patienten wurden an der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin, in der tierärztlichen Gemeinschaftspraxis von Dr. Hörauf und Dr. Münster in Köln und ab August 2007 auch an der medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München rekrutiert. Zwischen den drei Praxen bzw. Kliniken war die verwendete Methodik genau abgestimmt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Tabelle 1 zeigt die Zahlenschlüssel der Patienten und die rekrutierende Einrichtung.

Tab. 1: Zahlencodes der rekrutierten Patienten und rekrutierende Einrichtung

Plazebogruppe		Probiotikagruppe	
Hund	rekrutierende Einrichtung	Hund	rekrutierende Einrichtung
1	FU Berlin	17	FU Berlin
2	FU Berlin	18	FU Berlin
3	FU Berlin	19	FU Berlin
4	FU Berlin	20	FU Berlin
5	FU Berlin	21	FU Berlin
6	FU Berlin	22	FU Berlin
7	FU Berlin	23	FU Berlin
8	FU Berlin	24	FU Berlin
9	Tierärztliche Gemeinschaftspraxis, Köln	25	Tierärztliche Gemeinschaftspraxis, Köln
10	Tierärztliche Gemeinschaftspraxis, Köln	26	Tierärztliche Gemeinschaftspraxis, Köln
11	Tierärztliche Gemeinschaftspraxis, Köln	27	Tierärztliche Gemeinschaftspraxis, Köln
12	Tierärztliche Gemeinschaftspraxis, Köln	28	Tierärztliche Gemeinschaftspraxis, Köln
13	Tierärztliche Gemeinschaftspraxis, Köln	29	FU Berlin
14	FU Berlin	30	FU Berlin
15	FU Berlin	31	LMU München
16	LMU München	32	LMU München

3.5 Studienprotokoll

Ab der Aufnahme des Patienten erhielt dieser das Futter Intestinal *Low-residue*TM / Canine Dry Formula (Iams® Veterinary Formulas, Procter und Gamble, Cincinnati, USA; siehe 3.9). Der Hund wurde mittels einer existenten Zufallsliste randomisiert der Probiotika- oder der Plazebogruppe zugeordnet, wobei die Supplemente farblich gekennzeichnet waren und weder Untersuchende noch Besitzer um die Gruppenzugehörigkeit wussten. Der Besitzer erhielt ein Tagebuch, in dem der Krankheitsverlauf anhand einfacher Parameter dokumentiert werden sollte. An den Tagen 0, 14, 30, 60 und 90 der Studie wurden die Patienten untersucht und Proben wurden entnommen, wie in Tabelle 2 erläutert. War es notwendig, wurde das Erreichen der Remission der Hunde beider Gruppen pharmakologisch in gleicher Weise unterstützt. Dies erfolgte je nach Indikation durch Medikamente wie Metronidazol, Cobalamin oder Prednisolon. Eine symptomatische Therapie erfolgte mit Ranitidin, Maropitant und/oder Metoclopramid. Ziel dabei war es, die Medikamente am Tag 14 der Studie abzusetzen, was allerdings medizinisch nicht immer vertretbar war und daher nicht strikt in diesem Zeitrahmen durchgeführt werden konnte.

Tab. 2: Zeitliche Abfolge der durchgeführten Untersuchungen

Tag	Probe/Tätigkeit	Parameter
0	Grunduntersuchung	Anamnese, Klinische Untersuchung, Body Condition Score ¹ , Körpermasse, CIBDAI ²
	Blutentnahme	Hämatologie, Differentialblutbild, Klinische Chemie, TLI ³ , Vit. B ₁₂ , Folsäure, C-reaktives Protein, Lymphozytenphänotypisierung
	Fäzesprobe	Kotparasitologie, einschließlich Untersuchung auf Giardia-Antigen, RT-PCR zur Bestimmung des Gehaltes an Clostridien, Laktobazillen und Bifidobakterien, Nachweis der DNA des eingesetzten Probiotikums
	Endoskopie mit Biopsieentnahme aus Magen, Duodenum und Kolon	makroskopische Beurteilung, histopathologische Untersuchung der Biopsien
14	Grunduntersuchung	Anamnese, Klinische Untersuchung, Body Condition Score ¹ , Körpermasse, CIBDAI ²
30	Grunduntersuchung	Anamnese, Klinische Untersuchung, Body Condition Score ¹ , Körpermasse, CIBDAI ²
	Fäzesprobe	RT-PCR zur Bestimmung des Gehaltes an Clostridien, Laktobazillen und Bifidobakterien, Nachweis der DNA des eingesetzten Probiotikums
60	Grunduntersuchung	Anamnese, Klinische Untersuchung, Body Condition Score ¹ , Körpermasse, CIBDAI ²
90	Grunduntersuchung	Anamnese, Klinische Untersuchung, Body Condition Score ¹ , Körpermasse, CIBDAI ²
	Blutentnahme	Hämatologie, Differentialblutbild, Klinische Chemie, Vit. B ₁₂ , Folsäure, C-reaktives Protein, Lymphozytenphänotypisierung
	Fäzesprobe	RT-PCR zur Bestimmung des Gehaltes an Clostridien, Laktobazillen und Bifidobakterien, Nachweis der DNA des eingesetzten Probiotikums

¹: Body Condition Score nach Laflamme (1997), ²: Canine Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index (Jergens et al. 2003), ³: Trypsin-like Immunoreactivity

3.6 Signalement, Anamnese und klinische Untersuchung

Die Anamnese umfasste Fragen nach dem Allgemeinbefinden des Hundes und der bisherigen Dauer der Symptome. Bei intermittierenden Symptomen wurde erfasst, in welchen Abständen die Symptome auftraten und welche Dauer die Symptomzeit hatte. Kotmenge pro Kotabsatz, Tenesmus, Impfstatus, Entwurmungsstatus und bisherige Diät wurden ebenfalls abgefragt.

Die klinische Allgemeinuntersuchung umfasste die Erfassung folgender Parameter: Schleimhautfarbe, kapilläre Füllungszeit, Palpation der tastbaren Körperlymphknoten, Palpation des Abdomens, Spannung der Bauchdecke, Pulsmessung und Beurteilung, Messung der Rektaltemperatur, Auskultation des Herzens und der Lunge und Bestimmung der Herzfrequenz.

3.7 Tagebuch

Zu Beginn der Studie erhielt jeder Besitzer ein Tagebuch, in dem täglich folgende Parameter erfasst wurden, um den Krankheitsverlauf verfolgen zu können (siehe Tabelle 3):

Tab. 3: Mögliche Ausprägungen und Bewertung der Parameter der Tagebücher

Parameter	Ausprägung	Zahlencode
Aktivität und Appetit	normal	0
	ggrd. reduziert	1
	mgrd. reduziert	2
	hgrd. reduziert	3
Erbrechen	nie	0
	einmalig	1
	2x	2
	3x	3
	4x	4
	5x	5
	>5x	6
Kotkonsistenz pro Kotabsatz	normal	0
	weich	1
	sehr weich	2
	wässrig	3
Kotabsatzfrequenz	gar nicht	0
	1x	1
	2x	2
	3x	3
	4x	4
	5x	5
	>5x	6
Hämatochezie pro Kotabsatz	nicht vorhanden	0
	vorhanden	1
mukoide Fäzes pro Kotabsatz	nicht vorhanden	0
	vorhanden	1

Eine Darstellung des Tagebuches findet sich als Abbildung 14 im Anhang.

Der gesamte Untersuchungszeitraum wurde zur Auswertung der Daten in insgesamt fünf Perioden unterteilt. Die Perioden wurden anschließend untereinander verglichen und im Gruppenvergleich ausgewertet (siehe Tabelle 4).

Tab. 4: Aufschlüsselung der ausgewerteten Untersuchungstage pro Periode

Periode	Tagesanzahl in der betreffenden Periode	Untersuchungstage
0	variabel	alle vor Beginn der Interventionen erfasste Daten
1	14	1-14
2	16	15-30
3	30	31-60
4	30	61-90

3.8 Fragebogen

An allen fünf Untersuchungstagen wurde ein Fragebogen zur Beurteilung des *Canine Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index* (CIBDAI), des *Body Condition Score* (BCS) und zur Erhebung von Teilen der Anamnese der gastrointestinalen Erkrankung herangezogen.

3.8.1 Canine Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI)

Der *Canine Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index* nach Jergens et al. (2003) wurde an den fünf festgelegten Kontrolltagen im Fragebogen regelmäßig erhoben. Erfasst wurden die Parameter Aktivität, Appetit, Vomitus, Kotkonsistenz, Kotabsatzfrequenz und Gewichtsverlust (siehe Tabelle 5).

Tab. 5: Parameter, mögliche Ausprägungen und Bewertung des Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI)

Parameter	Ausprägung	Bewertung
Aktivität und Appetit	normal	0 Punkte
	geringgradig reduziert	1 Punkt
	mittelgradig reduziert	2 Punkte
	hochgradig reduziert	3 Punkte
Vomitus	nicht vorhanden	0 Punkte
	selten	1 Punkt
	bis dreimal pro Woche	2 Punkte
	mehr als dreimal pro Woche	3 Punkte
Kotkonsistenz	normal	0 Punkte
	weich oder Blutbeimengungen oder Schleim	1 Punkt
	sehr weicher Kot	2 Punkte
	wässriger Durchfall	3 Punkte
Kotabsatzfrequenz	normal	0 Punkte
	zwei- bis dreimal	1 Punkt
	vier- bis fünfmal	2 Punkte
	mehr als fünfmal	3 Punkte
Gewichtsverlust	kein Gewichtsverlust	0 Punkte
	Verlust von < 5 % des Körpergewichtes	1 Punkt
	5-10 % Verlust	2 Punkte
	über 10 % Verlust	3 Punkte

Die sich daraus ergebenden Punkte wurden addiert. Insgesamt waren also maximal 18 Punkte zu vergeben. Der Schweregrad der vorliegenden IBD wurde daraus wie folgt abgeleitet (Jergens et al. 2003):

0 bis 3 Punkte:	klinisch nicht signifikant
4 bis 5 Punkte:	milder Grad
6 bis 8 Punkte:	mittlerer Grad
über 9 Punkte:	schwerer Grad

3.8.2 Futterakzeptanz, Krankheitsentwicklung, Flatulenz, Borborygmus, Bauchschmerzen und Unbehagen

Diese Parameter wurden an den fünf Kontrollterminen durch den Besitzer für den Zeitraum, der seit dem letzten Termin vergangen war, subjektiv eingeschätzt. Die Bewertung der möglichen Ausprägungen dieser Parameter findet sich in Tabelle 6.

Tab. 6: Bewertung der Parameter Futterakzeptanz, Krankheitsentwicklung, Flatulenz, Borborygmus, Bauchschmerzen und Unbehagen

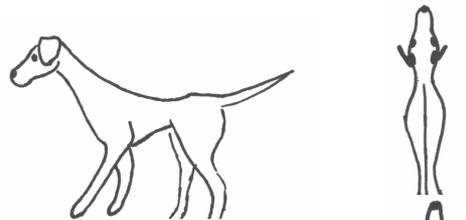
Parameter	Ausprägung	Bewertung
Futterakzeptanz	ausgezeichnet	1
	mäßig	3
	Verweigerung	5
Krankheitsentwicklung	symptomlos	1
	gleichbleibend	3
	Verschlechterung	5
Flatulenz, Borborygmus, Bauchschmerzen, Unbehagen	nie	0
	selten	1
	manchmal	2
	regelmäßig	3

3.8.3 Body Condition Score (BCS)

Der *Body Condition Score* nach Laflamme (1997) wurde im Zuge der Kontrolltermine im Fragebogen erfasst. Die Beurteilung erfolgte hier durch den Untersuchenden nach folgenden Kriterien:

dünn:

- Rippen, Wirbelsäule und Beckenknochen sind deutlich und schon aus der Entfernung zu sehen
 - kein Körperfett
 - klar erkennbarer Verlust von Muskelmasse
- ⇒ **1 Punkt**



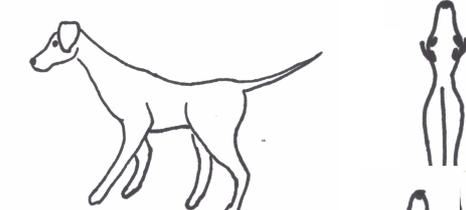
untergewichtig:

- Rippen sind zu sehen und leicht zu fühlen
 - Beckenknochen sind prominent
 - deutliche Taille
- ⇒ **2 Punkte**



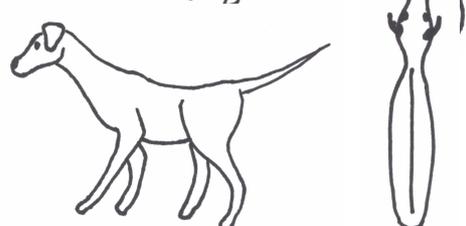
ideal:

- Rippen sind fühlbar
 - Taille sichtbar, wenn von oben betrachtet
- ⇒ **3 Punkte**



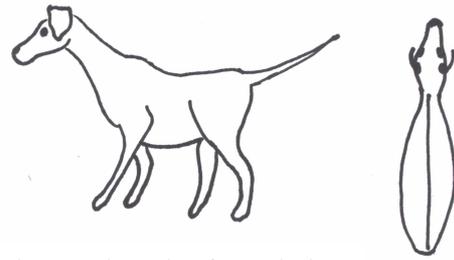
übergewichtig:

- Rippen schwer fühlbar, durch Fett überdeckt
 - deutliche Fetteinlagerungen auf dem Rücken und am Schwanzansatz
 - Taille kaum sichtbar
- ⇒ **4 Punkte**



fettleibig:

- Rippen sind nicht fühlbar und von Fett bedeckt
 - massive Fetteinlagerungen auf dem Rücken und am Schwanzansatz
 - keine Taille
- ⇒ **5 Punkte**



Die einzelnen Parameter des Fragebogens wurden im Zeitverlauf und im Gruppenvergleich ausgewertet.

3.9 Versuchsfutter

Bei dem verwendeten Versuchsfutter handelte es sich um das Futter „Intestinal *Low-residue*TM / Canine Dry Formula“ (Iams® Veterinary Formulas, Procter und Gamble, Cincinnati, USA). Dabei handelt es sich laut Hersteller um eine hochverdauliche, fettarme Diät, die Fruktooligosaccharide enthält. Sie wurde entwickelt für Patienten mit Verdauungsstörungen, Small Intestinal Bacterial Overgrowth-Syndrom, exokrine Pankreasinsuffizienz, postakute Pankreatitis, Lymphangiektasie, Proteinverlustenteropathie, transiente unspezifische Diarrhoe und parasitenbedingte Diarrhoe. Durch den Inhaltsstoff „Fruktooligosaccharide“ soll es zu einem zahlenmäßigen Anstieg erwünschter und zu einem Abfall unerwünschter Darmbakterien kommen (Willard et al. 1994a). Außerdem enthält das Futter fermentierbare Fasern aus der Rübenpulpe, die zu einer Reduktion des Kotvolumens beitragen sollen. Die reduzierte Fettmenge soll zudem eine Stimulation des Pankreas' reduzieren, die osmotische Ladung senken und eine Steatorrhoe verhindern. Der moderate Spiegel an qualitativ hochwertigem, hochverdaulichem Protein soll dazu beitragen, eine positive Stickstoffbalance zu erhalten, den Anabolismus zu stimulieren und eine schlanke Körperkondition zu bewahren.

Zusammensetzung nach Herstellerangaben

Huhn, Maisgrieß, Reismehl, Geflügelmehl, tierisches Fett, Reis, Fischmehl, getrocknete Zuckerrübenschrot, Hühnerproteinhydrolysat, Trockenvollei, Natriumhexametaphosphat, Bierhefe, Fruktooligosaccharide, Natriumchlorid, Leinsamen, DL-Methionin, Mannanligosaccharide

Inhaltsstoffe nach Herstellerangaben

Rohprotein 23 %, Rohfett 10 %, Omega-6-Fettsäuren 1,75 %, Omega-3-Fettsäuren 0,35 %, Rohfaser 1,9 %, Rohasche 6 %, Wasser 8 %, Calcium 1 %, Phosphor 0,8 %, Kalium 0,82 %, Natrium 0,42 %

Zusatzstoffe nach Herstellerangaben

Vitamin A 12.500 IU/kg, Vitamin D₃ 900 IU/kg, Vitamin E 100 mg/kg, Kupfer als Kupfer-(II)-sulfat 20 mg/kg

Umsetzbare Energie (*in vivo*) 3978 kcal/kg, 16,7 MJ/kg

3.10 Probiotikum

Bei dem Probiotikum handelte es sich um das aus dem kaninen Gastrointestinaltrakt isolierte *Bifidobacterium animalis* (NCIMB 41199). Es wurde den Tieren der Probiotikagruppe in einer Konzentration von $2,35 \times 10^9$ KbE (Spanne $1,85-3,20 \times 10^9$) pro Supplement verabreicht. Das Supplement bestand in der Probiotikagruppe außerdem und in der Placebogruppe ausschließlich aus Kakaobutter und laut Hersteller „white confectionary“. Da es sich um eine doppelblinde Studie handelte, waren die Supplemente farblich gekennzeichnet und bis zum Abschluss der klinischen Phase nur so zu unterscheiden. Bei dem rosa gekennzeichneten handelte es sich um das Placebo, bei dem orangefarbenen um das Probiotikum.

3.11 Entnahme, Aufbereitung und Lagerung der Proben

Das Herstellerverzeichnis für diesen Abschnitt findet sich in Tabelle 38 im Anhang.

3.11.1 Kotproben

Vor Beginn der Studie wurde von jedem Hund eine Kotprobe zur Untersuchung auf Endoparasiten und Giardien ins Tierärztliche Labor Freiburg (PD Dr. Dr. D. Barutzki) geschickt. Im Verlauf der Studie wurden Kotproben an den Kontrolltagen 0, 30 und 90 jedes Hundes gleich in das Institut für Tierernährung transportiert und dort bei -80 °C tiefgekühlt. War dies zeitlich nicht möglich, wurden die Proben direkt in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der veterinärmedizinischen Fakultät der FU Berlin bei -44 °C tiefgekühlt und später gefroren in das Institut für Tierernährung überstellt und dort wie beschrieben bei -80 °C gelagert.

In Köln wurden die Proben in einem Tiefkühlschrank bei -20 °C gelagert und während der Rekrutierungsphase ungekühlt ins Institut für Tierernährung geschickt.

In München wurden die Proben bei -80 °C tiefgekühlt und nach Abschluss der Rekrutierungsphase auf Trockeneis in das Institut für Tierernährung gesandt.

3.11.2 Blutproben

Für die Hämatologie und das Differentialblutbild wurde ein mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) beschichtetes Blutröhrchen verwendet. Für die Klinische Chemie und die Lymphozytenisolierung wurde das Blut in einem mit Litium-Heparin beschichteten Röhrchen aufgefangen. Die Bestimmung von Trypsin-like Immunoreactivity (TLI), Cobalamin, Folsäure und C-reaktivem Protein (CRP) erfolgte aus Serum (Serumröhrchen). In Köln wurde auch die klinische Chemie in Serum ermittelt, alle Blutuntersuchungen wurden dort wie unten beschrieben in Fremdlaboren durchgeführt.

3.11.3 Lymphozyten

Das Heparinblut aus Berlin wurde für die Lymphozytenisolierung zunächst in einem Kühlakku in das Institut für Tierernährung transportiert, die Proben aus Köln wurden gekühlt nach Berlin versandt. In München wurden keine Blutproben zur Lymphozytenisolierung gewonnen. Im Institut für Tierernährung wurden die Lymphozyten nach unten genanntem Verfahren isoliert, die Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und fetalem Kälberserum (FCS) schrittweise eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgekühlt.

3.12 Diagnostisch und differentialdiagnostisch durchgeführte Untersuchungen

Das Herstellerverzeichnis für diesen Abschnitt findet sich in Tabelle 39 im Anhang, das Laborverzeichnis in Tabelle 40.

3.12.1 Hämatologische Untersuchung und Differentialblutbild

Für die hämatologische Untersuchung und das Differentialblutbild wurde in Berlin das Gerät Sysmex XT 2000i herangezogen. Das Differentialblutbild wurde in einigen Fällen maschinell, in anderen manuell erstellt. Dafür wurde ein Tropfen Blut dünn auf einem Objektträger ausgestrichen, anschließend nach Pappenheim gefärbt und 100 Zellen ausgezählt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der weißen Blutzellen bestimmt. Die Abschlussuntersuchung des Blutes eines Hundes fand in dem Labor IDEXX Vet Med Labor statt.

In Köln wurden meist externe Labore mit der Untersuchung beauftragt. Dabei handelte es sich zu Beginn der Studie in 7 Fällen um das synlab.vet Labor, in einem Fall um das praxiseigene Gerät QBC und in einem Fall um das Labor Laboklin. Zum Abschluss der Studie wurde ausschließlich das Labor synlab.vet beauftragt. In München wurde die hämatologische Untersuchung mithilfe des Gerätes Cell-Dyn® 3500 R durchgeführt und das

Differentialblutbild durch Differenzierung und manuelles Auszählen von 100 Leukozyten erstellt.

3.12.2 Klinische Chemie

In Berlin wurde das Blut für die blutchemische Untersuchung zunächst in der Megafuge 1.0 R mit 1811 x g zentrifugiert und das dabei anfallende Heparinplasma mit dem Gerät Konelab 30i untersucht. In einem Fall wurde die Abschlussuntersuchung durch das Labor IDEXX Vet Med Labor durchgeführt.

In Köln wurde zu Beginn der Studie in 7 Fällen das Labor synlab.vet beauftragt und in je einem Fall die Labore Laboklin und IDEXX Vet Med Labor. Auch das praxiseigene Gerät der überweisenden Praxis wurde einmal genutzt. Zum Abschluss der Studie wurde in 8 Fällen das Labor synlab.vet mit der Untersuchung beauftragt, in einem Fall wurde keine klinische Chemie angefertigt.

In München erfolgte die Untersuchung mithilfe des Gerätes Roche/Hitachi 911.

Die Referenzbereiche der verwendeten Parameter nach Kraft und Dürr (2005) und die daraus errechneten SI-Einheiten sind Tabelle 7 zu entnehmen:

Tab. 7: Referenzbereiche der verwendeten Parameter der klinischen Chemie

Parameter	Referenzbereich nach Kraft und Dürr (2005)	Referenzbereich als SI-Einheit
Kalzium	2,3-3,0 mmol/l	2,3-3,0 mmol/l
Gesamtprotein	5,4-7,5 g/dl	54-75 g/l
Albumin	2,5-4,4 g/dl	362,25-637,56 µmol/l
ALT	≤55 U/l	≤55 U/l
GLDH	≤6 U/l	≤6 U/l
AP	≤108 U/l	≤108 U/l
AST	≤44 U/l	≤44 U/l

ALT= Alanin-Amino-Transferase; GLDH= Glutamat-Dehydrogenase; AP= Alkalische Phosphatase; AST= Aspartat-Amino-Transferase

3.12.3 Trypsin-like Immunoreactivity (TLI)

Die Bestimmung des TLI-Wertes erfolgte im Serum der Tiere mithilfe eines Enzyme Immunoassay (EIA) und wurde meist im Labor Laboklin durchgeführt.

In Köln wurde der TLI-Wert in einem Fall im IDEXX Vet Med Labor, in zwei Fällen bei synlab.vet und in 6 Fällen bei Laboklin bestimmt. In München wurde in 2 Fällen das Labor IDEXX Vet Med Labor und in einem Fall das Labor Laboklin mit der Untersuchung beauftragt.

Der vom Labor angegebene Referenzbereich ist Tabelle 8 zu entnehmen.

3.12.4 Cobalamin und Folsäure

Die Bestimmung der Werte für Cobalamin und Folsäure erfolgte mithilfe eines Lumineszenzimmunoassays (LIA). Es wurde zu Beginn immer und zum Abschluss der Studie meist das Labor Laboklin beauftragt. In einem Fall fand die Abschlussuntersuchung im Labor IDEXX Vet Med Labor statt, in einem Fall bei Alomed. Von insgesamt drei Hunden konnte die Abschlussserumprobe nicht gewonnen werden, die Serumprobe eines Hundes konnte aufgrund eines Laborfehlers nicht untersucht werden, in einem anderen Fall reichte das vorhandene Material zur Bestimmung von Cobalamin nicht aus.

Der vom Labor angegebene Referenzbereich ist Tabelle 8 zu entnehmen.

3.12.5 C-Reaktives Protein (CRP)

Das CRP wurde zu Beginn und zum Abschluss der Studie stets im Labor Laboklin bestimmt. Das Labor verwandte zur Untersuchung den „Canine C- Reactive Protein Assay“ der Firma Tridelata Development Limited, Irland. Diesem Assay liegt ein ELISA zugrunde (Kjelgaard-

Hansen et al. 2003). Die Abschlussserumprobe für die Untersuchung des CRP konnte von insgesamt zwei Hunden nicht gewonnen werden.

Der vom Labor angegebene Referenzbereich ist Tabelle 8 zu entnehmen:

Tab. 8: Referenzbereiche (vom untersuchenden Labor angegeben) für die Parameter Trypsin-like Immunoreactivity, Vitamin B₁₂, Folsäure und C-Reaktives Protein

Parameter	Referenzbereich nach Angaben des untersuchenden Labors
TLI	>5 µg/l (fraglich 2,5-5 µg/l)
Vitamin B ₁₂	300-800 pg/ml
Folsäure	3 (4)-10 ng/ml
CRP	<15 mg/l

TLI = Trypsin-like Immunoreactivity; CRP= C-Reaktives Protein

3.12.6 Kotuntersuchung

Die Untersuchung auf Endoparasiten und Giardien (durch Anreicherung und EIA) im Kot erfolgte bei fast allen Probanden im Tierärztlichen Labor Freiburg. In einem Fall wurde die Kotuntersuchung jedoch im Labor IDEXX Vet Med Labor, in einem anderen im Labor Laboklin durchgeführt.

3.12.7 Röntgen

Die Röntgenuntersuchung der Hunde aus Berlin erfolgte mithilfe des Röntgengerätes Philips Optimus 56/65/80, Version 3.5, Class I, Type B, in Köln mit dem Gerät Philips Medio 50 CP-H mit Buckytisch und Belichtungsautomatik und in München mit dem Gerät R 309 LM. Es wurde eine latero-laterale und meist auch eine ventrodorsale Aufnahme des Abdomens angefertigt und durch den behandelnden Tierarzt beurteilt.

3.12.8 Ultraschall des Abdomens

In Berlin erfolgte die Ultraschalluntersuchung des Abdomens entweder mit dem Gerät Megas GPX oder mit dem Ultraschallgerät V. 300, Typ Sigma 110D. In Köln wurde das Gerät Logiq 500, in München das Gerät Logiq 5 Expert verwendet. Es wurden zunächst alle darstellbaren abdominalen Organe auf vom Normalbefund abweichende Befunde untersucht, dann erfolgte eine genauere Untersuchung des Darmes, vor allem der Darmwände und der assoziierten Lymphknoten. Die Ultraschalluntersuchung wurde vom behandelnden Tierarzt durchgeführt.

3.12.9 Endoskopie

Die Gastro-, Duodeno- und Rektoskopie erfolgte in Berlin je nach Körpergröße des Hundes mit den flexiblen Videoendoskopen Pentax EG-2470K oder Karl Storz 60118 PKS. In Köln wurden die Geräte Olympus CF Typ 18 oder Olympus GIF Typ PQ 20 verwendet, in München das Videoendoskop Olympus PCF-140L. Die Gastro- und Duodenoskopie wurde bei 21 Hunden und zusätzlich eine Rektoskopie bei 18 Hunden durchgeführt. Wurde eine Rektoskopie durchgeführt, wurden die Hunde drei Tage nüchtern gehalten und sie wurden täglich einer rektalen Spülung unterzogen. Einige der Tiere wurden in diesem Zeitraum stationär aufgenommen. Während der Endoskopie erfolgte die makroskopische Beurteilung der gastrointestinalen Schleimhaut mit anschließender Entnahme von Zangenbiopsien aus allen erreichbaren Darmabschnitten. Bei einem Hund (Hund 7) erfolgte die Entnahme von Vollschichtbiopsien aus Duodenum und Kolon, bei einem Hund (Hund 22) sowohl die Entnahme von Zangenbiopsien während der Endoskopie als auch die Entnahme von Vollschichtbiopsien des Dünndarms.

3.12.10 Histopathologische Untersuchung

Die histopathologische Untersuchung der Biopsien wurde im Zentrum für Pathologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Bilzer nach dem dort etablierten Verfahren durchgeführt.

3.13 Lymphozytenisolierung und –phänotypisierung im Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)

3.13.1 Herstellung der PBS-Lösung (Phosphate-Buffered Saline)

Die Grundsubstanz zur Herstellung einer PBS-Lösung war das PBS Dulbecco der Firma Biochrom AG. Zur Herstellung von 10 Litern PBS-Lösung wurde die nötige Menge des Salzes zunächst in 1 l Reinstwasser gelöst, dann 10fach verdünnt und anschließend autoklaviert.

3.13.2 Isolierung

Um die Lymphozyten aus dem Heparinblut isolieren zu können, mussten 3 ml des Heparinblutes in 3 ml PBS suspendiert werden. Diese Lösung wurde dann vorsichtig auf 3 ml Ficoll pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 452 x g über 30 min. bei 20 °C ohne Bremse. Der dabei entstehende Lymphozytenring wurde abgenommen und zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und jeweils mit 452 x g bei 4 °C 5 min. zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 1ml PBS gelöst. Um die Lymphozytenzahl bestimmen zu können, wurden 10 µl der Zellsuspension in 50 µl Trypanblau und 40 µl PBS suspendiert, und in einer Neubauer Zählkammer bei 40-facher Vergrößerung gezählt. Die Lösung wurde mit fetalem Kälberserum (FCS) und Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Verhältnis von 1:10 auf eine Zellzahl von 0,5-1 x 10⁷ Zellen/ml eingestellt (Iotzova 2005). Die dabei entstandene Lösung wurde auf Eppendorf-Tubes aufgeteilt und bei -80 °C schrittweise bis zur weiteren Untersuchung eingefroren. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, erfolgte die Lymphozytenphänotypisierung am Ende der Untersuchung für alle Proben gemeinsam.

3.13.3 Lymphozytenphänotypisierung

Die Behandlung der Lymphozyten vor der Antikörperfärbung erfolgte nach einem von Garcia-Pineros et al. (2006) publizierten, modifizierten Verfahren. Zunächst wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die erste Waschung erfolgte mit 5 ml RPMI 1640 Medium (1x), die zweite wurde mit 20 %igem FCS in RPMI 1640-Lösung durchgeführt. Zentrifugiert wurde mit 243 x g über 10 Minuten bei Raumtemperatur. Das Pellet wurde in 10 ml 10 %igem fetalem Kälberserum in RPMI 1640 resuspendiert. Zu dieser Lösung wurden 150 Einheiten RNase-freier DNaseI (Deoxyribonuclease from bovine pancreas) hinzugefügt und für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 243 x g über 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Pellet in 500 µl FACS-Puffer (PBS mit 0,7% bovinem Serumalbumin) resuspendiert. Davon wurden je 100 µl in die 5 vorbereiteten FACS-Röhrchen pro Tier pipettiert. In 4 der Röhrchen wurde je 50 µl eines des in Tabelle 9 aufgeführten, verdünnten Antikörpers hinzugegeben. Das 5. Röhrchen diente als Negativkontrolle und wurde so belassen.

Tab. 9: Zur Lymphozytenphänotypisierung herangezogene Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Isotyp	Sekundärer Antikörper
mouse-anti-dog CD4	1:10	IgG1	goat-anti-mouse IgG1-FITC
mouse-anti-dog CD8	1:20	IgG1	goat-anti-mouse IgG1-FITC
mouse-anti-dog B-cells	1:100	IgG1	goat-anti-mouse IgG1-FITC
rat-anti-canine CD5	1:100	IgG2a	mouse-anti-rat IgG2a heavy chain-FITC

Nach einer Inkubation über 25 Minuten bei Raumtemperatur wurde mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 452 x g über 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl des fluoreszenz-markierten, sekundären Antikörpers resuspendiert. Das Pellet in der Negativkontrolle wurde in 300 µl des FACS-Puffers resuspendiert. Es folgte eine verdunkelte Inkubation über 25 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden wieder 2 ml FACS-Puffer zu jeder Probe hinzugegeben und über 5 Minuten bei 452 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Kurz vor der Messung wurde zu jeder Probe 1 µl Propidiumiodid (0,25 mg/ml) hinzugegeben, um die Vitalität der Zellen bestimmen zu können. Anschließend erfolgte die Messung im Fluorescence Activated Cell Sorter mithilfe der Software „BD Cell Quest Pro“, mit der auch die Auswertung vorgenommen wurde.

Das Herstellerverzeichnis für diesen Abschnitt findet sich in Tabelle 41 im Anhang.

3.14 DNA-Extraktion und Real time-PCR zur Erfassung der eubakteriellen Gesamtkeimzahl, von Bakterien der *Clostridium leptum*- und der *Clostridium coccooides*-Gruppe, zur Bestimmung der Keimzahlen von Laktobazillen und Bifidobakterien und zum Nachweis probiotischer DNA

3.14.1 Herstellung der benötigten Materialien

Waschen der Glasperlen

Die Glasperlen wurden in einem Becherglas zunächst mit Salzsäure (Hydrochloric Acid) überschichtet und 10 Mal nach je 30 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte das Autoklavieren bei 121 °C und 1 bar über 20 Minuten und eine Trocknung im Wärmeschrank.

Herstellung der GITC-Lösung (Guanidinisothoncyanat-Lösung)

Für die Herstellung des benötigten CSB-Puffers wurde zunächst 100 ml Reinstwasser in einem Messzylinder vorgelegt und bei laufendem Magnetrührer 3,25 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 2,075 g N-Lauroylsarcosine und 50 µl Antifoam Y-30 Emulsion hinzugegeben. Die Lösung wurde ohne Rührer auf 250 ml aufgefüllt und anschließend mit dem wieder hinzugefügten Rührfisch bei 121 °C und 1 bar für 20 Minuten autoklaviert. Dann wurden auf einem geheizten Magnetrührer 50 µl Mercaptoethanol, 250 µl einer 0,1 molaren Dithiothreit-Lösung und 187,5 g GITC hinzugegeben. Die fertige Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Herstellung der RNase

Zu Herstellung der benötigten RNase wurden 0,01 g Ribonuclease A in 1000 µl destilliertem Wasser gelöst, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend langsam abgekühlt.

3.14.2 Einwiegen der Proben

Die bei -80 °C gelagerten Kotproben wurden zunächst kurz vor der Bearbeitung auf Eis angetaut und anschließend 1 g der Probe (Feinwaage: Sartorius BP 110S) mit 3 g in Salzsäure gewaschenen Glasperlen (Waage: Sartorius Laboratory Typ L-610, Sartorius BP 1200) in einem Szintillationsröhrchen eingewogen. Die Proben wurden dabei ständig auf Eis gehalten.

Um die bakterielle DNA aus dem biologischen Material zu gewinnen, wurden die Zellen lysiert, um die Nukleinsäuren anschließend isolieren und aufreinigen zu können.

3.14.3 DNA-Extraktion

Zellyse

Zur Lyse der Zellen wurden zu jeder Probe 10 ml auf 60 °C erwärmte GITC-Lösung zugegeben und 5 Minuten im Wasserbad bei 60 °C inkubiert. Darauf folgte das Schütteln der Proben für 2 min. in der Retschmühle bei einer Frequenz von 30/sec.. Danach wurden die Proben sofort wieder auf Eis gestellt und 1 Minute gewartet, bis sich noch verbliebene größere Partikel am Grund abgesetzt hatten. Der bereits wässrige Teil der Probe wurde in ein steriles Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen dekantiert, der Rest erneut mit 7 ml GITC-Lösung für 5 Minuten im Wasserbad bei 60 °C inkubiert, für 2 Minuten in der Retschmühle geschüttelt und in die entsprechenden Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen überführt.

Extraktion

Während der Extraktion der Nukleinsäure aus dem proteinhaltigen Zellysate wurden die Proben weiterhin auf Eis gehalten. 20 ml Phenol wurde zugegeben, die Röhrchen geschwenkt und ohne Bremse zentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 18000 x g). 15 ml des dabei entstehenden Überstandes wurden mithilfe einer sterilen Spritze und Kanüle in ein neues Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen überführt und 15 ml einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung im Verhältnis 1:24 hinzugegeben. Dies diente der Entfernung der Phenolreste aus dem Nukleinsäure-Extrakt. Anschließend wurden die Röhrchen geschwenkt und zentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 18000 x g ohne Bremse). Der abnehmbare Überstand (10-13 ml) wurde in ein neues steriles Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen überführt und 16-19 ml bei -30 °C gekühltes Isopropanol zugegeben (abgenommenes Volumen + 6 ml), geschwenkt und über Nacht bei -30 °C gelagert, um der Probe Wasser zu entziehen (Sanyo Biomedical Freezer, Modell MDF-U333).

Abtrennung des DNA-Rohextrakts und DNA Reinigung

Am nächsten Tag wurden die Proben bei 4 °C und 25000 x g für 30 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml bei -30 °C gekühlten 70 %igen Ethanol gewaschen und zentrifugiert (30 Minuten, 4 °C, 25000 x g, ohne Bremse). Nach dem Dekantieren wurden die Röhrchen 10 Minuten über Kopf zum Trocknen aufgestellt und anschließend zu jeder Probe 1 ml des Lysis-Puffers T1 hinzugefügt. Der gesamte Inhalt wurde daraufhin in ein steriles 2 ml Eppendorf Tube überführt und auf dem Vortexer geschüttelt, bis sich das gesamte Pellet gelöst hatte. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C tiefgekühlt.

Die weitere Reinigung der bakteriellen DNA wurde unter Verwendung des Machery-Nagel Nucleo-Spin® Tissue Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Gereinigte DNA-Extrakte wurden bei -20°C gelagert.

3.14.4 Bestimmung der DNA-Konzentration in den Proben

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in den Proben erfolgte mithilfe des Gerätes NanoDrop® Fluorospectrometer ND 3300 und der dazugehörigen Software ND 3300. Es wurde eine Stammlösung aus 495 µl 1x TNE-Lösung (aus TNE-Puffer) und 5 µl Hoechst 33258 und eine Arbeitslösung aus 499 µl 1x TNE und 1 µl Stammlösung hergestellt. Das 1x TNE und die Arbeitslösung wurden an jedem Arbeitstag neu hergestellt.

Zu Beginn der Messung wurde zunächst eine Standardkurve erstellt und dann 5 µl Probenmaterial mit 5 µl Arbeitslösung in eine Mikrotiterplatte verdünnt. Davon wurden 2 µl auf das Gerät aufgetragen und anschließend gemessen. War die Konzentration der DNA für die Messung zu hoch, wurde mit der Arbeitslösung zuerst 1:10, dann 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt. Die Probe wurde so oft aufgetragen und gemessen, bis sich drei Werte ergaben, deren maximale Abweichung 10 % betrug. Daraus wurde ein Mittelwert errechnet. Zwischen

jeder Probe wurde der Detektor abgewischt und mit sterilfiltriertem Milliporewasser gereinigt.

3.14.5 Real Time-PCR

Für die Detektion der bakteriellen Gruppen und eubakteriellen Zellzahl war das Zielgen das bakterielle 16S rRNA-Gen. Um die inhibitorischen Effekte der Proben-Matrix bei der Real Time PCR-Quantifizierung zu berücksichtigen und damit eine Identität der Amplifikationsbedingungen bei Standard- und Versuchsproben zu erreichen, wurden DNA-Extrakte aus künstlich inokulierten, sterilen Fäzes-Proben als Quantifizierungsstandards benutzt (Vahjen et al. 2007; Klär 2008).

Zunächst wurde ein PCR-Ansatz hergestellt. Die Zusammensetzung ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tab. 10: Reaktionskomponenten der Real Time-PCR Probenansätze zur Bestimmung von Eubakterien, Bakterien der Gruppen *Clostridium leptum* und *Clostridium coccooides*, von Bifidobakterien, Laktobazillen und der probiotischen DNA

	Eubakterien	<i>Clostridium-leptum</i> - Gruppe	<i>Clostridium-coccooides</i> - Gruppe	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Probiotikum- DNA	Hersteller
Master Mix	2x Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix	2x Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix	2x Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix	2x Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix	2x Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix	2x Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix	Stratagene, Texas, USA
Reference Dye	ROX (3nM)	ROX (3nM)	ROX (3nM)	ROX (3nM)	ROX (3nM)	ROX (3nM)	Stratagene, Texas, USA
Primer/ Sonde	1512-F (10µM)	Sg Clept-F	g-Ccoc-F	LAC 1	g-Bifid-F		MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
	785-R (10µM)	Sg Clept-R3	g-Ccoc-R	LAC 2	g-Bifid-R	MGB Taq Man® Probe ¹	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
	RNasefreies Wasser	RNasefreies Wasser	RNasefreies Wasser	RNasefreies Wasser	RNasefreies Wasser	RNasefreies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland

¹: Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA

Der passive Referenzfarbstoff ROX (6-carboxy-X-Rhodamine) diene dazu, die Fluoreszenzmessung im Reaktionsansatz vom Volumen unabhängig zu machen und störende Fluktuationen der Fluoreszenz während der Reaktion auszugleichen.

24 µl des Probenansatzes wurden mit 1 µl der Probe gemischt. Anschließend wurde die PCR mit dem Gerät Stratagene Mx 3000 PTM und der zugehörigen Software Stratagene Mx Pro durchgeführt. Als Amplifikationprotokoll wurden die in Tabelle 11 dokumentierten Temperaturprogramme verwendet.

Tab. 11: Reaktionsbedingungen und PCR-Parameter

	Eubakterien			<i>Clostridium leptum</i> -Gruppe		
	Zeit [min.]	Temperatur	Zyklusanzahl	Zeit [min.]	Temperatur	Zyklusanzahl
Initialisierung	15:00	95°C	1	10:00	95°C	1
Denaturierung	00:15	95°C	40	00:15	95°C	40
Binden der Primer- Moleküle	01:00	50°C		01:00	55°C	
Elongation der DNA- Fragmente	00:30	72°C		01:00	72°C	
Schmelzkurve				01:00	95°C	1
				00:30	55°C*	
				00:30	95°C	
	<i>Clostridium coccooides</i> -Gruppe			<i>Lactobacillus</i> spp.		
	Zeit [min.]	Temperatur	Zyklusanzahl	Zeit [min.]	Temperatur	Zyklusanzahl
Initialisierung	10:00	95°C	1	10:00	95°C	1
Denaturierung	00:15	95°C	40	00:15	95°C	40
Binden der Primer- Moleküle	01:00	55°C		01:00	55°C	
Elongation der DNA- Fragmente	01:00	72°C		01:00	72°C	
Schmelzkurve	01:00	95°C	1	01:00	95°C	1
	00:30	55°C*		00:30	55°C*	
	00:30	95°C		00:30	95°C	

* +0,2 °C/30sec

	<i>Bifidobacterium spp.</i>			Probiotikum-DNA		
	Zeit [min.]	Temperatur	Zyklenanzahl	Zeit [min.]	Temperatur	Zyklenanzahl
Initialisierung	15:00	95°C	1	15:00	95°C	1
Denaturierung	00:15	95°C	40	00:10	95°C	40
Binden der Primer- Moleküle	01:30	55°C		01:00	55°C	
Elongation der DNA- Fragmente	01:00	72°C		01:00	72°C	
Schmelzkurve	01:00	95°C	1	00:30	25°C	1
	00:30	55°C*				
	00:30	95°C				

* +0,2 °C/30sec

Tabelle 12 sind die Primersequenzen und Literaturhinweise zu entnehmen.

Tab. 12: Gruppen- und speziesspezifische Oligonukleotide für die Detektion der ausgewählten Bakterien und der probiotischen DNA

Bakteriengruppen bzw. -arten	Primer/Sonde	Primer-/Sondensequenz (5→'3')	Zielgen	Produktgröße, bp	Annealingtemperatur	Literatur
Eubakterien	785R	GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC	16S rRNA	727	1 min. 50 °C	Lyons et al. (2000)
	1512F	TAC CTT GTT ACG ACT T				
<i>Clostridium leptum</i>-Gruppe	Sg Clept-F	GCA CAA GCA GTG GAG T	16S rRNA	239	1 min. 55 °C	Matsuki et al. (2004)
	Sg Clept-R3	CTT CCT CCG TTT TGT CAA				
<i>Clostridium coccooides</i>-Gruppe	g-Ccoc-F	AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA	16S rRNA	440	1 min. 55 °C	Matsuki et al. (2004)
	g-Ccoc-R	CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A				
<i>Lactobacillus</i> spp.	LAC 1	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A	16S rRNA	340	1 min. 55 °C	Walter et al. (2001)
	LAC 2	CAC CGC TAC ACA TGG AG				
<i>Bifidobacterium</i> spp.	g-Bifid-F	CTC CTG GAA ACG GGT GG	16S rRNA	550	1,5 min. 55°C	Matsuki et al. (2004)
	g-Bifid-R	GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A				
Probiotikum-DNA	MGB Taq Man® Probe	6FAM CGG GTG GTG TCC CTT GCT GGC T	16S rRNA- intergenic spacer	unbekannt	1 min. 55 °C	nach Angaben des Herstellers Firma Iams

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgte über die ermittelten Fluoreszenzdaten. Anhand der gemessenen Quantifizierungsstandards wurde mithilfe der MxPro3000-Software eine Eichgrade ermittelt. Zur Ermittlung des Gehalts an amplifizierter DNA in den Proben wurden die erfassten Fluoreszenzdaten aus der linearen Amplifikationsphase über die Eichgrade bestimmt und als Zellzahl pro Gramm Probe angegeben.

Nachweis der probiotischen DNA in den Fäzes

Für den Nachweis der DNA des eingesetzten Probiotikums wurde zunächst DNA aus dem probiotischen Produkt extrahiert. Dafür wurden 0,1 g des Probiotikum-Supplements in ein Eppendorf-Tube überführt, mit 720 µl T1-Puffer und 100 µl Proteinase K versetzt und bei 56 °C über 60 Minuten inkubiert. Die Lyse erfolgte durch die Inkubation mit 800 µl B3-Puffer bei 70 °C über 10 Minuten. Um die Bindung an die Säule vorzubereiten, wurden 840 µl 99,8 %iges Ethanol hinzugegeben, anschließend die gesamte Probe auf die Säule pipettiert und bei 16000 x g über 1 Minute zentrifugiert. Die Waschung erfolgte in zwei Schritten: zunächst wurden 500 µl BW-Puffer hinzugegeben und über 1 min. bei 9486 x g zentrifugiert, dann wurde mit 600 µl B5-Puffer gewaschen und über 2 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und der Filter auf ein steriles Eppendorf-Tube umgesteckt. Die Eluierung erfolgte mit 100 µl auf 70 °C vorgewärmten BE-Puffers und einer Zentrifugation bei 16000 x g über eine Minute, nachdem die Probe 1 Minute bei Raumtemperatur stehengelassen worden war. Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des Gerätes NanoDrop[®] Fluorospectrometer ND 3300 und der dazugehörigen Software ND 3300 gemessen und die DNA-Konzentration auf 100 ng/µl eingestellt. Daraus wurde eine dekadische Verdünnungsreihe hergestellt, die als Kalibrierreihe für den anschließenden Nachweis der Probiotikum-DNA in den DNA-Extrakten aus den Kotproben der Studienprobanden diente. Der Nachweis erfolgte mithilfe der Sonde „Major Group Binder (MGB) Taq Man[®] Probe“. Die Ergebnisse wurden als ng Probiotikum DNA pro g Fäzes angegeben.

Das Herstellerverzeichnis für diesen Abschnitt findet sich in Tabelle 42 im Anhang.

3.15 Therapie der Hunde mit chronischer Enteropathie

Das Behandlungsschema in Berlin sah wie folgt aus: Zur Behandlung der gastrointestinalen Entzündung bzw. bei einer vermuteten Beteiligung von Mikroorganismen in der Pathogenese erhielten die Hunde zu Beginn der Therapie Metronidazol in einer Dosierung von 10 mg/kg 2 x täglich, bei Übelkeit und/oder Erbrechen auch Ranitidin in einer Dosierung von 1 mg/kg 2 x täglich. Bei häufigem Erbrechen wurde Metoclopramid in einer Dosierung von 0,3 mg/kg 2-3 x täglich verabreicht. Ließ der Zustand des Tieres es zu, wurden diese Medikamente im Laufe der Studie langsam reduziert. Brachte diese Therapie jedoch keinen Erfolg und unterstützte die histologische Untersuchung der Darmbiopsien die Diagnose IBD, wurde mit Prednisolon in einer Dosierung von initial 0,5-1 mg/kg 1-2 x täglich weiter therapiert. Falls Ranitidin nicht wirksam war (beispielsweise weiteres Aufstoßen), wurde auf Omeprazol in einer Dosierung von 1 mg/kg 2 x täglich umgestellt. Bei perianalen Fisteln wurde Ciclosporin in einer Dosierung von 2,5 mg/kg 1 x täglich in Kombination mit Ketokonazol in einer Dosierung von 2,5 mg/kg 1 x täglich verabreicht. Dies war bei nur einem Probanden erforderlich. Bei Beteiligung des Dickdarms wurde der Futterzusatz Psyllium, bei Beteiligung des Dünndarms der Futterzusatz Pankrex[®] gefüttert. Bei Pankrex[®] handelt es sich um einen Futtermittelzusatzstoff, der Pankreasenzyme (Amylase, freie Protease, Lipase) enthält. Bei einer Hypocobalaminämie erfolgte die Substitution von Cobalamin. Hunde mit einer Körpermasse <15 kg erhielten 500 µg s.c., Hunde >15 kg erhielten 1000 µg s.c. Die Substitution erfolgte 6x im wöchentlichen Abstand, dann 3x im 14tägigen Abstand, 1x 4 Wochen später, wobei nach weiteren 4 Wochen der Serumspiegel erneut kontrolliert wurde (Allenspach et al. 2007).

In Köln wurde bei einem Nachweis chronischer gastrointestinaler Symptome, Feststellung der Lokalisation (Dünn- versus Dickdarm), nach Ausschluss extraintestinaler Ursachen

(Labordiagnostik, Ultraschall) und infektiöser Ursachen (kotparasitologische und bakteriologische Untersuchungen und antiparasitäre Behandlung) und nach Ausschluss einer Mechanopathie und Neoplasie nach folgendem Schema vorgegangen:

1. Stufe: Verfütterung der in der Studie eingesetzten Diät („Intestinal *Low-residue*TM / Canine Dry Formula“ (Iams® Veterinary Formulas, Procter und Gamble, Cincinnati, USA)), wenn erfolglos
2. Stufe: Zusätzliche Gabe von Metronidazol 2 x 10 mg/kg täglich über mindestens 2 Wochen, wenn erfolglos
3. Stufe (nach histologischem Nachweis der Entzündung im Darm und Ausschluss anderer bekannter Entzündungsursachen): bei reiner Enddarmproblematik zunächst 5-Aminosalicylsäure-Präparate wie Mesalazin und Sulfasalazin, bei echter IBD: Einsatz von Kortikosteroiden in entzündungshemmender oder immunsuppressiver Dosis.
4. Stufe (refraktäre Verläufe, Hunde mit schwerem enteralem Eiweißverlust): Kortikosteroide in immunsuppressiver Dosis

Das Münchener Therapieschema sah wie folgt aus:

In der Regel wurde im ersten Schritt mit einem Breitbandanthelminthikum entwurmt (z. B. Fenbendazol 50 mg/kg p.o. 1 x täglich über 3-5 Tage), um einen okkulten Parasitismus auszuschließen. Im nächsten Schritt wurde das in der Studie eingesetzte Futter („Intestinal *Low-residue*TM / Canine Dry Formula“ (Iams® Veterinary Formulas, Procter und Gamble, Cincinnati, USA)) verfüttert. Eine Antibiotikagabe war bei den Münchener Patienten nicht notwendig.

Wenn eine idiopathische Darmentzündung diagnostiziert wurde und der Patient mit der in der Studie eingesetzten Diät ein untolerierbares Erkrankungsausmaß aufgewiesen hätte, dann wären antientzündliche/immunsuppressive Medikamente eingesetzt worden. In der Regel würde je nach Schweregrad der Erkrankung mit Prednisolon in einer immunsuppressiven (2 mg/kg p.o. 1 x tgl.) oder antientzündlichen (1 mg/kg p.o. 2 x tgl.) Dosierung begonnen. Bei Ansprechen wird die Dosis in 2-3 Wochenabständen graduell reduziert, um die niedrigste wirksame Dosis zu finden. Auch dies war bei den Münchener Patienten nicht notwendig.

3.16 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 15.0 für Windows. Der Untersuchungszeitraum wurde in Perioden unterteilt und diese im Gruppenvergleich ausgewertet. Zusätzlich wurden Änderungen der verschiedenen Parameter von einer Periode zur nächsten zwischen den Gruppen verglichen. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen und solche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,1$ als Tendenz angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in den Grafiken mit einem Stern (*), Tendenzen mit einem in Klammern gesetzten Stern ((*)) gekennzeichnet. Nicht normalverteilte Daten wie die klinischen Daten, die Blutwerte und der DNA-Gehalt und der Gehalt an Probiotikum-DNA in den Fäzes wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet und als Boxplot, als Tabelle mit Median, Minimum, Maximum, 25 %-Perzentil und 75 %-Perzentil oder als Häufigkeitsverteilung dargestellt. Normalverteilte Daten wie der Gehalt der verschiedenen Lymphozytenuntergruppen im Blut und die logarithmierten Keimzahlen in den Fäzes in log KbE/g wurden mithilfe des T-Tests ausgewertet und als Balkendiagramm mit Standardabweichung bzw. als Tabelle mit arithmetischem Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Signalement

4.1.1 Rasse, Alter und Geschlecht

In die Studie wurden 32 Tiere aufgenommen, von denen 9 weiblich, 5 weiblich kastriert, 16 männlich und 2 männlich kastriert waren. Es waren die folgenden Rassen vertreten: Belgischer Schäferhund (n=1), Berner Sennenhund (n=1), Bordeaux-Dogge (n=1), Bouvier (n=1), Boxer (n=2), Briard (n=1), Cairn-Terrier-Mix (n=1), Collie (n=1), Deutscher Schäferhund (n=1), Dobermann (n=1), Golden Retriever (n=3), Groenendael (n=1), Husky (n=2), Irish Setter (n=1), Labrador (n=4), Malinois (n=1), Mischling (n=1), Mittelschnauzer (n=1), Rauhaar-Teckel (n=1), Rottweiler (n=3), West Highland White Terrier (n=2) und Zwerg-Langhaar-Teckel (n=1). Das Alter der Tiere lag bei Beginn der Studie zwischen 0,75 und 10,9 Jahren. Der Median lag bei 2,1 Jahren, die Körpermasse lag zu Beginn der Studie zwischen 4 und 48,6 kg, der Median bei 28,3 kg.

Das vollständige Signalement der Probanden findet sich in Tabelle 43 im Anhang.

4.2 Anamnese

Im Folgenden wird neben der Häufigkeit der Merkmale in % auch das n der Tiere angegeben, zu denen die entsprechenden Daten erhoben werden konnten, da die Anamnese nicht in allen Punkten vereinheitlicht werden konnte. Die ersten Krankheitssymptome traten bei den meisten Hunden (n = 22; 68,8 %) in den ersten 3 Lebensjahren auf, in der Hälfte dieser Fälle sogar noch vor der Vollendung des ersten Lebensjahres. Bei 3 Tieren traten die ersten Symptome im Alter von 4-6 Jahren auf (9,4 %), bei 4 Tieren im Alter von 7-9 (12,5 %) und bei 3 Tieren im Alter von über 9 Jahren (9,4 %). Zu Beginn der Studie zeigten die Tiere die Symptome bereits seit 4 Wochen bis 5,5 Jahren (Median: 5 Monate), rezidivierend oder kontinuierlich. Bei den Hunden, die eine rezidivierende Symptomatik gezeigt hatten, reichte die Häufigkeit des Auftretens von 3x pro Jahr bis zu 2x pro Woche, die Dauer der Symptomphase reichte in diesen Fällen von einem Tag bis zu 2 Wochen. Bei den Tieren, die die Symptomphasen nur 3x pro Jahr zeigten, war ohne therapeutische Intervention keine Remission zu erreichen und die Symptomphasen waren lang genug, um im Rahmen der Studie beurteilt werden zu können.

Sieben Hunde wiesen klinisch ausschließlich eine Dünndarmsymptomatik auf (21,9 %), zwei Hunde ausschließlich Dickdarmsymptome (6,3 %) und 23 Hunde zeigten sowohl Dünndarm- als auch Dickdarmsymptome (71,9 %).

Anamnestisch wurde die Aktivität, der Appetit und das Auftreten von Erbrechen von 32 Tieren erfasst. Davon zeigten 34,4 % eine reduzierte Aktivität, 37,5 % einen reduzierten Appetit und 62,5 % der Tiere das Symptom Erbrechen. Ein Auftreten von Hämatochezie zeigte sich anamnestisch in 65 % der Fälle (n = 20) und Schleim in den Fäzes in 82,6 % der dokumentierten Fälle (n = 23). Die Kotabsatzfrequenz war bei 100 % der Hunde erhöht (n = 32). Einen Gewichtsverlust zeigten nach Besitzerangaben 65,6 % der Tiere (n = 32) vor Studienbeginn. Er betrug im Mittel 5,2 % der Körpermasse (\pm 5,6 %, Schätzwerte der Besitzer und durch Wiegunen erfasst). Das Auftreten von Flatulenzen wurde bei 29 Hunden anamnestisch erfasst. Davon zeigten 58,6 % dieses Symptom. Borborygmen (n = 28) traten anamnestisch bei 64,3 % der Hunde auf, Bauchschmerzen (n = 27) bei 40,7 % der Hunde und Unbehagen (n = 27) bei 51,9 % der Tiere. Bei 86,7 % der Tiere trat anamnestisch Tenesmus auf (n = 15). Welche dieser Parameter zu Studienbeginn beim Einzeltier erfasst wurden, zeigt Tabelle 44 im Anhang.

4.3 Befunde der klinischen Untersuchung

Ergebnisse der klinischen Allgemeinuntersuchung vor Beginn der Intervention

Bei der ersten klinischen Allgemeinuntersuchung im Rahmen der Studie zeigten die meisten Hunde ein ungestörtes Allgemeinbefinden, zwei Hunde wiesen jedoch ein reduziertes

Allgemeinbefinden auf (Hunde 13, 28). Die Schleimhäute waren in der Regel rosa und feucht, ein Hund wies jedoch rote und trockene Schleimhäute (Hund 13), ein anderer Hund blassrosafarbene und nur mäßig feuchte Schleimhäute auf (Hund 20). Die kapilläre Füllung der Gefäße war bei allen Hunden prompt. Bei einem Hund war der rechte *Ln. cervicalis superficialis* pflaumengroß (Hund 13), bei einem anderen die *Lnn. mandibulares* vergrößert (Hund 16) und bei einem Hund waren alle tastbaren Körperlymphknoten geringgradig vergrößert (Hund 28). Bei allen anderen Tieren waren die tastbaren Körperlymphknoten ohne besonderen Befund. Die Rektaltemperatur lag bei allen Hunden zwischen 37,9 und 39,1 °C. Ein Hund der Probiotikagruppe äußerte bei der Temperaturmessung starke Schmerzen (Hund 20). Das Abdomen war bei acht Hunden angespannt, aber nicht dolent (Hunde 1, 7, 14, 15, 19, 23, 29, 30), ein Tier davon hatte außerdem ein pralles Abdomen (Hund 30), ein anderer krümmte zusätzlich den Rücken auf (Hund 19). Ein Tier wies diffus verdickte Darmschlingen auf (Hund 10) und bei einem anderen ergab die Palpation eine Umfangsvermehrung ca. 15 cm im Durchmesser, außerdem waren bei diesem Tier die Lymphknoten im Abdomen tastbar und er zeigte bei der Palpation Darmgeräusche (Hund 13). Darmgeräusche und verdickte Darmschlingen traten außerdem bei Hund 28 auf. Die restlichen Hunde hatten ein weiches, nicht druckdolentes Abdomen. Ein Tier wies ein schmerzhaftes Proktum auf (Hund 12). Die Auskultation des Herzens war bei allen Hunden ohne besonderen Befund. Die Auskultation der Lunge ergab bei zwei Hunden ein verschärftes Atemgeräusch (Hund 12, 13), ein Hund davon zeigte Polypnoe (Hund 12), ein Hund wies eine hechelnde Atmung auf (Hund 28). Ansonsten ergab die Auskultation der Lunge keinen pathologischen Befund. Der rechte Gehörgang eines Hundes war geringgradig gerötet (Hund 5), bei einem anderen Hund waren beide Gehörgänge geringgradig gerötet, in der Tiefe stark verschmutzt und das Trommelfell war beidseits nicht einsehbar (Hund 21). Die Haut zweier Hunde war schuppig (Hund 13, 28) und ein Hund zeigte abheilende Läsionen an den Lefzen (Hund 22). Bei drei Hunden wurde die Allgemeinuntersuchung nicht dokumentiert (Hund 4, 25, 26).

Ergebnisse der klinischen Allgemeinuntersuchung 14 Tage nach Beginn der Intervention

14 Tage nach Beginn der Intervention wiesen alle Hunde ein gutes Allgemeinbefinden auf (Hund 1). Die Rektaltemperatur der Tiere lag zwischen 38,0 und 39,0 °C, nur bei einem Tier lag sie bei 39,2 °C (Hund 16), bei einem anderen bei 37,6 °C (Hund 29). Drei Hunde wiesen ein angespanntes, nicht druckdolentes Abdomen auf (Hund 1, 8 und 15). Der rechte Gehörgang zweier Hunde war (weiterhin) geringgradig gerötet (Hund 5, 18). Eines dieser Tiere zeigte zusätzlich an den Innenschenkeln gerötete Hautareale mit wenigen Pusteln (Hund 18), ein anderes Tier hatte eine neue Läsion an der Lefze, die älteren Läsionen befanden sich weiterhin in Abheilung (Hund 22). Bei neun Hunden wurde die Allgemeinuntersuchung an diesem Untersuchungstag nicht dokumentiert (Hund 9, 10, 11, 12, 13, 25, 26, 27 und 28). Die restliche Allgemeinuntersuchung ergab keine besonderen Befunde.

Ergebnisse der klinischen Allgemeinuntersuchung 30 Tage nach Beginn der Intervention

An Tag 30 der Studie wurden folgende besonderen Befunde erhoben: Ein Hund war am Untersuchungstag im Allgemeinbefinden reduziert, wirkte müde und kraftlos, hechelte viel und zeigte eine sehr trockene Haut (Hund 3). Ein anderes Tier wies eine Rektaltemperatur von 37,9 °C auf (Hund 2). Bei einem Hund der Plazebogruppe zeigte sich ein schuppiges Haarkleid und einen geringgradig geröteten linken Gehörgang (Hund 1). Fünf Hunde hatten ein angespanntes, nicht druckdolentes Abdomen (Hund 7, 14, 15, 21, 30). Ein anderes Tier wies einen auf der linken Seite vergrößerten *Ln. mandibularis* auf (Hund 22). Bei einem Hund war der rechte Gehörgang gerötet, er hatte gerötete und geringgradig geschwollene Haut zwischen den mittleren Zehen der rechten Pfote, geringgradig gerötete Haut unter der rechten Achsel und ein angespanntes, aber nicht druckdolentes Abdomen (Hund 30). Die klinische

Allgemeinuntersuchung zu diesem Zeitpunkt der Intervention wurde bei 10 Hunden nicht dokumentiert (Hund 4, 9, 10, 11, 12, 13, 25, 26, 27, 28).

Ergebnisse der klinischen Allgemeinuntersuchung 60 Tage nach Beginn der Intervention

An diesem Untersuchungstag zeigte ein Tier ein angespanntes Abdomen bei aufgekrümmtem Rücken (Hund 2). Ein Hund hatte eine geringgradig erhöhte Rektaltemperatur von 39,2 °C (Hund 5), einer eine erniedrigte Rektaltemperatur von 37,4 °C (Hund 2). Ein Tier wies eine hechelnde Atmung auf (Hund 8), fünf weitere ein mittelgradig angespanntes, nicht druckdolentes Abdomen (Hund 14, 19, 20, 29, 30)). Bei einem davon fiel nun erstmalig ein Herzgeräusch in der Stärke II/VI auf (Hund 29), bei einem anderen Hund war das Abdomen prall (Hund 30). Blassrosafarbene Schleimhäute traten bei zwei Tieren auf (Hund 16, 18). Eines davon zeigte außerdem eine Alopezie medial am rechten Metatarsus mit Erythem (Hund 18). Darüber hinaus wurden keine besonderen Befunde erhoben. An diesem Untersuchungstag wurde die Untersuchung bei 13 Tieren nicht dokumentiert (Hund 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 21, 25, 26, 27, 28).

Ergebnisse der klinischen Allgemeinuntersuchung zum Abschluss der Intervention

Zum Abschluss der Intervention ergab die klinische Allgemeinuntersuchung bei einem Hund ein angespanntes Abdomen und eine verringerte Rektaltemperatur von 37,2 °C (Hund 2). Drei Tiere wiesen ein angespanntes, nicht druckdolentes Abdomen auf (Hund 6, 15, 21). Die Haut eines Hundes war ggr. gerötet, das Abdomen prall und mittelgradig angespannt (Hund 15). Ein Patient hatte eine leicht erhöhte Rektaltemperatur von 39,2 °C (Hund 17), ein anderer weiterhin einen vergrößerten *Ln. mandibularis* auf der linken Seite (Hund 24). Ein Tier der Probiotikagruppe hatte eine Alopezie medial am rechten Metatarsus, doch die Haut war reizlos (Hund 18). Das Herzgeräusch eines Hundes war immer noch vorhanden. Außerdem hatte er eine Rektaltemperatur von 37,9 °C (Hund 29). An diesem Untersuchungstag wurden die Befunde von 11 Tieren nicht dokumentiert (Hund 4, 9, 10, 11, 12, 13, 25, 26, 27, 28, 30).

4.4 In den Tagebüchern erhobene Daten

Die Tagebücher wurden von allen Besitzern ausgefüllt, ein Tagebuch konnte jedoch nach Studienabschluss nicht abgegeben werden (Hund 30, verloren). Zur Auswertung der Daten aus den Tagebüchern wurde die Studie in vier Perioden unterteilt: Periode 1 (Tag 1-14), Periode 2 (Tage 15-30), Periode 3 (Tag 31-60) und Periode 4 (Tag 61-90).

4.4.1 Aktivität

Die Aktivität der Hunde erwies sich im Gruppenvergleich in Periode 1 in der Plazebogruppe als tendenziell geringer reduziert ($p=0,054$), in Periode 3 jedoch in der Plazebogruppe als signifikant stärker reduziert ($p=0,007$). In den Perioden 2 und 4 lagen keine Gruppenunterschiede vor. In der Plazebogruppe konnte keine signifikante Besserung der Aktivität im Vergleich der Werte von Beginn und Abschluss der Studie verzeichnet werden, während das in der Probiotikagruppe der Fall war ($p=0,002$). Die Häufigkeit der verschiedenen Ausprägungen dieses Parameters im Studienverlauf und Gruppenvergleich findet sich in Tabelle 13.

Tab. 13: Häufigkeit [%] der möglichen Ausprägungen des Merkmals „Aktivität“ im Studienverlauf und Gruppenvergleich

Periode	Aktivität	Plazebo [%]	Probiotikum [%]
1 ^a	normal	81,3 (n = 182) ^b	78,1 (n = 178)
	ggr. reduziert	8,5 (n = 19)	5,3 (n = 12)
	mgr. reduziert	4,5 (n = 10)	11,8 (n = 27)
	hgr. reduziert	0,9 (n = 2)	3,1 (n = 7)
2	normal	78,1 (n = 200)	78,9 (n = 202)
	ggr. reduziert	12,9 (n = 33)	12,5 (n = 32)
	mgr. reduziert	7,0 (n = 18)	5,5 (n = 14)
	hgr. reduziert	0,4 (n = 1)	0,0 (n = 0)
3	normal	78,1 (n = 375)	84,8 (n = 407)
	ggr. reduziert	15,4 (n = 74)	8,3 (n = 40)
	mgr. reduziert	3,1 (n = 15)	3,1 (n = 15)
	hgr. reduziert	0,2 (n = 1)	0,6 (n = 3)
4	normal	75,8 (n = 364)	77,3 (n = 371)
	ggr. reduziert	14,2 (n = 68)	7,1 (n = 34)
	mgr. reduziert	1,0 (n = 5)	4,0 (n = 19)
	hgr. reduziert	0,2 (n = 1)	0,0 (n = 0)

^aPeriode 1: Untersuchungstage 1-14, Periode 2: Untersuchungstage 15-30, Periode 3: Untersuchungstage 31-60, Periode 4: Untersuchungstage 61-90; ^bdie n-Zahlen geben die absolute Häufigkeit der Ausprägung des Merkmals „Aktivität“ in der jeweiligen Periode und Gruppe an

4.4.2 Appetit

Der Appetit der Tiere erwies sich im Gruppenvergleich während der gesamten Studie als nicht signifikant unterschiedlich. In Periode 1 zeigten die Hunde der Probiotikagruppe im Gruppenvergleich einen tendenziell stärker reduzierten Appetit ($p=0,071$). Im Vergleich der Ausgangs- mit den Endwerten konnte festgestellt werden, dass sich der Appetit der Hunde der Plazebogruppe tendenziell besserte ($p = 0,075$), der Appetit der Hunde der Probiotikagruppe jedoch nicht. Einen Gruppenvergleich der Medianwerte des Merkmals „Appetit“ zeigt Tabelle 14.

Tab. 14: Gruppenvergleich der Medianwerte des Merkmals „Appetit“ im Studienverlauf Gruppenvergleich

	Periode			
	1 ^a	2	3	4
Probiotikum (n = 16)^b	0 (0-3) ^c	0 (0-2)	0 (0-3)	0 (0-3)
Plazebo (n = 16)^b	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)
p-Wert^d	0,071	0,76	0,738	0,25

^aPeriode 1: Untersuchungstage 1-14, Periode 2: Untersuchungstage 15-30, Periode 3: Untersuchungstage 31-60, Periode 4: Untersuchungstage 61-90; ^bAnzahl an Tieren, deren Daten in der jeweiligen Gruppe in die Berechnung eingingen; ^cMedian (Minimum-Maximum); 0= normaler Appetit, 1= ggr. reduzierter Appetit, 2= mgr. reduzierter Appetit, 3= hgr. reduzierter Appetit; ^dGruppenunterschied ermittelt mithilfe des Wilcoxon-Tests

4.4.3 Erbrechen

Auch für das Auftreten von Erbrechen zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede (siehe Tabelle 15).

Tab. 15: Häufigkeit [%] der möglichen Ausprägungen des Merkmals „Erbrechen“ im Gruppenvergleich und Studienverlauf

Periode	Erbrechen	Plazebo [%]	Probiotikum [%]
1 ^a	kein Erbrechen	88,8 (n = 199) ^b	89,5 (n = 204)
	1x/Tag	4,9 (n = 11)	4,8 (n = 11)
	2x/Tag	0,4 (n = 1)	0,0 (n = 0)
	3x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	4x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	5x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	>5x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
2	kein Erbrechen	91,4 (n = 234)	89,8 (n = 230)
	1x/Tag	4,3 (n = 11)	3,1 (n = 8)
	2x/Tag	0,0 (n = 0)	0,8 (n = 2)
	3x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	4x/Tag	0,8 (n = 2)	0,0 (n = 0)
	5x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	>5x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
3	kein Erbrechen	90,4 (n = 434)	90,2 (n = 433)
	1x/Tag	4,2 (n = 20)	2,9 (n = 14)
	2x/Tag	0,8 (n = 4)	1,3 (n = 6)
	3x/Tag	0,8 (n = 4)	0,6 (n = 3)
	4x/Tag	0,2 (n = 1)	0,2 (n = 1)
	5x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	>5x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
4	kein Erbrechen	86,9 (n = 417)	84,0 (n = 403)
	1x/Tag	2,3 (n = 11)	2,9 (n = 14)
	2x/Tag	0,2 (n = 1)	0,2 (n = 1)
	3x/Tag	0,6 (n = 3)	0,2 (n = 1)
	4x/Tag	0,4 (n = 2)	0,0 (n = 0)
	5x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	>5x/Tag	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)

^aPeriode 1: Untersuchungstage 1-14, Periode 2: Untersuchungstage 15-30, Periode 3: Untersuchungstage 31-60, Periode 4: Untersuchungstage 61-90; ^bdie n-Zahlen geben die absolute Häufigkeit der Ausprägung des Merkmals „Erbrechen“ in der jeweiligen Periode und Gruppe an

4.4.4 Konsistenz der Fäzes

Betrachtet man die Konsistenz der Fäzes zusammenfassend im Zeitverlauf, ergeben sich signifikante Unterschiede im Gruppenvergleich über die Dauer der Studie (Periode 1, 2 und 4: $p < 0,001$, Periode 3: $p = 0,016$). In den Perioden 1, 2 und 4 zeigte die Placebogruppe die weniger stark veränderten Konsistenzen der Fäzes, in Periode 3 hingegen die Probiotikagruppe. Der Vergleich der Ausgangs- und Endwerte ergab, dass sich die Konsistenz der Fäzes innerhalb beider Gruppen signifikant verbesserte (siehe Tabelle 16).

Tab. 16: Prozentualer Anteil der verschiedenen Konsistenzen der Fäzes im Gruppenvergleich und Studienverlauf

Periode	Kotkonsistenz	Placebo [%]	Probiotikum [%]
1 ^a	normal	81,5 (n = 435) ^b	65,8 (n = 333)
	normal bis weich	0,2 (n = 1)	0,0 (n = 0)
	weich	14,8 (n = 79)	15,8 (n = 80)
	weich bis sehr weich	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	sehr weich	2,4 (n = 13)	15,4 (n = 78)
	sehr weich bis wässrig	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	wässrig	1,1 (n = 6)	3,0 (n = 15)
2	normal	83,8 (n = 570)	76,7 (n = 447)
	normal bis weich	0,7 (n = 5)	0,0 (n = 0)
	weich	11,3 (n = 77)	14,1 (n = 82)
	weich bis sehr weich	0,0 (n = 0)	0,2 (n = 1)
	sehr weich	3,5 (n = 0)	6,7 (n = 39)
	sehr weich bis wässrig	0,1 (n = 1)	0,0 (n = 0)
	wässrig	0,4 (n = 3)	2,4 (n = 14)
3	normal	82,7 (n = 1003)	86,6 (n = 930)
	normal bis weich	3,6 (n = 44)	0,0 (n = 0)
	weich	8,6 (n = 104)	9,6 (n = 103)
	weich bis sehr weich	0,0 (n = 0)	1,2 (n = 13)
	sehr weich	3,8 (n = 46)	2,0 (n = 22)
	sehr weich bis wässrig	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	wässrig	1,3 (n = 16)	0,6 (n = 6)
4	normal	83,3 (n = 963)	78,5 (n = 790)
	normal bis weich	3,4 (n = 37)	0,0 (n = 0)
	weich	6,3 (n = 69)	19,0 (n = 191)
	weich bis sehr weich	0,1 (n = 1)	0,0 (n = 0)
	sehr weich	0,9 (n = 10)	1,9 (n = 19)
	sehr weich bis wässrig	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	wässrig	0,9 (n = 10)	0,6 (n = 6)

^aPeriode 1: Untersuchungstage 1-14, Periode 2: Untersuchungstage 15-30, Periode 3: Untersuchungstage 31-60, Periode 4: Untersuchungstage 61-90; ^bdie n-Zahlen geben die absolute Häufigkeit der Ausprägung des Merkmals „Kotkonsistenz“ in der jeweiligen Periode und Gruppe an

4.4.5 Hämatochezie

Eine Hämatochezie trat im gesamten Studienverlauf eher selten auf. Die Hunde, die schon vor Beginn der Studie dieses Symptom gezeigt hatten, waren fast ausschließlich in der

Probiotikagruppe. So zeigten die Hunde der Probiotikagruppe im Gruppenvergleich in den Perioden 1, 2 und 3 statistisch häufiger eine Hämatochezie als die Hunde der Plazebogruppe (Periode 1: $p=0,001$, Periode 2, Periode 3: $p<0,001$). In der Probiotikagruppe kam es im Studienverlauf zu einem statistisch signifikant geringeren Auftreten einer Hämatochezie im Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte ($p < 0,001$), in der Plazebogruppe jedoch nicht (siehe Tabelle 17).

Tab. 17: Häufigkeit [%] des Auftretens einer Hämatochezie in den Gruppen im Studienverlauf

Periode	Hämatochezie	Plazebo [%]	Probiotikum [%]
1 ^a	keine Hämatochezie	94,6 (n = 212) ^b	92,1 (n = 210)
	Hämatochezie	0,4 (n = 1)	6,6 (n = 15)
2	keine Hämatochezie	99,2 (n = 254)	89,8 (n = 230)
	Hämatochezie	0,0 (n = 0)	7,0 (n = 18)
3	keine Hämatochezie	96,9 (n = 465)	95,2 (n = 457)
	Hämatochezie	0,0 (n = 0)	2,7 (n = 13)
4	keine Hämatochezie	92,3 (n = 443)	87,3 (n = 419)
	Hämatochezie	0,0 (n = 0)	0,4 (n = 2)

^aPeriode 1: Untersuchungstage 1-14, Periode 2: Untersuchungstage 15-30, Periode 3: Untersuchungstage 31-60, Periode 4: Untersuchungstage 61-90; ^bdie n-Zahlen geben die absolute Häufigkeit der Ausprägung des Merkmals „Hämatochezie“ in der jeweiligen Periode und Gruppe an; die Addition der Werte ergibt nicht 100 %, weil dieser Parameter nicht immer von den Besitzern dokumentiert wurde

4.4.6 Auftreten von Schleim in den Fäzes

Schleim trat in den Fäzes etwas häufiger auf als frisches Blut. Die Hunde der Plazebogruppe zeigten in Periode 2 tendenziell seltener Schleim im Kot als die Hunde der Probiotikagruppe ($p=0,086$). Ansonsten konnten keine Gruppenunterschiede ermittelt werden. Zudem ergab sich beim Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte innerhalb der Gruppen, dass Schleim im Kot zum Abschluss der Studie in der Plazebogruppe signifikant seltener auftrat als zu Beginn der Studie ($p = 0,033$). In der Probiotikagruppe war dies nicht der Fall (siehe Tabelle 18).

Tab. 18: Häufigkeit [%] des Auftretens von Schleim in den Fäzes in den Gruppen im Studienverlauf

Periode	Schleim	Plazebo [%]	Probiotikum [%]
1 ^a	kein Schleim	92,0 (n = 206) ^b	95,6 (n = 218)
	Schleim	3,1 (n = 7)	3,1 (n = 7)
2	kein Schleim	98,4 (n = 252)	94,1 (n = 241)
	Schleim	0,8 (n = 2)	2,7 (n = 7)
3	kein Schleim	95,2 (n = 457)	95,8 (n = 460)
	Schleim	1,7 (n = 8)	2,1 (n = 10)
4	kein Schleim	91,5 (n = 439)	86,0 (n = 413)
	Schleim	0,8 (n = 4)	1,7 (n = 8)

^aPeriode 1: Untersuchungstage 1-14, Periode 2: Untersuchungstage 15-30, Periode 3: Untersuchungstage 31-60, Periode 4: Untersuchungstage 61-90; ^bdie n-Zahlen geben die absolute Häufigkeit der Ausprägung des Merkmals „Schleim in den Fäzes“ in der jeweiligen Periode und Gruppe an; die Addition der Werte ergibt nicht 100 %, weil dieser Parameter nicht immer von den Besitzern dokumentiert wurde

4.4.7 Kotabsatzfrequenz

Die Hunde der Probiotikagruppe zeigten im Gruppenvergleich in den Perioden 2 und 3 signifikant geringere Kotabsatzfrequenzen als die Hunde der Placebogruppe (Periode 2: $p=0,018$, Periode 3: $p<0,001$). Der Median der Kotabsatzfrequenz der Placebogruppe lag in den Perioden zwei und drei bei 3 mal täglich, der der Probiotikagruppe bei 2 mal täglich. Der Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte innerhalb der Gruppen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 19).

Tab. 19: Häufigkeit [%] der möglichen Kotabsatzfrequenzen der Tiere im Gruppenvergleich und Studienverlauf

Periode	Kotabsatzfrequenz	Placebo [%]	Probiotikum [%]
1 ^a	0	0,9 (n = 2) ^b	0,0 (n = 0)
	1x	12,9 (n = 29)	12,7 (n = 29)
	2x	40,2 (n = 90)	49,6 (n = 113)
	3x	25,9 (n = 58)	25,9 (n = 59)
	4x	9,4 (n = 21)	2,6 (n = 6)
	5x	4,9 (n = 11)	0,4 (n = 1)
	>5x	0,9 (n = 2)	7,5 (n = 17)
2	0	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)
	1x	8,6 (n = 22)	13,3 (n = 34)
	2x	39,5 (n = 101)	44,1 (n = 113)
	3x	35,2 (n = 90)	27,3 (n = 70)
	4x	10,9 (n = 28)	4,7 (n = 12)
	5x	4,3 (n = 11)	0,0 (n = 0)
	>5x	0,8 (n = 2)	7,4 (n = 19)
3	0	0,0 (n = 0)	0,2 (n = 1)
	1x	10,6 (n = 51)	11,7 (n = 56)
	2x	35,0 (n = 168)	49,6 (n = 238)
	3x	35,8 (n = 172)	27,7 (n = 133)
	4x	10,4 (n = 50)	2,3 (n = 11)
	5x	3,3 (n = 16)	0,0 (n = 0)
	>5x	1,7 (n = 8)	6,5 (n = 31)
4	0	0,2 (n = 1)	0,0 (n = 0)
	1x	8,8 (n = 42)	6,7 (n = 32)
	2x	41,5 (n = 199)	46,3 (n = 222)
	3x	33,8 (n = 162)	26,3 (n = 126)
	4x	6,0 (n = 29)	2,5 (n = 12)
	5x	1,7 (n = 8)	0,4 (n = 2)
	>5x	0,4 (n = 2)	5,6 (n = 27)

^aPeriode 1: Untersuchungstage 1-14, Periode 2: Untersuchungstage 15-30, Periode 3: Untersuchungstage 31-60, Periode 4: Untersuchungstage 61-90; ^bdie n-Zahlen geben die absolute Häufigkeit der Ausprägung des Merkmals „Kotabsatzfrequenz“ in der jeweiligen Periode und Gruppe an

4.4.8 Zusammenfassung

Tab. 20: Zusammenfassende Darstellung der signifikanten und tendenziellen Gruppenunterschiede der Tagebuchparameter im Studienverlauf

Periode	Aktivität	Appetit	Erbrechen	Kotkonsistenz	Kotabsatzfrequenz	Hämatochezie	Schleim im Kot
1	(1)	(1)	0	1	0	1	0
2	0	0	0	1	2	1	(1)
3	2	0	0	2	2	1	0
4	0	0	0	1	0	0	0

0: kein signifikanter Gruppenunterschied; 1: Tiere der Plazebogruppe signifikant besser; (1): Tiere der Plazebogruppe tendenziell besser; 2: Tiere der Probiotikagruppe signifikant besser

4.5 Durch die Besitzer beurteilte und objektiv messbare Parameter der Fragebögen

Die Parameter der Fragebögen konnten im Studienverlauf nicht für alle Tiere zu jedem Zeitpunkt erhoben werden. Welche Parameter wie häufig im Gruppenvergleich erhoben wurden, zeigt Tabelle 21.

Tab. 21: Anzahl der Tiere pro Untersuchungstag und Gruppe, bei denen die Parameter der Fragebögen erhoben wurden

Parameter	Untersuchungstag	n Tiere der Placebogruppe	n Tiere der Probiotikagruppe
Körpermasse	0	16	16
	14	16	16
	30	16	16
	60	16	16
	90	16	16
CIBDAI	0	16	16
	14	16	16
	30	16	16
	60	16	16
	90	16	16
Futterakzeptanz	0	13	10
	14	10	10
	30	10	10
	60	10	10
	90	10	10
Krankheitsentwicklung	0	10	13
	14	11	10
	30	10	10
	60	10	10
	90	10	10
Flatulenzen / Borborygmen	0	14	13
	14	11	10
	30	10	10
	60	10	10
	90	10	10
Bauchschmerzen / Unbehagen	0	14	12
	14	11	10
	30	10	10
	60	10	10
	90	10	10
BCS	0	15	14
	14	12	11
	30	11	11
	60	11	10
	90	11	11

CIBDAI = Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index; BCS = Body Condition Score

4.5.1 Körpermasse der Probanden

Die Körpermasse zeigte im Verlauf der Studie keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied. Die Endgewichte der Tiere waren nicht signifikant anders als die Ausgangsgewichte (siehe Abbildung 1).

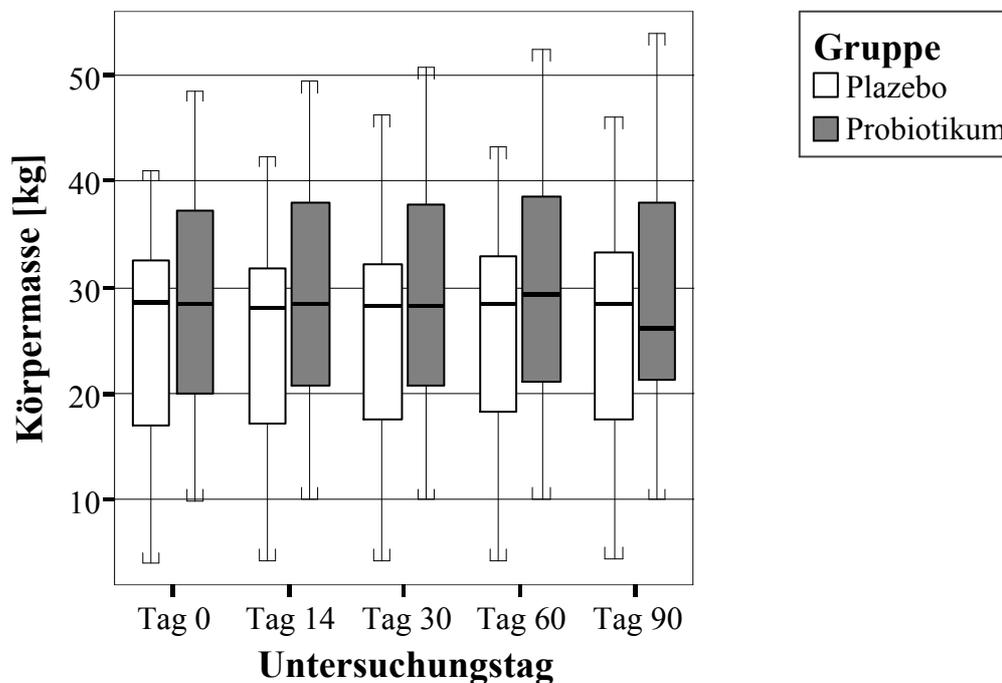


Abb. 1: Körpermasse der Hunde im Gruppenvergleich und Studienverlauf (n.s), dargestellt sind Boxplots

4.5.2 Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI) der Probanden

Die Probiotikagruppe wies zu Beginn der Studie signifikant höhere CIBDAI-Werte auf ($p=0,01$), der Wert glich sich jedoch im Laufe der Zeit an. Die Verringerung des CIBDAI zum Abschluss der Studie im Vergleich zu den Ausgangswerten zeigte sich in beiden Gruppen signifikant ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 2). Einen Überblick über den CIBDAI im Studienverlauf für das Einzeltier ermöglichen die Tabellen 55 und 56 im Anhang

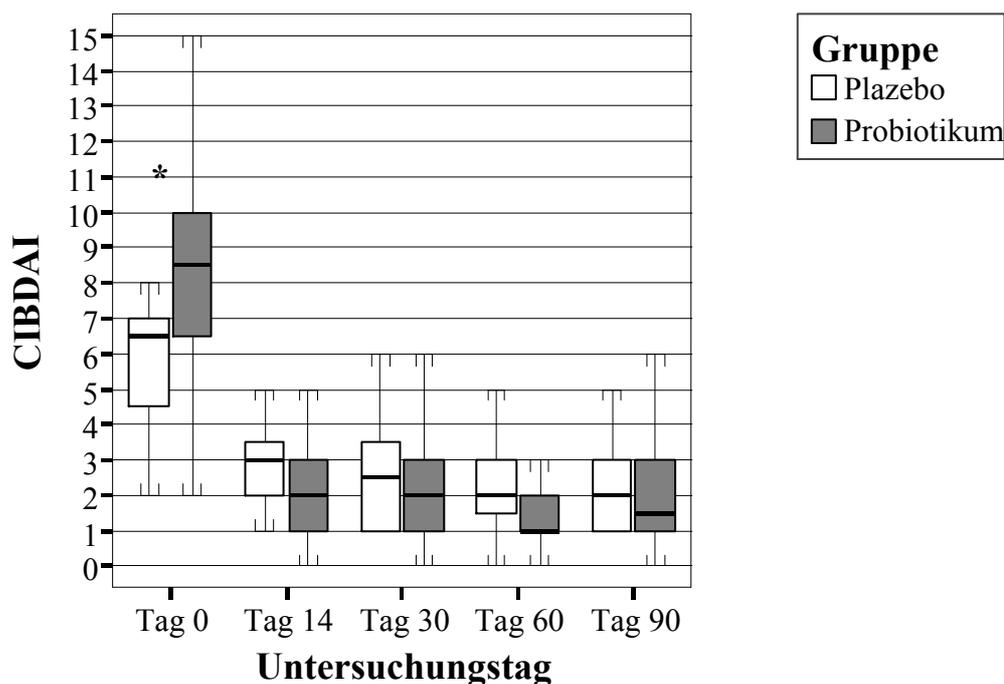


Abb. 2: Darstellung des CIBDAI der Hunde im Gruppenvergleich an den Kontrolltagen, Darstellung als Boxplots

Das Symbol * zeigt signifikante Gruppenunterschiede ($p < 0,05$) an; 0 bis 3 Punkte: ein klinisch nicht signifikanter Fall, 4 bis 5 Punkte: ein milder Grad an klinischen Symptomen, 6 bis 8 Punkte: ein mittlerer Grad an klinischen Symptomen, > 9 Punkte: ein schwerer Grad an klinischen Symptomen (Jergens et al. 2003)

4.5.3 Futterakzeptanz bei den Probanden

Die Akzeptanz des Versuchsfutters zeigte sich im Gruppenvergleich an Tag 0 und 90 der Studie in der Probiotikagruppe als tendenziell besser, an Tag 60 der Studie als signifikant besser (Tag 0: $p = 0,056$; Tag 60: $p = 0,038$; Tag 90: $p = 0,095$). Während die Futterakzeptanz bis zum Tag 60 der Studie in der Plazebogruppe immer schlechter wurde und sich am Tag 90 auch nur um einen halben Punkt besserte, blieb sie in der Probiotikagruppe im gesamten Studienverlauf gleich (siehe Abbildung 3).

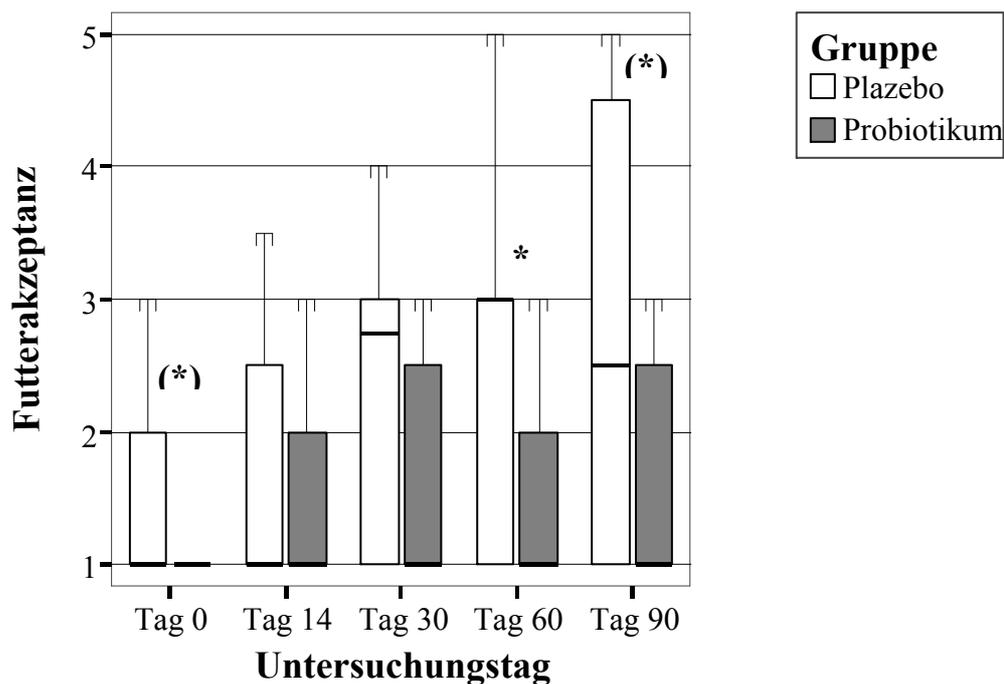


Abb. 3: Darstellung der Futterakzeptanz der Hunde im Gruppenvergleich und Studienverlauf, Darstellung als Boxplots

Das Symbol * zeigt signifikante Gruppenunterschiede ($p < 0,05$) an, das Symbol (*) tendenzielle Gruppenunterschiede ($p < 0,1$); 1= ausgezeichnet, 2= gut, 3= reserviert, 4= mäßig, 5= Verweigerung

4.5.4 Einschätzung der Krankheitsentwicklung im Laufe der Studie

Die Einschätzung der Entwicklung der Erkrankung durch den Besitzer erwies sich zu Beginn der Studie in der Probiotikagruppe als signifikant schlechter als in der Plazebogruppe ($p = 0,001$). Die Besitzer der Tiere der Probiotikagruppe beschrieben den Krankheitsverlauf im Median vor Beginn der Studie als immer schlimmer werdend, während die Besitzer der Hunde aus der Plazebogruppe den Krankheitsverlauf im Median eher als gleich bleibend beschrieben. Ansonsten empfanden die Besitzer der Hunde der Probiotikagruppe im späteren Verlauf der Studie die Hunde als symptomlos, während die Besitzer der Hunde aus der Plazebogruppe die Tiere zwischen symptomlos und unverändert einstufen. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Die Besitzer der Hunde der Probiotikagruppe schätzen am Ende der Studie ihren Hund statistisch signifikant als besser ein als zu Beginn der Studie ($p = 0,012$), die Besitzer der Hunde der Plazebogruppe tendenziell als besser ($p = 0,052$) (siehe Abbildung 4).

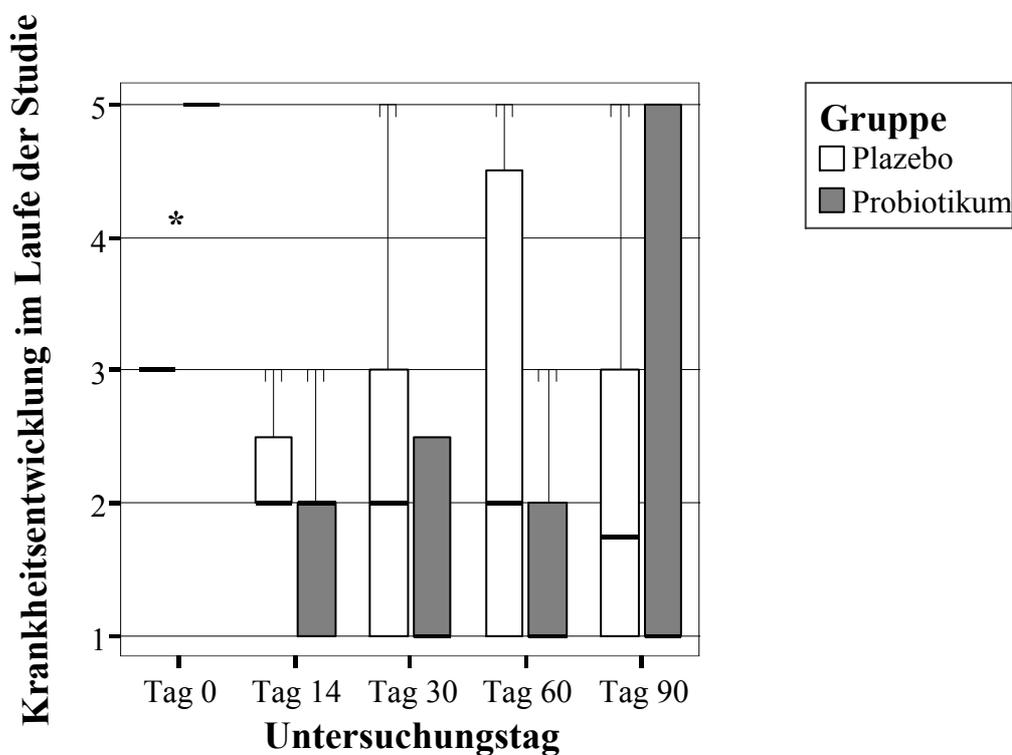


Abb. 4: Darstellung der Einschätzung der Entwicklung der Erkrankung der Hunde durch den Besitzer im Gruppenvergleich und Studienverlauf, Darstellung als Boxplots
Das Symbol * zeigt signifikante Gruppenunterschiede ($p < 0,05$) an; 1= symptomlos, 2= besser werdend, 3= unverändert, 4= schlechter werdend, 5= schlechter

4.5.5 Flatulenz

Das Auftreten von Flatulenzen zeigte im gesamten Verlauf der Studie keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied. Der Median der Placebogruppe lag vor Beginn der Interventionen bei 1 (= fast nie), ansonsten lag der Median stets bei 0 (keine Flatulenzen). Interessanterweise berichteten die Besitzer der Hunde der Probiotikagruppe von keinen Flatulenzen in der Zeit vom jeweils vorangegangenen Kontrolltermin zum Tag 14, 30 und 60. In der Zeit zwischen Tag 60 und Tag 90 traten jedoch auch in dieser Gruppe wieder Flatulenzen auf. Flatulenzen traten in beiden Gruppen zum Abschluss der Studie nicht signifikant seltener auf als zu Beginn der Studie (siehe Abbildung 5).

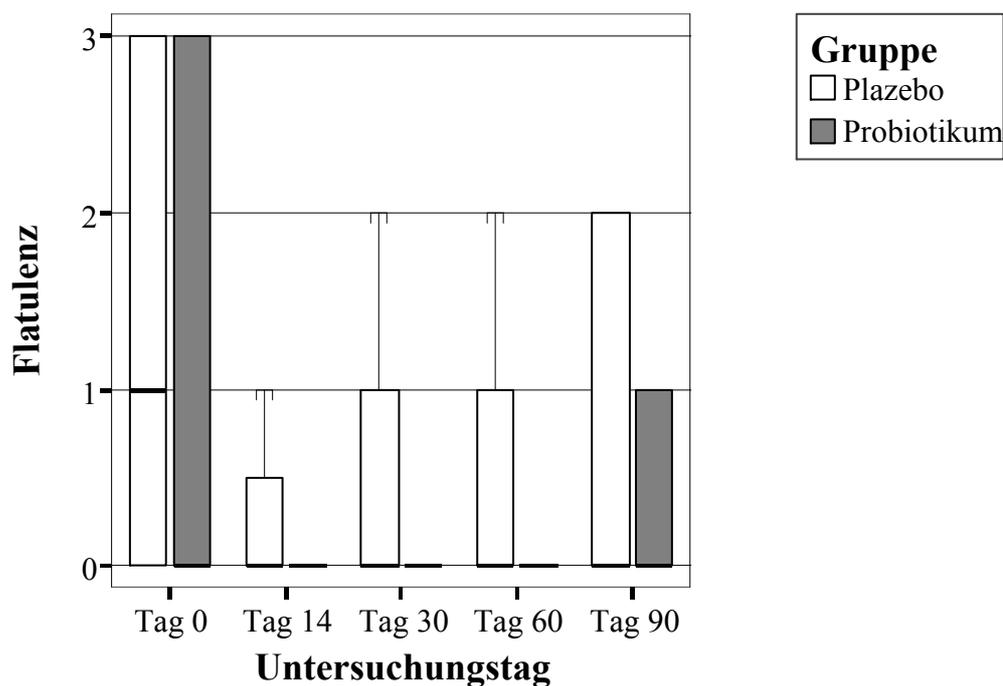


Abb. 5: Darstellung des Auftretens von Flatulenzen seit der letzten Kontrolle bei den Hunden im Gruppenvergleich und Zeitverlauf (n.s.), Darstellung als Boxplots
0= keine Flatulenzen, 1= fast nie, 2= manchmal, 3= regelmäßig

4.5.6 Borborygmus

Das Auftreten von Borborygmen zeigte im gesamten Verlauf der Studie keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied. Der Median lag in beiden Gruppen vor Beginn der Interventionen bei 2 (= manchmal), im Rest der Studie jedoch bei 0 (= keine Borborygmen). Wie jedoch aus der untenstehenden Grafik ersichtlich ist, zeigten die Hunde der Probiotikagruppe numerisch früher ein Absinken der Häufigkeit von Borborygmen als die Hunde der Plazebogruppe. Es war jedoch weder der Unterschied zwischen den Gruppen noch der Vergleich der Ausgangs- und Endwerte statistisch abzusichern (siehe Abbildung 6).

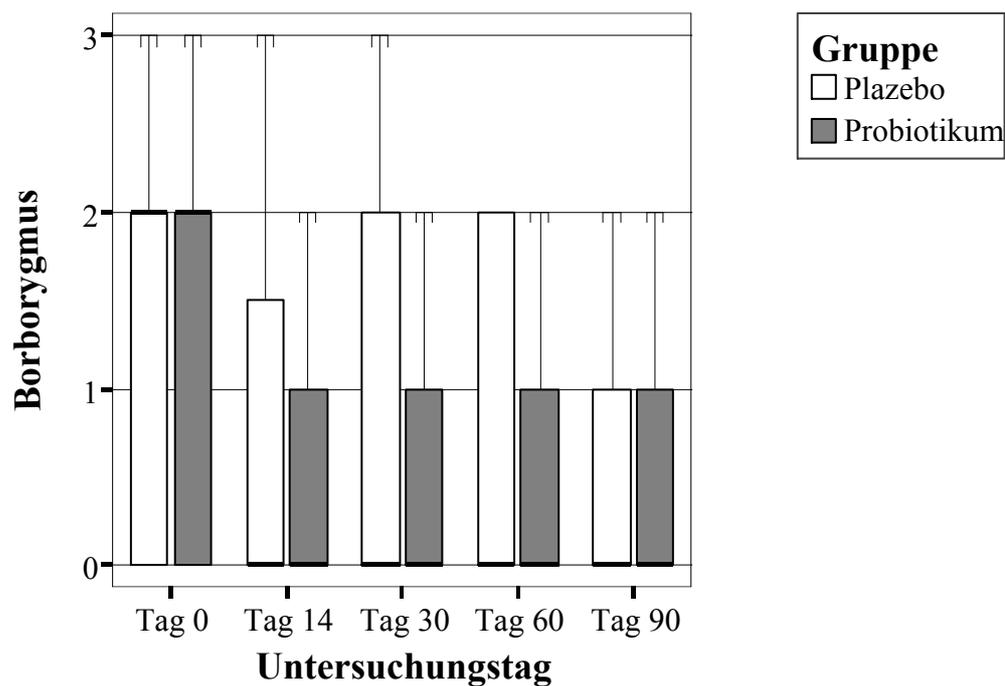


Abb. 6: Darstellung der Häufigkeit von Borborygmen bei den Hunden im Gruppenvergleich und Studienverlauf (n.s.), Darstellung als Boxplots
0= keine Borborygmen, 1= fast nie, 2= manchmal, 3= regelmäßig

4.5.7 Bauchschmerzen

Das Vorkommen von Bauchschmerzen wies während der gesamten Studie keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied auf. An Untersuchungstag 30 zeigte die Probiotikagruppe tendenziell weniger Bauchschmerzen als die Plazebogruppe ($p = 0,068$). Zum Abschluss der Studie zeigten die Hunde der Plazebogruppe tendenziell seltener Bauchschmerzen als zu Beginn der Studie ($p = 0,084$), in der Probiotikagruppe war dies nicht der Fall (siehe Tabelle 22).

Tab. 22: Häufigkeit des Auftretens von Bauchschmerzen bei den Probanden [%] im Gruppenvergleich und Studienverlauf (n.s.)

Untersuchungstag	Bauchschmerzen	Plazebo [%]	Probiotikum [%]
0	nie	50,0	66,7
	seltener	0,0	8,3
	manchmal	21,4	16,7
	regelmäßig	28,6	8,3
		n = 14^a	n = 12
14	nie	81,8	100,0
	seltener	9,1	0,0
	manchmal	9,1	0,0
	regelmäßig	0,0	0,0
		n = 11	n = 10
30	nie	70,0	100,0
	seltener	10,0	0,0
	manchmal	10,0	0,0
	regelmäßig	10,0	0,0
		n = 10	n = 10
60	nie	80,0	90,0
	seltener	10,0	10,0
	manchmal	10,0	0,0
	regelmäßig	0,0	0,0
		n = 10	n = 10
90	nie	90,0	90,0
	seltener	10,0	10,0
	manchmal	0,0	0,0
	regelmäßig	0,0	0,0
		n = 10	n = 10

^adie n-Zahlen geben die Anzahl an Tieren an, bei denen das betreffende Merkmal dokumentiert wurde

4.5.8 Unbehagen

Es zeigte sich im Laufe der Studie kein statistisch signifikanter Gruppenunterschied im Auftreten von Unbehagen. Der Median lag nahezu immer bei 0 (= kein Unbehagen). Nur vor Beginn der Interventionen liegt der Median der Placebogruppe bei 1,5 (= fast nie bis manchmal). Die Tabelle (Tabelle 23) zeigt, dass schwerere Ausprägungen an den Kontrolltagen 30 und 60 in der Placebogruppe häufiger auftraten als in der Probiotikagruppe. Der Vergleich der Ausgangs- und Endwerte innerhalb der Gruppen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Tab. 23: Häufigkeit des Auftretens von Unbehagen bei den Probanden [%] im Gruppenvergleich und Studienverlauf (n.s.)

Untersuchungstag	Unbehagen	Placebo [%]	Probiotikum [%]
0	nie	42,9	58,3
	selten	7,1	8,3
	manchmal	42,9	16,7
	regelmäßig	7,1	16,7
		n = 14^a	n = 12
14	nie	54,5	80
	selten	27,3	10
	manchmal	9,1	0
	regelmäßig	9,1	10
		n = 11	n = 10
30	nie	60	80
	selten	10	20
	manchmal	20	0
	regelmäßig	10	0
		n = 10	n = 10
60	nie	70	90
	selten	20	10
	manchmal	0	0
	regelmäßig	10	0
		n = 10	n = 10
90	nie	80	80
	selten	0	10
	manchmal	10	10
	regelmäßig	10	0
		n = 10	n = 10

^adie n-Zahlen geben die Anzahl an Tieren an, bei denen das betreffende Merkmal dokumentiert wurde

4.5.9 Body Condition Score (BCS)

Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede des BCS im Verlauf der Studie. Auch die Änderung des BCS von einem Untersuchungstag zum nächsten zeigte sich nicht signifikant unterschiedlich im Gruppenvergleich. Der BCS ergab zum Abschluss der Studie keine signifikant anderen Werte als zu Beginn der Studie (siehe Abbildung 7).

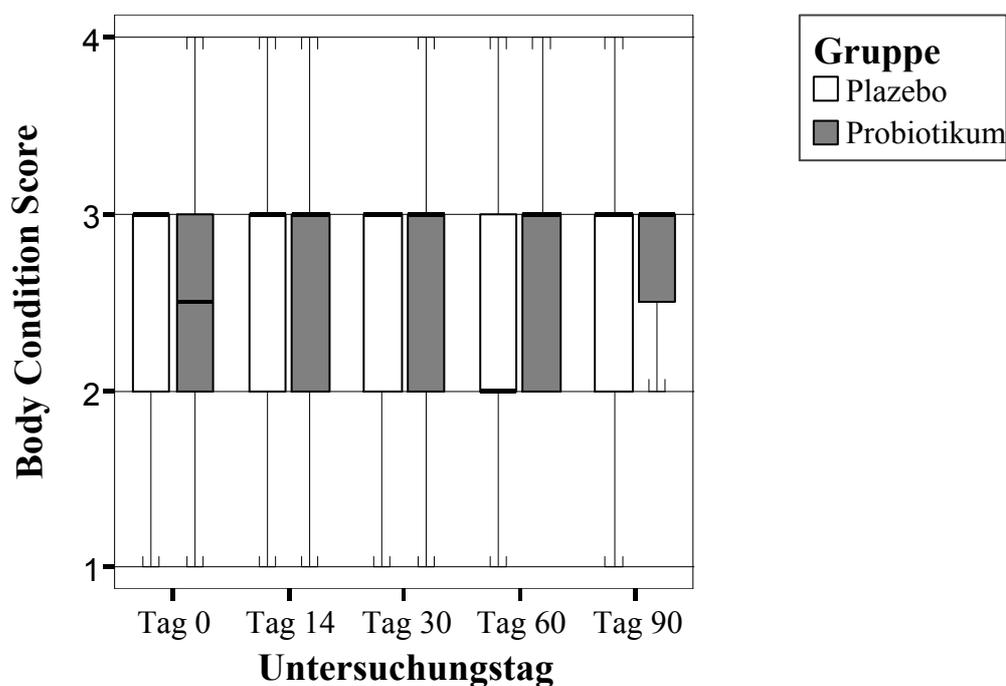


Abb. 7: Darstellung des Body Condition Scores (BCS) der Hunde im Gruppenvergleich und Studienverlauf (n.s.), Darstellung als Boxplots

Tab. 24: Zusammenfassende Darstellung der Mediane der Parameter der Fragebögen vor Beginn und zum Abschluss der Intervention

Parameter	Gruppe	n	Untersuchungstag 0	Untersuchungstag 90
Körpermasse [kg]	Plazebo	n ₀ = 16; n ₉₀ = 16	28,7	28,6
	Probiotikum	n ₀ = 16; n ₉₀ = 16	28,5	26,3
CIBDAI	Plazebo	n ₀ = 16; n ₉₀ = 16	6,5	2,0
	Probiotikum	n ₀ = 16; n ₉₀ = 16	8,5	1,5
Futterakzeptanz	Plazebo	n ₀ = 13; n ₉₀ = 10	1,0	2,5
	Probiotikum	n ₀ = 10; n ₉₀ = 10	1,0	1,0
Krankheitsentwicklung	Plazebo	n ₀ = 10; n ₉₀ = 10	3,0	1,8
	Probiotikum	n ₀ = 13; n ₉₀ = 10	5,0	1,0
Flatulenz	Plazebo	n ₀ = 14; n ₉₀ = 10	1,0	0,0
	Probiotikum	n ₀ = 13; n ₉₀ = 10	0,0	0,0
Borborygmus	Plazebo	n ₀ = 14; n ₉₀ = 10	2,0	0,0
	Probiotikum	n ₀ = 13; n ₉₀ = 10	2,0	0,0
Bauchschmerzen	Plazebo	n ₀ = 14; n ₉₀ = 10	1,0	0,0
	Probiotikum	n ₀ = 12; n ₉₀ = 10	0,0	0,0
Unbehagen	Plazebo	n ₀ = 14; n ₉₀ = 10	1,5	0,0
	Probiotikum	n ₀ = 12; n ₉₀ = 10	0,0	0,0
BCS	Plazebo	n ₀ = 15; n ₉₀ = 11	3,0	3,0
	Probiotikum	n ₀ = 14; n ₉₀ = 11	2,5	3,0

CIBDAI (Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index): 0 bis 3 Punkte = ein klinisch nicht signifikanter Fall, 4 bis 5 Punkte = ein milder Grad an klinischen Symptomen, 6 bis 8 Punkte = ein mittlerer Grad an klinischen Symptomen, > 9 Punkte = ein schwerer Grad an klinischen Symptomen (Jergens et al. 2003); **Futterakzeptanz**: 1 = ausgezeichnet, 2,5 = gut bis reserviert; **Krankheitsentwicklung**: 1 = symptomlos, 1,8 = symptomlos bis besser werdend, 3 = unverändert, 5 = schlechter; **Flatulenz**, **Borborygmus**, **Bauchschmerzen**, **Unbehagen**: 0 = nicht vorhanden, 1 = fast nie, 1,5 = fast nie bis manchmal, 2 = manchmal; **BCS** (Body Condition Score): 2,5 = untergewichtig bis ideal, 3 = ideal

4.6 Ergebnisse der Blutuntersuchungen im Studienverlauf und Gruppenvergleich

4.6.1 Hämatologische Untersuchung

Die Anzahl an **Leukozyten** im Blut zeigte weder zu Beginn noch zum Abschluss der Studie einen Gruppenunterschied. Es kam ebenfalls in keiner der beiden Gruppen zu einer Änderung des Wertes im Vergleich von Ausgangs- und Abschlusswert.

Der **Hämatokrit** zeigte zu Beginn der Studie keinen Gruppenunterschied. Zum Abschluss der Studie zeigten die Hunde der Plazebogruppe tendenziell niedrigere Werte als die Hunde der Probiotikagruppe ($p=0,074$). Der Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte innerhalb der jeweiligen Gruppe ergab keinen signifikanten Unterschied.

Die Anzahl an **Thrombozyten** im Blut wies zu keinem Zeitpunkt einen Gruppenunterschied auf, doch zum Abschluss der Studie zeigten die Hunde der Probiotikagruppe tendenziell niedrigere Thrombozytenzahlen als die Hunde der Plazebogruppe ($p=0,074$). Die Endwerte waren innerhalb der Gruppen nicht signifikant anders als die Ausgangswerte.

In Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Blutuntersuchungen für Leukozyten, den Hämatokrit und Thrombozyten zu Studienbeginn und –abschluss im Gruppenvergleich dargestellt, die Werte für das Einzeltier im Studienverlauf finden sich in den Tabellen 46-49 im Anhang.

Tab. 25: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung des Blutes der Hunde zu Beginn und Abschluss der Studie im Gruppenvergleich

Untersuchungstag Gruppe	0		90	
	Probiotikum MW ± Stabw	Plazebo MW ± Stabw	Probiotikum MW ± Stabw	Plazebo MW ± Stabw
Leukozyten [G/l]	9,56 ± 3,23	10,3 ± 3,8	9,8 ± 3,1	9,8 ± 2,8
Hämatokrit [l/l]	0,5 ± 0,04	0,5 ± 0,06	0,5 ± 0,04	0,4 ± 0,05
Thrombozyten [G/l]	262,9 ± 84,8	340,6 ± 150,7	235,4 ± 62,2	304,7 ± 108,6
	n = 16 ^a	n = 16	n = 15	n = 15

MW= Mittelwert, Stabw= Standardabweichung; ^adie n-Zahlen geben die Anzahl an Tieren an, bei denen das betreffende Merkmal dokumentiert wurde

4.6.2 Differentialblutbild

Die Anzahl an **neutrophilen** [G/l] und **eosinophilen Granulozyten** [G/l], an **Lymphozyten** [G/l] und **Monozyten** [G/l] im Differentialblutbild zeigte weder vor Beginn der Interventionen noch zum Abschluss einen statistisch signifikanten Gruppenunterschied. Beim Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte innerhalb der Gruppen zeigte sich in der Plazebogruppe der Abschlusswert der absoluten Anzahl an Lymphozyten als signifikant niedriger als der Ausgangswert ($p = 0,034$). Alle anderen Werte und auch die Anzahl an Lymphozyten der Plazebogruppe zeigten keine signifikanten Änderungen.

Die Ergebnisse der Auswertung der Differentialblutbilder zu Studienbeginn und –abschluss im Gruppenvergleich stellt Tabelle 26 dar, die Werte für das Einzeltier finden sich in den Tabellen 46-49 im Anhang.

Tab. 26: Ergebnisse des Differentialblutbildes der Hunde zu Beginn und Abschluss der Studie im Gruppenvergleich

Untersuchungstag Gruppe	0		90	
	Probiotikum MW ± Stabw	Plazebo MW ± Stabw	Probiotikum MW ± Stabw	Plazebo MW ± Stabw
Neutrophile Granulozyten [G/l]	6,6 ± 2,8	7,2 ± 3,4	6,2 ± 2,0	6,0 ± 2,0
	n ^a = 10	n = 10	n = 9	n = 11
Eosinophile Granulozyten [G/l]	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,5	0,6 ± 0,4	0,4 ± 0,3
Lymphozyten [G/l]	2,2 ± 1,1	2,9 ± 1,4	2,5 ± 1,4	2,0 ± 0,8
Monozyten [G/l]	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,3
	n = 15	n = 12	n = 14	n = 13

MW= Mittelwert, Stabw= Standardabweichung; ^adie n-Zahlen geben die Anzahl an Tieren an, bei denen das betreffende Merkmal dokumentiert wurde

4.6.3 Blutchemische Parameter

Es ergaben sich weder zu Beginn noch zum Abschluss der Studie signifikante Gruppenunterschiede für die Werte von **Gesamtkalzium**, **Alanin-Aminotransferase (ALT)**, **Alkalische Phosphatase (AP)**, **Aspartat-Aminotransferase (AST)**, **Glutamatdehydrogenase (GLDH)**, **Gesamtprotein** und **Albumin**.

Zu Studienbeginn wiesen zwei Hunde **Gesamtkalzium**werte auf, die über dem von Kraft und Dürr (2005) publizierten Referenzbereich lagen (siehe Tabelle 7). Es handelte sich um die Hunde 30 (3,1 mmol/l) und 31 (3,1 mmol/l). Zu Studienabschluss wiesen zwei Hunde einen

unterhalb des Referenzbereiches liegenden Wert auf (Hund 13: 2,2 mmol/l, Hund 18: 1,1, mmol/l), ein Hund zeigte einen oberhalb des Referenzbereiches liegenden Wert (Hund 24: 3,3 mmol/l).

Werte deutlich über dem von Kraft und Dürr (2005) publizierten Referenzbereich für **Leberwerte** (siehe Tabelle 7) wiesen zu Beginn der Studie die Hunde 1 (ALT), 7 (AP), 10 (ALT), 11 (ALT, GLDH), 12 (ALT), 14 (ALT), 15 (AP), 18 (ALT), 21 (AP), 22 (ALT, AST, GLDH), 23 (ALT, GLDH), 25 (AP, GLDH), 26 (AP, ALT), 28 (AP, ALT, GLDH), 29 (AP), 30 (AP) und 32 (ALT) auf. Zum Abschluss der Studie waren es die Hunde 1 (ALT), 4 (AST), 7 (AP), 8 (AP, ALT, GLDH), 10 (ALT), 11 (AP, ALT, AST, GLDH), 12 (ALT, GLDH), 14 (AP, ALT), 15 (AP, ALT, GLDH), 21 (AP, ALT, GLDH), 22 (AP, ALT, GLDH), 23 (ALT), 26 (ALT), 29 (AP, ALT, AST, GLDH), 30 (ALT) und 32 (ALT).

Der Referenzbereich für die Menge an **Gesamtprotein** und **Albumin** im Blutserum ist Tabelle 7 zu entnehmen. Zu Studienbeginn wies Hund 30 eine geringgradige Hyperproteinämie auf (76 g/l). Hund 24 hingegen zeigte eine Hypoproteinämie (22 g/l). Der Albumingehalt im Blutserum der Hunde 20 und 26 war erniedrigt (20: 342,0 µmol/l; 26: 347,8 µmol/l). Die Hunde 8, 13 und 23 wiesen sowohl eine Hypoproteinämie als auch eine Hypoalbuminämie auf (8: Protein 41,6 g/l, Albumin 276,8 µmol/l; 13: 41 g/l, Albumin 275,3 µmol/l; 23: Protein 43 g/l, Albumin 340,5 µmol/l). Zum Abschluss der Studie wies Hund 24 eine Hyperproteinämie auf (78 g/dl), Hund 8 eine Hypoproteinämie und Hund 13 eine Hypoproteinämie und Hypoalbuminämie (8: Protein 52,2 g/l; 13: Protein 36 g/l, Albumin 246,3 µmol/l). Tabelle 27 stellt die Ergebnisse der blutchemischen Untersuchung im Studienverlauf und Gruppenvergleich dar. Die Werte für das Einzeltier im Studienverlauf finden sich in den Tabellen 46-49 im Anhang.

Tab. 27: Mittelwerte der blutchemischen Parameter der Hunde zu Beginn und zum Abschluss der Studie im Gruppenvergleich

Untersuchungstag Gruppe	0 Probiotikum				0 Plazebo				90 Probiotikum				90 Plazebo			
	MW (\pm Stabw)	Min	Max	n	MW (\pm Stabw)	Min	Max	n	MW (\pm Stabw)	Min	Max	n	MW (\pm Stabw)	Min	Max	n
Glukose [mmol/l]	5,3 (\pm 1,6)	4,6	8,3	15	5,3 (\pm 1,5)	4,2	7,0	15	5,3 (\pm 1,5)	4,5	6,7	15	5,8 (\pm 0,5)	4,8	7,2	16
Kalzium [mmol/l]	2,7 (\pm 0,2)	2,4	3,1	16	2,6 (\pm 0,2)	2,3	2,9	12	2,6 (\pm 0,5)	1,1	3,3	14	2,6 (\pm 0,2)	2,2	2,9	16
ALT [U/l]	64,4 (\pm 56,5)	29,0	256,0	16	50,4 (\pm 26,8)	25,0	127,0	15	54,9 (\pm 27,7)	23,0	119,0	15	144,6 (\pm 356,1)	26,0	1476,0	16
AP [U/l]	175,8 (\pm 202,2)	27,0	650,0	16	102,9 (\pm 157,4)	32,0	658,0	15	123,1 (\pm 143,7)	37,0	532,0	14	432,1 (\pm 964,9)	35,0	3450,0	16
AST [U/l]	25,3 (\pm 9,1)	14,0	45,0	13	27,1 (\pm 9,5)	11,0	42,0	14	30,7 (\pm 17,3)	17,0	82,0	12	31,3 (\pm 25,7)	13,0	118,0	15
GLDH [U/l]	9,1 (\pm 13,1)	0,5	37,0	13	2,6 (\pm 2,5)	0,0	9,6	14	4,2 (\pm 2,9)	0,5	10,4	12	12,5 (\pm 32,0)	0,5	126,3	15
Protein [g/l]	60,0 (\pm 12,3)	21,7	75,9	16	59,0 (\pm 7,4)	41,0	66,2	16	63,2 (\pm 5,1)	56,0	77,5	14	60,2 (\pm 7,9)	36,0	72,0	16
Albumin [μmol/l]	449,9 (\pm 81,6)	340,5	594,5	16	429,9 (\pm 68,6)	275,3	574,0	16	375,9 (\pm 148,8)	370,9	539,2	14	438,6 (\pm 66,3)	246,3	541,9	16

MW= Mittelwert, Stabw= Standardabweichung, Min= Minimum, Max= Maximum; die n-Zahlen geben die Anzahl an Tieren an, bei denen das betreffende Merkmal erfasst wurde

4.6.4 Trypsin-like Immunoreactivity (TLI), Vitamin B₁₂, Folsäure und C-Reaktives Protein (CRP)

Die TLI wurde nur zu Beginn der Studie im Zuge der Ausschlussdiagnostik bestimmt. Der vom Labor angegebene Referenzbereich liegt bei $>5 \mu\text{g/l}$ (fraglich: $2,5\text{-}5 \mu\text{g/l}$, siehe Tabelle 8). Alle Hunde bis auf einen, der bekanntermaßen unter einer exokrinen Pankreasinsuffizienz litt und zusätzlich histologisch nachgewiesen IBD-Patient war, wiesen Werte innerhalb des Referenzbereichs auf.

Der **Cobalamingehalt (Vitamin B₁₂)** im Blutserum eines Hundes sollte laut untersuchendem Labor zwischen 300 und 800 pg/ml liegen (siehe Tabelle 8). Tabelle 28 gibt darüber Aufschluss, bei wievielen Tieren zu Beginn und zum Abschluss der Studie dieser Parameter bestimmt wurde, ob die Werte der betreffenden Tiere unterhalb, innerhalb oder oberhalb des Referenzbereiches lagen und ob Cobalamin substituiert wurde.

Tab. 28: Anzahl unterhalb, innerhalb oder oberhalb des Referenzbereiches liegende Cobalaminwerte im Gruppenvergleich und Studienverlauf

Untersuchungstag Gruppe	0		90	
	Plazebo	Probiotikum	Plazebo	Probiotikum
n	16	15	15	14
Anzahl der Tiere, deren Werte unterhalb des Referenzbereiches lagen	6 (3)*	2 (2)	2 (0)	1 (0)
Anzahl der Tiere, deren Werte innerhalb des Referenzbereiches lagen	9 (0)	13 (1)	8 (1)	11 (2)
Anzahl der Tiere, deren Werte oberhalb des Referenzbereiches lagen	1 (0)	0 (0)	5 (2)	2 (1)

* In Klammern steht der Anteil an Hunden, bei denen Cobalamin substituiert worden ist

Betrachtet man nur die Tiere, denen während der Studie kein Cobalamin supplementiert wurde (weil sie entweder innerhalb oder oberhalb des Referenzbereiches lagen oder der Parameter erst nach Studienabschluss bestimmt wurde), so lagen die Werte in der Plazebogruppe zum Abschluss der Studie zwischen 116 und 1176 pg/ml (MW $514,9 \pm 311,1$ pg/ml) und in der Probiotikagruppe zwischen 269 und 864 pg/ml (MW $496,2 \pm 208,1$ pg/ml). Es ergaben sich bei diesen Tieren weder zu Beginn noch zum Abschluss der Studie statistisch signifikante Gruppenunterschiede. Alle Tiere, denen Cobalamin supplementiert wurde (Hunde 1, 4, 8, 17, 20, 21), zeigten zum Abschluss der Studie Werte im Referenzbereich (Hunde 1, 17, 20) oder darüber (Hunde 4, 8, 21). Von den Tieren, deren Werte zu Studienbeginn unterhalb des Referenzbereiches lagen und die keine Substituierung erhielten (Hunde 9, 12, 13), lagen die Werte zu Studienabschluss weiterhin unterhalb des Referenzbereiches (Hunde 12, 13) oder der Wert wurde nicht bestimmt, da kein Serum gewonnen worden war (Hund 9). Ein Tier (Hund 27) wies zu Studienbeginn einen Cobalaminspiegel im Referenzbereich auf (330 pg/ml), zu Studienabschluss war er jedoch erniedrigt (269 pg/ml). Der Hund (Hund 11), der schon zu Studienbeginn einen erhöhten Cobalaminspiegel aufgewiesen hatte (1128 pg/ml), zeigte diesen auch zu Studienabschluss (900 pg/ml). Zwei Tiere der Plazebogruppe (Hunde 15, 16) und ein Tier der Probiotikagruppe (Hund 30) wiesen zu Studienabschluss über dem Referenzbereich liegende Werte auf, die zu Studienbeginn noch innerhalb des Referenzbereiches gelegen hatten, obwohl bei ihnen kein Cobalamin substituiert worden war. Die Hunde der Plazebogruppe wiesen zum Abschluss der

Studie signifikant höhere Cobalaminwerte auf als zu Beginn der Studie ($p = 0,041$), die Hunde der Probiotikagruppe nicht.

Der vom untersuchenden Labor angegebene Referenzbereich für **Folsäure** liegt zwischen 3,0 (4,0)–10 ng/ml (siehe Tabelle 8). Tabelle 29 stellt die Anzahl an Tieren im Gruppenvergleich und Studienverlauf dar, die unterhalb, innerhalb oder oberhalb des Referenzbereiches lagen. Zudem sind Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Tab. 29: Anzahl unterhalb, innerhalb oder oberhalb des Referenzbereiches liegende Folsäurewerte im Gruppenvergleich und Studienverlauf mit Mittelwert und Standardabweichung

Untersuchungstag Gruppe	0		90	
	Plazebo	Probiotikum	Plazebo	Probiotikum
n	16	16	15	14
Anzahl der Tiere, deren Werte unterhalb des Referenzbereiches lagen	0	0	0	0
Anzahl der Tiere, deren Werte innerhalb des Referenzbereiches lagen	7	4	2 (1)*	3 (1)
Anzahl der Tiere, deren Werte oberhalb des Referenzbereiches lagen	9	12	13 (2)	11 ((2)
MW \pm Stabw	11,9 \pm 5,4	12,3 \pm 4,6	14,5 \pm 5,5	13,5 \pm 4,5

* In Klammern steht die Anzahl an Probanden, bei denen Cobalamin substituiert wurde; MW = Mittelwert; Stabw = Standardabweichung

Sowohl zu Beginn als auch zum Abschluss der Studie normale Folsäurewerte wiesen die Hunde 12, 13, 27 und 28 auf. Die Hunde 12 und 13 zeigten außerdem sowohl zu Studienbeginn als auch zum Abschluss erniedrigte Cobalaminspiegel. Hund 27 wies dies nur zum Studienabschluss auf. Alle diese Tiere hatten keine Cobalaminsubstituierung erhalten. Zu Studienbeginn wiesen drei Tiere der Plazebogruppe (Hunde 1, 4, 9) und ein Tier der Probiotikagruppe (Hund 21) erniedrigte Cobalaminspiegel in Kombination mit einem erhöhten Folsäurespiegel auf. Eine Substituierung mit Cobalamin erhielten die Tiere 1, 4 und 21. Zum Studienabschluss waren die Cobalaminspiegel dieser Tiere in der Norm oder darüber (s.o.), die Folsäurewerte blieben jedoch erhöht. Über Hund 9 kann diesbezüglich keine Aussage getroffen werden, da die Abschlusswerte nicht bestimmt wurden. Zum Studienabschluss erhöhte Werte bei normalen Ausgangswerten wiesen 4 Hunde der Plazebogruppe (Hunde 2, 7, 8, 11) und ein Hund der Probiotikagruppe (Hund 20) auf, von denen die Hunde 8 und 20 eine Cobalaminsubstitution erfahren hatten, Einen zu Studienbeginn erhöhten und zum Abschluss normalen Wert wies Hund 26 auf. Bei den Hunden 9, 25 und 32 wurden keine Abschlusswerte bestimmt.

Die Hunde der Plazebogruppe wiesen zum Abschluss der Studie tendenziell niedrigere Werte für das **C-reaktive Protein (CRP)** auf als die Hunde der Probiotikagruppe ($p=0,087$). Der Referenzbereich für das CRP liegt laut untersuchendem Labor unter 15 mg/l. Tabelle 30 gibt die Mittelwerte für das CRP mit Standardabweichung im Gruppenvergleich und Studienverlauf an.

Tab. 30: Mittelwerte mit Standardabweichung des C-Reaktiven Proteins im Gruppenvergleich und Studienverlauf

Untersuchungstag	Plazebo n	Probiotikum n
0	3,6 ± 4,6* 16	20,5 ± 36,7 16
90	5,5 ± 15,9 15	13,3 ± 18,5 15

* Mittelwert ± Standardabweichung

die n-Zahlen geben die Anzahl an Tieren an, bei denen das betreffende Merkmal erfasst wurde

Der Abfall eines erhöhten Ausgangswertes in den Normalbereich erfolgte bei Hund 16 (15,4 mg/l auf 1,0 mg/l), einen Anstieg aus dem Normalbereich zu einem erhöhten Wert erlitt Hund 9 (0,1 mg/l auf 62,8 mg/l). Die Hunde 20, 21 und 23 wiesen zu Studienbeginn stark erhöhte Werte auf, die zu Studienabschluss mehr oder weniger stark gesunken waren (Hund 20: 104,1 mg/l auf 35 mg/l; Hund 21: 89,1 mg/l auf 69,6 mg/l; Hund 23: 89,1 mg/l auf 27,0 mg /l). Die Werte von Trypsin-like Immunoreactivity, Cobalamin, Folsäure und C-Reaktivem Protein im Gruppenvergleich und Studienverlauf für das Einzeltier finden sich in den Tabellen 50-53 im Anhang.

4.7 Lymphozytenphänotypisierung

4.7.1 CD4⁺-Lymphozyten

Die Analyse der Lymphozytensubpopulationen im Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) ergab zu keinem Zeitpunkt der Studie einen statistisch signifikanten Gruppenunterschied des Anteils an CD4⁺-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl. Der Vergleich von Ausgangs- und Abschlusswerten innerhalb der Gruppen ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 8).

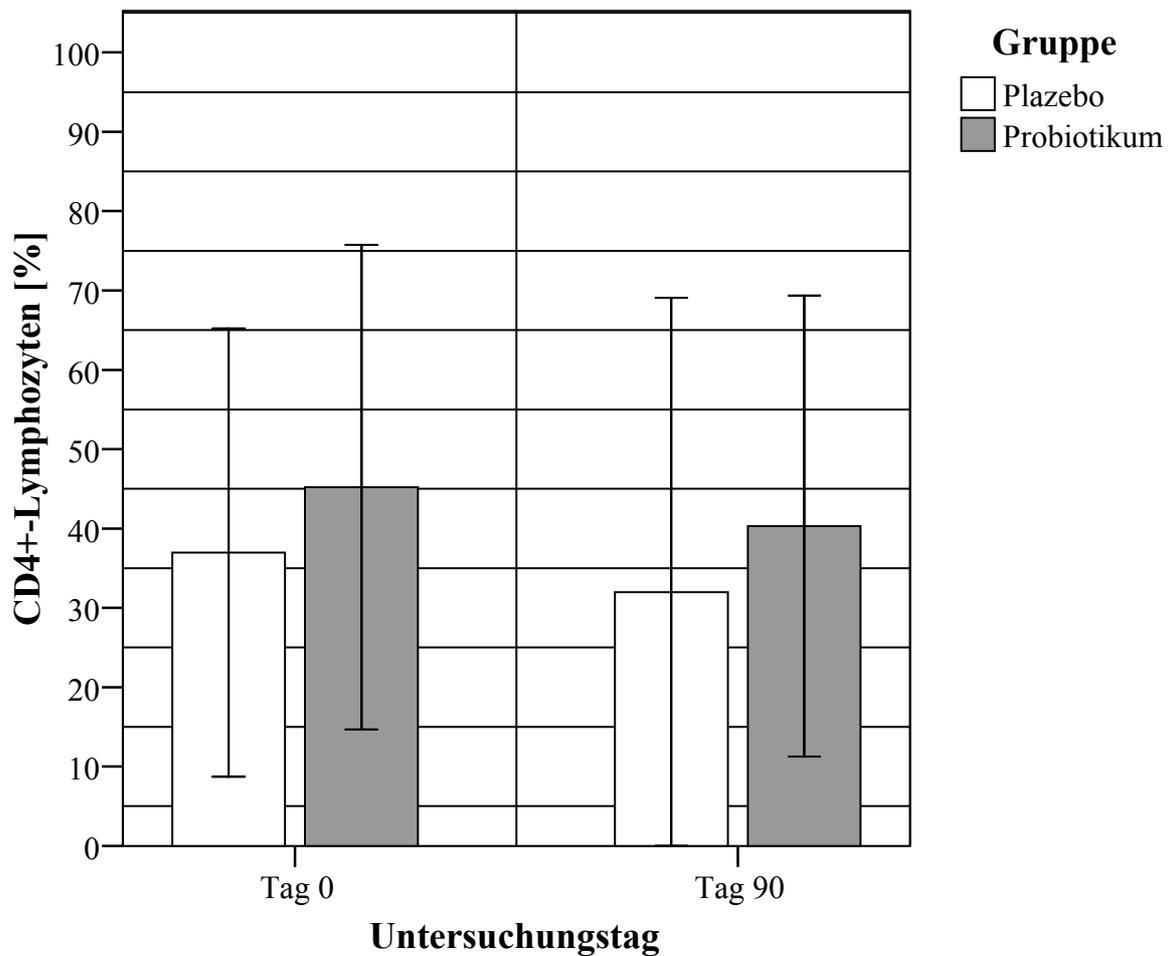


Abb. 8: CD4⁺-Lymphozytensubpopulation der Hunde [%] im Gruppenvergleich vor Beginn und zum Abschluss der Intervention (n.s.), dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung

4.7.2 CD8 β^+ -Lymphozyten

Auch der Anteil der CD8 β^+ -Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl wies zu Beginn oder Abschluss keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied auf. Es ergab sich ebenfalls kein Unterschied der Ausgangs- und Abschlusswerte innerhalb der Gruppen. In der Probiotikagruppe kam es im Studienverlauf zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg, in der Plazebogruppe zu einem leichten, nicht signifikanten Abfall (siehe Abbildung 9).

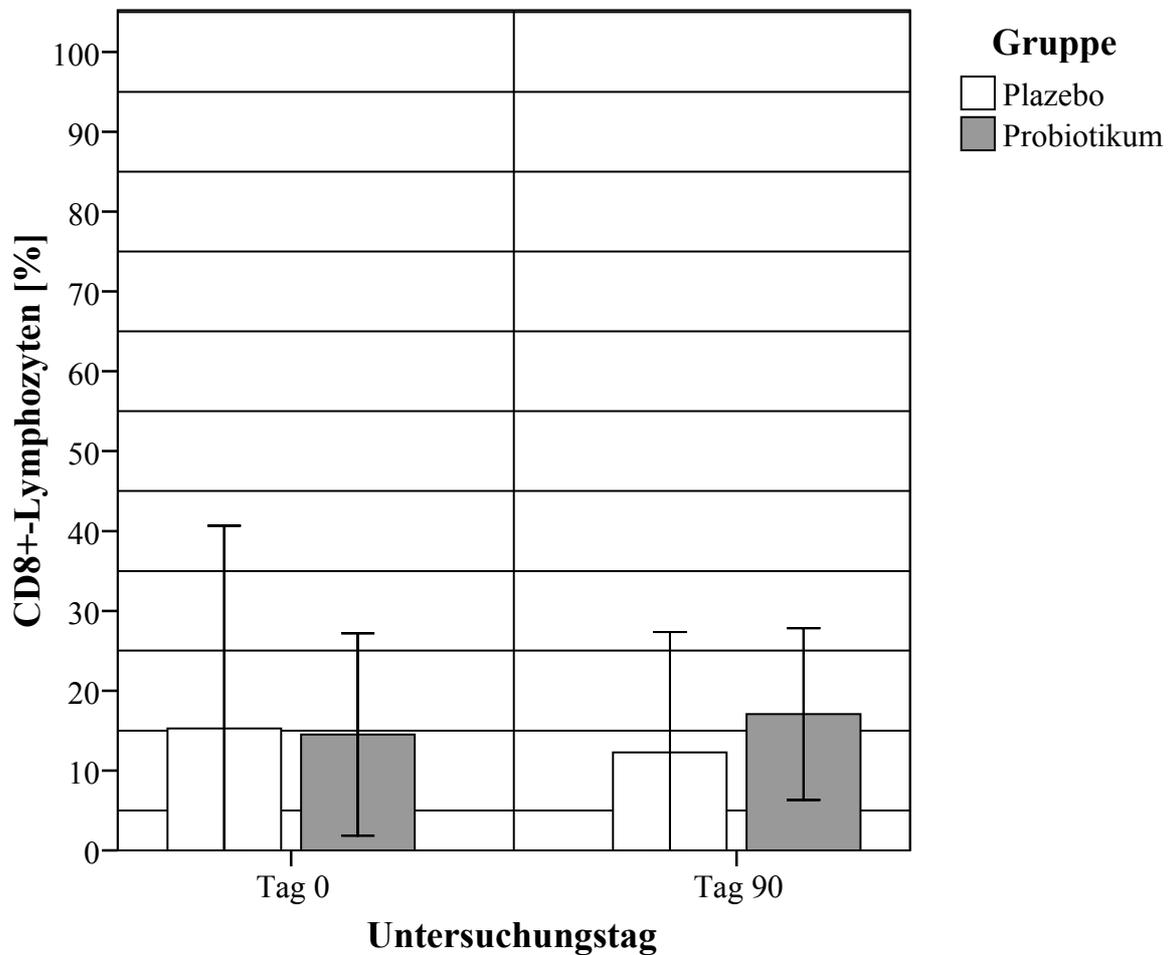


Abb. 9: CD8 β^+ -Lymphozytensubpopulation der Hunde [%] im Gruppenvergleich vor Beginn und zum Abschluss der Intervention (n.s.), dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung

4.7.3 CD21⁺-Lymphozyten

Es konnte kein statistisch signifikanter Gruppenunterschied des Anteils an CD21⁺-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl gezeigt werden. Ebenso zeigte sich kein Unterschied im Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte innerhalb der Gruppen. In beiden Gruppen kam es zu einem leichten Anstieg der Werte, doch dieser war nicht signifikant (siehe Abbildung 10).

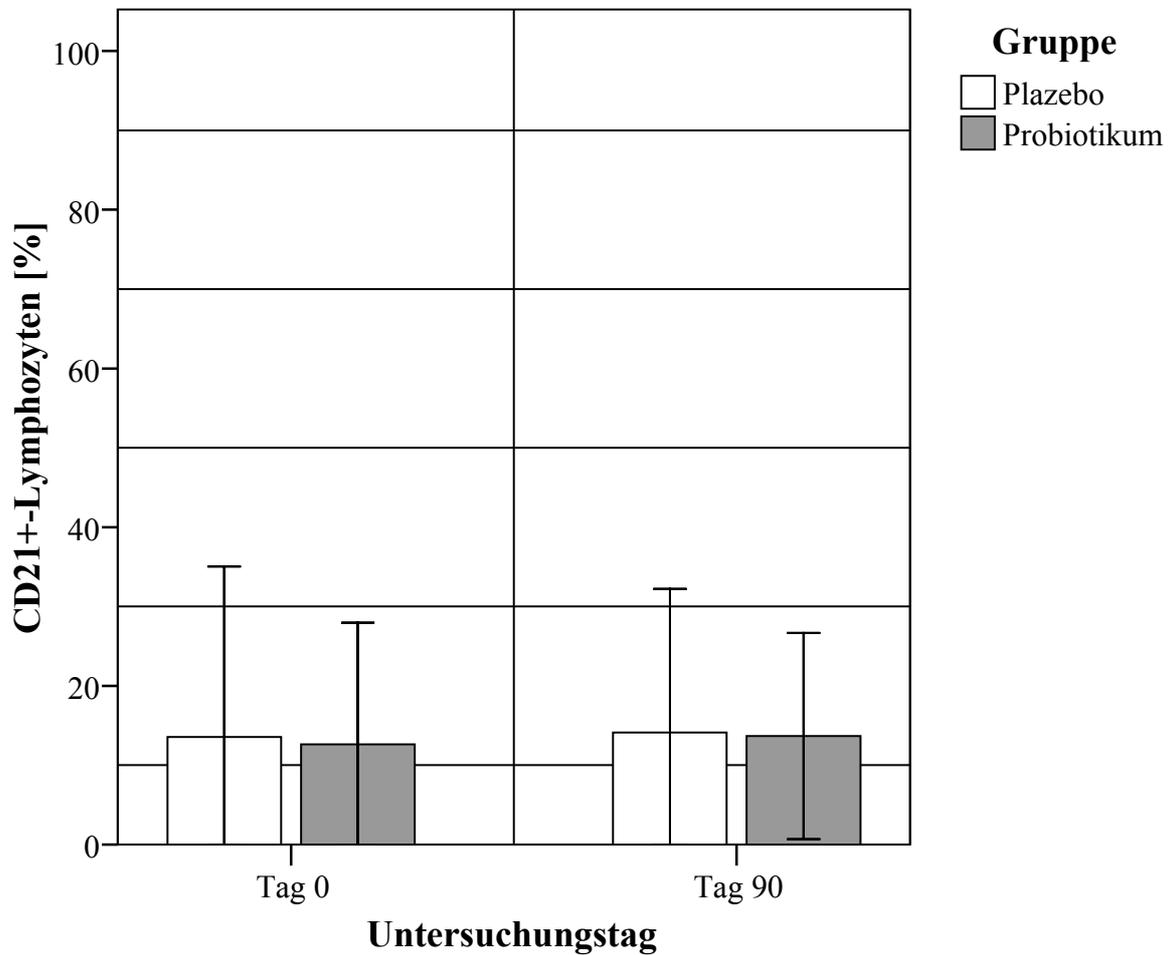


Abb. 10: CD21⁺-Lymphozytensubpopulation der Hunde [%] im Gruppenvergleich vor Beginn und zum Abschluss der Intervention (n.s.), dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung

4.7.4 CD5⁺-Lymphozyten

Der Anteil an CD5⁺-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl wies zu keinem Zeitpunkt der Studie einen statistisch signifikanten Gruppenunterschied auf, ebenso wenig wie seine Änderung im Lauf der Studie innerhalb der Gruppen. Es kam in beiden Gruppen zu einem nicht signifikanten Abfall der Werte (siehe Abbildung 11).

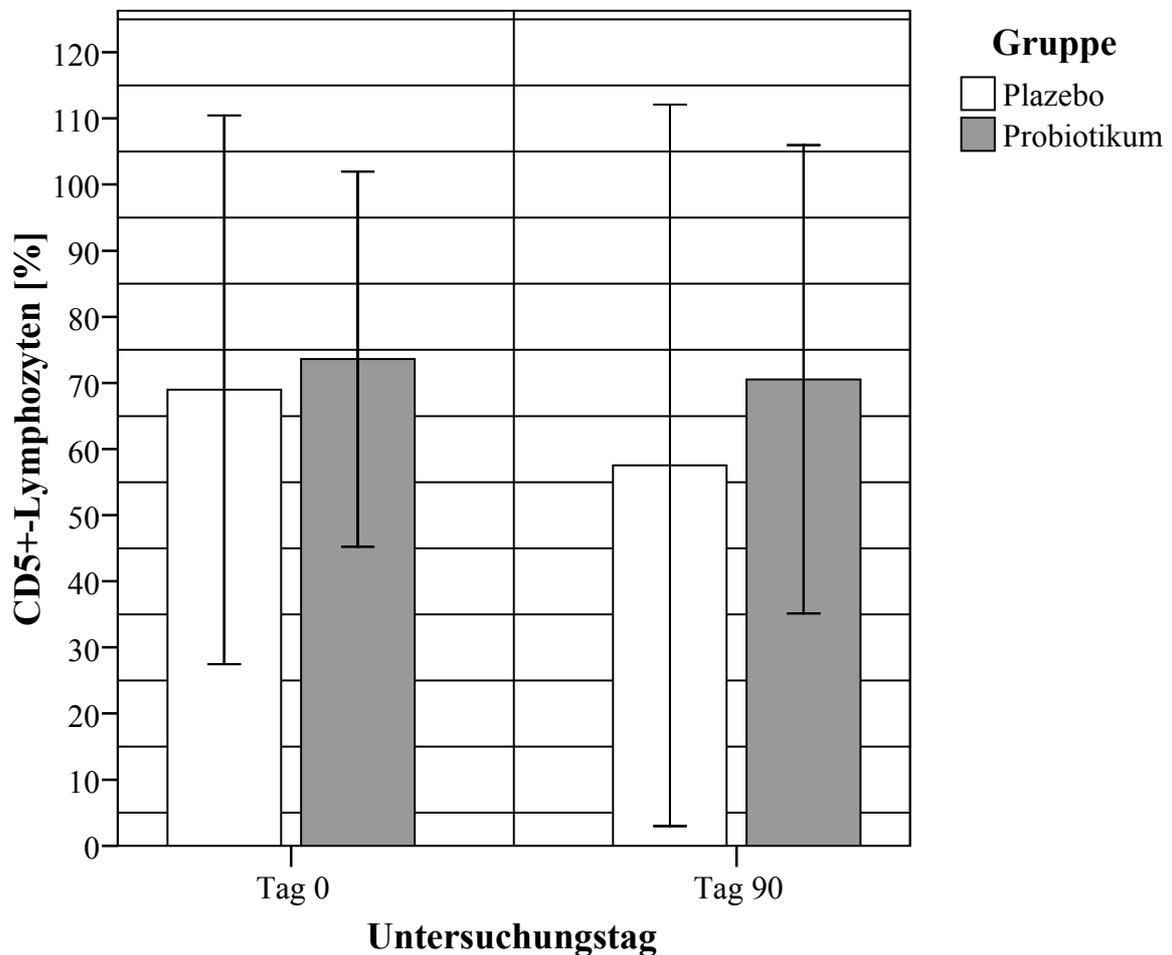


Abb. 11: CD5⁺-Lymphozytensubpopulation der Hunde [%] im Gruppenvergleich vor Beginn und zum Abschluss der Interventionen (n.s.), dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung

4.8 Röntgenbefunde

Bei der Röntgenuntersuchung vor Beginn der Intervention fielen in je zwei Fällen gasgefüllte Darmschlingen (Hund 6, 15) oder eine geringgradige Kardiomegalie (Hund 7, 15) auf. Das Röntgenbild eines Tieres zeigte zwei kleinere röntgendichte Strukturen, deren Zusammenhang mit den Symptomen ungeklärt blieb (Hund 8). Ein Hund zeigte einen hypomotilen, auf 1,5 cm dilatierten Oesophagus (Hund 12), zwei Tiere eine vergrößerte Prostata (Hund 14, 20), die sich im Ultraschall homogen darstellte, ebenfalls zwei Tiere eine Hepatomegalie (Hund 15, 25) und ein Tier eine runde Masse dorsocranial der Harnblase im Verbund mit luftgefüllten Darmschlingen (Hund 22). Bei einem Hund fiel eine Kotanschoppung im Enddarm auf (Hund 25). Die gasgefüllten Darmschlingen wiesen auf Flatulenzen hin. Die Hepatomegalie von Hund 15 erwies sich im Ultraschall als geringgradig hyperechoisch. Die Bedeutung der runden Masse dorsocranial der Harnblase eines Tieres blieb ungeklärt und konnte in der darauffolgenden Ultraschalluntersuchung nicht dargestellt werden.

Die Röntgenaufnahmen der restlichen Hunde waren ohne besonderen Befund.

4.9 Ultraschallbefunde

Der abdominale Ultraschall wurde bei 21 Tieren vor Beginn der Intervention im Zuge der Ausschlussdiagnostik durchgeführt. Die Wanddicke des Magens wurde bei zwei Tieren bestimmt. Sie lag bei Hund 30 bei 5 mm (Pylorus 7 mm) und bei Hund 12 bei 8,6 mm. Die Dicke der Darmwände des Duodenums wurde bei acht Hunden (Hund 9, 10, 11, 12, 18, 25, 26, 28) gemessen und reichte von physiologischen 3,2 mm (Hund 18) bis zu auffälligen 7mm (Hund 11). Drei Hunde zeigten eine Duodenumwanddicke von > 5 mm (Hund 9, 11, 12). Die Jejunumwand wurde bei nur einem Tier vermessen und wies eine Dicke von 4,2 mm auf (Hund 26). Die Dicke der Kolonwand wurde bei sechs Tieren bestimmt (Hund 9, 10, 12, 25, 26, 28) und reichte von < 1,6 mm (Hund 12) bis 2,2 mm (Hund 10). Bei sieben Hunden wurden Darmwanddicken bestimmt, ohne den Darmabschnitt näher zu spezifizieren (Hund 6, 8, 14, 15, 20, 24, 30). Sie wiesen eine Darmwanddicke von physiologischen 3 mm (Hund 6) bis 7 mm (Hund 8) auf. Bei fünf Hunden (Hund 16, 17, 22, 27, 32) wurden die Darmwände als „normal“ (Hund 16, 22, 32) bzw. „verdickt“ (Hund 17, 27) beschrieben. Die Darmwandschichtung wurde bei 2 Hunden als „ohne besonderen Befund“ beschrieben (Hund 16, 32), bei einem Hund erwies sich die *Tunica muscularis* als hypertrophiert (Hund 12). Von den 21 untersuchten Hunden zeigten 15 Tiere (71,4 %) verdickte Darmwände (3,2 - 7,8 mm) (Hunde 8 -15, 17, 18, 20, 24 - 27), ein Tier einen wenig tonischen Magen (Hund 28), 2 Tiere eine verdickte Magenwand im Fundusbereich (Hund 12, 30), ein Tier eine verdickte Pyloruswand (Hund 30), 5 Tiere (23,8 %) vergrößerte mesenteriale Lymphknoten (Hund 9, 12, 13, 25, 27), 3 Tiere (15,8 %) eine homogene Spleno- und Hepatomegalie (Hund 8, 20, 28), ein Tier eine hyperämische Milz (Hund 13), ein Tier eine geringgradig hyperechoische Hepatomegalie (Hund 15) und ein Tier stumpfe Leberränder (Hund 30).

4.10 Endoskopiebefunde

Zu Beginn der Studie wurde eine Gastro- und Duodenoskopie bei 21 Hunden und zusätzlich eine Rektoskopie bei 18 Hunden durchgeführt. Der Endoskopiebefund eines endoskopierten Tieres liegt nicht vor (Hund 16).

Während der Endoskopie wurden die Befunde im **Oesophagus** von 14 Tieren dokumentiert. Er zeigte sich bei einem Tier generalisiert gerötet (Hund 18), bei zwei Tieren war er mit einer Flüssigkeit gefüllt, bei der es sich vermutlich um Galle handelte (Hund 2 und 3). In einem Fall war die Peristaltik erhöht (Hund 28) und in einem anderen Fall war er atonisch (Hund 12). Einen dilatierten Oesophagus wiesen zwei Tiere auf (Hund 12 und 25). In neun Fällen zeigte er keinen besonderen Befund (Hund 8, 9, 10, 15, 17, 20, 22, 28 und 30).

Die **Cardia** wurde bei sieben Tieren beschrieben. Davon zeigten drei Tiere eine gerötete Cardia (Hund 2, 12 und 18), in zwei Fällen stand sie offen (Hund 2 und 3), in drei Fällen war sie geschlossen (Hund 8, 15 und 30).

Die Befunde im **Magen** wurden von 18 Tieren dokumentiert. Eine Schleimhautrötung (fokal/fleckig) zeigten zehn Tiere (Hund 3, 8, 9, 13, 15, 18, 20, 25, 28 und 30), eine verdickte Mukosa (Hund 13), Erosionen (Hund 11) oder eine unregelmäßige Schleimhautoberfläche (Hund 20) je ein Tier. Fünf Tiere wiesen eine Magenfaltenprotrusion auf (Hund 2, 12, 13, 25 und 28). Ein Hund zeigte eine erhöhte Antrumperistaltik (Hund 28), wiederum zwei andere Tiere eine Atonie (Hund 12 und 26). Der Inhalt des Magens wurde bei acht Tieren beschrieben. Davon hatten zwei Tiere Schaum und/oder Galle (Hund 8 und 10) und zwei Tiere viel Gras im Magen (Hund 20 und 22), der Magen von drei Tieren war flüssigkeitsgefüllt (Hund 9, 18 und 20). Bei drei Tieren zeigte er keinen besonderen Befund (Hund 21, 22 und 32).

Der **Pylorus** stand bei einem Tier offen (Hund 3), ein anderes wies einen Gallereflux auf (Hund 2). In je einem Fall zeigte er sich gerötet (Hund 10), granuliert (Hund 9), zapfenförmig (Hund 10) oder hatte kleine gelblich-käsige Auflagerungen (Hund 17). Leicht passierbar war er in einem Fall (Hund 20), durch Gras nicht mehr passierbar in einem anderen (Hund 22). Ein Tier wies dilatierte Lymphgefäße im Pylorusbereich auf (Hund 30). Bei einem Tier zeigte er keinen besonderen Befund (Hund 15).

Die Befunde des **Dünndarms** bzw. des **Duodenums** wurden bei 14 Tieren dokumentiert. Eine Schleimhautrötung (fokal/fleckig) zeigten sechs Tiere (Hund 2, 3, 9, 15, 17 und 20) und eine granuliert Schleimhaut fünf Tiere (Hund 9, 11, 25, 27 und 28). Ein Tier wies Galle im Duodenum auf (Hund 2), in einem anderen Fall war das Duodenum atonisch (Hund 12). Bei drei Tieren zeigte es keinen besonderen Befund (Hund 18, 21 und 32).

Die Befunde im **Kolon** wurden in zehn Fällen beschrieben. Ein Tier zeigte eine granuliert, erosiv veränderte Schleimhaut (Hund 10), ein anderes eine diffus gerötete Schleimhaut (Hund 12). Eine Atonie zeigte sich in einem Fall (Hund 12). In vier Fällen war die Schleimhaut durch Kotreste schwer beurteilbar (Hund 2, 17, 18 und 28), bei fünf Tieren zeigte sich kein besonderer Befund (Hund 3, 8, 18, 21 und 32).

Die Befunde im **Rektum** wurden bei sechs Tieren dokumentiert. In drei Fällen war es mit Fäzes gefüllt (Hund 18, 21 und 30), Gras und Sand fand sich in einem Fall (Hund 22). Ein Tier wies eine fleckig gerötete Schleimhaut auf (Hund 20). Bei drei Tieren war das Rektum makroskopisch ohne besonderen Befund (Hund 17, 18 und 30).

Die Befunde im **After** wurden nur bei einem Tier beschrieben (Hund 20). Er erwies sich als geschwollen, geringgradig gerötet und zeigte sehr kleine, perianale Fisteln.

Die pathologischen Befunde bei den Probanden, die bei Röntgen, Ultraschall und Endoskopie erhoben wurden, finden sich in Tabelle 54 im Anhang.

4.11 Histopathologische Untersuchung

Die histopathologischen Veränderungen der verschiedenen Darmabschnitte wurden nach detaillierter Beschreibung der Veränderungen zusammenfassend beurteilt. Davon zeigten im **Magen** drei Tiere keine wesentlichen pathologischen Veränderungen (Hund 17, 22, 27), zwei Tiere eine chronisch-reaktive (Hund 2, 25), drei Tiere eine chronisch-aktive (Hund 10, 11, 18) und zwei Tiere eine nicht näher spezifizierte Gastropathie (Hund 16, 21). Je ein Tier wies eine lymphozytäre (Hund 12), eine reaktive (Hund 3), eine unspezifisch-reaktive (Hund 13) und eine chronisch-aktive Gastritis (Hund 32) auf. Fünf Tiere zeigten eine nicht näher spezifizierte Gastritis (Hund 8, 15, 20, 26, 30). Die Veränderungen wurden bei vier Tieren als grenzwertig eingestuft (Hund 3, 13, 16, 18), bei zwei Tieren als mäßiggradig (Hund 10, 21) und bei je drei Tieren als geringgradig (Hund 26, 30, 32) bzw. mittelgradig (Hund 8, 15, 20). Bei vier Tieren wurde der Ausprägungsgrad der Veränderungen nicht angegeben (Hund 2, 11, 12, 25).

Eine lymphoplasmazelluläre **Duodenitis** zeigten 18 Tiere (Hund 2, 3, 7 - 11, 13, 15, 17, 18, 20, 21, 25 - 27, 30, 32) und je ein Tier eine lymphozytäre (Hund 12) bzw. eosinophile Duodenitis (Hund 16). Eine Beteiligung von Granulozyten lag bei drei Tieren vor (Hund 9, 21, 25). Ein Tier zeigte lediglich eine ödematöse Schleimhaut (Hund 22). Als mäßiggradig (Hund 3) bzw. gering- bis mittelgradig (Hund 13) wurden die Veränderungen bei je einem Tier beurteilt, als mittelgradig bei neun Tieren (Hund 8, 9, 15, 17, 18, 20, 26, 30, 32), als mittel- bis hochgradig (Hund 21) bzw. massiv (Hund 11) bei je einem Tier und als ausgeprägt bei 2 Tieren (Hund 2, 25). Bei fünf Tieren wurde der Ausprägungsgrad nicht angegeben (Hund 7, 10, 12, 16, 27).

17 Hunde wiesen eine lymphoplasmazelluläre **Kolitis** auf (Hund 2, 3, 7, 9, 8, 10, 12, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 25, 26, 30, 32) und je ein Tier eine eosinophile Kolitis (Hund 16) bzw. keinen pathologischen Befund (Hund 28). Je ein Tier zeigte eine grenzwertige (Hund 32), eine geringgradige (Hund 8), eine mäßiggradige (Hund 3) bzw. eine gering- bis mäßiggradige (Hund 22) Ausprägung. Eine gering- bis mittelgradige Ausprägung zeigten drei Tiere (Hund 17, 18, 30), eine mittelgradige vier Patienten (Hund 9, 15, 20, 26), eine mittel- bis hochgradige ein Tier (Hund 21) und ausgeprägte Veränderungen drei Tiere (Hund 2, 12, 25). Eine Beurteilung des Ausprägungsgrades von drei Tieren liegt nicht vor (Hund 7, 10, 16). Tabelle 31 stellt die Beurteilungen der Art der histopathologischen Untersuchungen für jeden untersuchten Darmabschnitt des Einzeltieres im Gruppenvergleich dar.

Tab. 31: Beurteilung der Art der histopathologischen Untersuchungen für Magen, Duodenum und Kolon der Probanden im Gruppenvergleich

Hund	Gruppe	Magen	Duodenum	Kolon
2	Plazebo	chronisch-reaktive Gastropathie (geringe subepitheliale lymphoplasmazelluläre Infiltration)	ausgeprägte lymphoplasmazelluläre Duodenitis	ausgeprägte lymphoplasmazelluläre Kolitis
3	Plazebo	Grenzwert-Gastritis, reaktiv (mäßige interstitielle disseminierte lymphoplasmazelluläre Infiltration)	mäßiggradige lymphoplasmazelluläre Duodenitis unter Beteiligung von Granulozyten	mäßiggradige, fokal ausgeprägte lymphoplasmazelluläre Kolitis unter Beteiligung von Granulozyten, vereinzelt eosinophile Granulozyten
7	Plazebo		chronische lymphoplasmazelluläre Duodenitis	chronische lymphoplasmazelluläre Kolitis
8	Plazebo	mgr. Gastritis (mäßige subepitheliale lymphoplasmazelluläre Infiltration unter Beteiligung zahlreicher Granulozyten)	mgr. lymphoplasmazelluläre Duodenitis	ggr. lymphoplasmazelluläre Kolitis
9	Plazebo		mgr. lymphoplasmazelluläre Duodenitis mit Beteiligung von Granulozyten	mgr. lymphoplasmazelluläre Kolitis unter Beteiligung eosinophiler Granulozyten
10	Plazebo	mäßiggradige chronisch-aktive entzündliche Gastropathie (mäßige disseminierte lymphoplasmazelluläre Infiltration von Mukosa und Submukosa)	mäßiggradige chronische lymphoplasmazelluläre Duodenitis	chronische lymphoplasmazelluläre Kolitis
11	Plazebo	chronisch-aktive entzündliche Gastropathie (mäßige disseminierte lymphoplasmazelluläre Infiltration unter Beteiligung neutrophiler Granulozyten)	massive lymphoplasmazelluläre Infiltration	
12	Plazebo	lymphozytäre Gastritis	lymphoplasmazelluläre Duodenitis	ausgeprägte lymphoplasmazelluläre Kolitis
13	Plazebo	grenzwertige, unspezifisch-reaktive Gastritis (ggr. subepitheliale lymphoplasmazelluläre Infiltration)	ggr.- mgr. lymphoplasmazelluläre Duodenitis	
15	Plazebo	mgr. Gastritis (deutliche subepitheliale und interstitielle lymphoplasmazelluläre Infiltration unter Beteiligung einzelner Granulozyten)	mgr. lymphoplasmazelluläre Duodenitis	mgr. lymphoplasmazelluläre Kolitis
16	Plazebo	grenzwertige entzündliche Gastropathie (ggr. subepitheliale entzündliche lymphoplasmazelluläre Infiltration)	ausgeprägte eosinophile Duodenitis	ausgeprägte eosinophile Kolitis

Hund	Gruppe	Magen	Duodenum	Kolon
17	Probiotikum	ohne wesentliche pathologische Veränderungen (vereinzelte lymphoplasmazelluläre Infiltrate)	mgr. chronisch-aktive Duodenitis (mgr. disseminierte lymphoplasmazelluläre Infiltration unter Beteiligung von Granulozyten)	ggr. - mgr. Kolitis (disseminierte lymphoplasmazelluläre Infiltration der Schleimhaut unter Beteiligung von Granulozyten, darunter auch eosinophile Granulozyten)
18	Probiotikum	grenzwertige chronisch-aktive entzündliche Gastropathie (ggr. lymphoplasmazelluläre Infiltration)	mgr. chronisch-aktive Duodenitis (mgr. disseminierte lymphoplasmazelluläre Infiltration unter Beteiligung von Granulozyten, darunter auch eosinophile Granulozyten)	mgr. chronisch-aktive Kolitis (disseminierte lymphoplasmazelluläre Infiltration der Schleimhaut unter Beteiligung von eosinophilen Granulozyten)
20	Probiotikum	mgr. lymphoplasmazelluläre Gastritis	mgr. lymphoplasmazelluläre Duodenitis	mgr. lymphoplasmazelluläre Kolitis
21	Probiotikum	mäßiggradige lymphoplasmazelluläre, z.T. granulozytäre entzündliche Gastropathie	mgr. - hgr. chronisch-aktive lymphoplasmazelluläre Duodenitis mit einzelnen Granulozyten	mgr. - hgr. follikulär/mini-granulomatöse lymphoplasmazelluläre chronisch-aktive Kolitis
22	Probiotikum	ohne wesentliche pathologische Veränderungen (geringe subepitheliale disseminierte lymphoplasmazelluläre	Schleimhaut mit Ödem (mäßige lymphoplasmazelluläre Infiltration)	ggr. bis mäßiggradige lymphoplasmazelluläre Kolitis
25	Probiotikum	chronisch-reaktive Gastropathie (ausgeprägte herdförmige und disseminierte lymphoplasmazelluläre Infiltration der Propria, vereinzelt neutrophile Granulozyten)	ausgeprägte chronisch-aktive lymphoplasmazelluläre Duodenitis mit Beteiligung von Granulozyten	ausgeprägte lymphoplasmazelluläre Kolitis
26	Probiotikum	ggr. Gastritis (subepitheliale entzündliche Infiltration unter Beteiligung von Granulozyten)	mgr. lymphoplasmazelluläre Duodenitis unter Beteiligung von neutrophilen Granulozyten, darunter auch eosinophile Granulozyten	mgr. lymphoplasmazelluläre Kolitis
27	Probiotikum	ohne wesentliche pathologische Veränderungen	chronisch lymphoplasmazelluläre Duodenitis	
28	Probiotikum	ggr. vermehrte Infiltration der Propria mit Lymphozyten, vereinzelt Plasmazellen	mgr. vermehrte Lymphozyten und Plasmazellen	ohne wesentliche pathologische Veränderungen
30	Probiotikum	ggr. lymphoplasmazelluläre Gastritis unter Beteiligung einzelner eosinophiler Granulozyten	mgr. lymphoplasmazelluläre Duodenitis	ggr. - mgr. lymphoplasmazelluläre Kolitis
32	Probiotikum	ggr. chronisch-aktive, lymphoplasmazelluläre Gastritis	mgr. chronisch-aktive, lymphoplasmazelluläre Duodenitis	ggr. lymphoplasmazelluläre Kolitis (Grenzwert)

4.12 Diagnose der histologischen Untersuchung

Der kritische Bericht bzw. die Diagnose der histologischen Untersuchung lautete für zwei Tiere „unspezifisch reaktiv“ (Hund 13, 27) und für je ein Tier „sekundäre Enteropathie“ (Hund 22), „Verdacht auf alimentäres Lymphom“ (Hund 11) bzw. „Eosinophile Enteritis“ (Hund 16). Die Veränderungen, die während der histopathologischen Untersuchung festgestellt wurden, sprachen in 9 Fällen am ehesten für eine FRD (Hund 3, 7, 9, 17, 18, 20, 26, 30, 32) und in 8 Fällen für eine IBD/LPE (Hund 2, 8, 10, 12, 15, 21, 25, 28). Tabelle 32 stellt die abschließende Diagnose nach Einschätzung des untersuchenden Histopathologen nach zusammenfassender Beurteilung aller histopathologischer Veränderungen im Gastrointestinaltrakt für das Einzeltier dar.

Tab. 32: Abschließende Diagnose nach zusammenfassender Beurteilung aller histopathologischer Veränderungen im Gastrointestinaltrakt für das Einzeltier

Hund	Diagnose
2	IBD/LPE
3	FRD/IBD im Frühstadium
7	FRD
8	IBD/LPE
9	FRD / IBD
10	IBD/LPE
11	V. a. alimentäres Lymphom / fortgeschrittene, therapieresistente IBD
12	IBD/LPE
13	unspezifisch-reaktiv / IBD
15	IBD/LPE
16	Eosinophile Enteritis
17	FRD
18	FRD
20	FRD
21	IBD/LPE
22	sekundäre Enteropathie
25	IBD/LPE
26	FRD
27	unspezifisch-reaktiv / FRD / IBD
28	IBD/LPE
30	FRD
32	FRD

FRD: Food-responsive Diarrhea; ARD: Antibiotic-responsive Diarrhea; IBD: Inflammatory Bowel Disease; LPE: Lymphoplasmazelluläre Enteritis; V.a.: Verdacht auf

4.13 Therapie

Die mittlere Verabreichungsdauer der am häufigsten verwendeten Arzneimittelgruppen pro Gruppe und Periode ist Tabelle 33 zu entnehmen:

Tab. 33: Anzahl der medikamentell behandelten Hunde und mittlere Verabreichungsdauer verschiedener Arzneimittelgruppen pro Gruppe und Periode

Arzneimittelgruppe	Periode	Anzahl an Tieren, die ein		Tagesanzahl in der betreffenden Periode	mittlere Verabreichungsdauer von Medikamenten der entsprechenden Gruppe in	
		Medikament der entsprechenden Gruppe in der Periode erhielten			Plazebogruppe	Probiotikagruppe
		Plazebogruppe	Probiotikagruppe			
Antibiotika	1	11	9	14	11,1	12,1
	2	10	9	16	13,0	12,8
	3	7	9	30	27,6	28,1
	4	8	10	30	25,4	18,5
Säureblocker	1	8	7	14	12,5	10,7
	2	8	7	16	13,5	16,0
	3	9	8	30	21,6	27,6
	4	8	5	30	25,1	26,4
Antiemetika	1	3	0	14	9,3	0,0
	2	1	2	16	4,0	9,5
	3	5	2	30	1,6	9,0
	4	2	2	30	17,5	1,0
Kortikosteroide	1	3	0	14	5,3	0,0
	2	3	0	16	15,3	0,0
	3	4	0	30	23,5	0,0
	4	4	0	30	23,3	0,0
NSAID	1	0	1	14	0	2
	2	2	0	16	4	0
	3	2	3	30	1,5	4,3
	4	1	0	30	9	0

Antibiotika: Metronidazol, Ciprofloxacin, Amoxicillin-Clavulansäure (Synulox[®]); **Säureblocker:** Ranitidin, Omeprazol; **Antiemetika:** Metoclopramid, Maropitant (Cerenia[®]); **Kortikosteroide:** Prednisolon; **Periode 1** = Untersuchungstage 1-14, **Periode 2** = Untersuchungstage 15-30, **Periode 3** = Untersuchungstage 31-60, **Periode 4** = Untersuchungstage 61-90

Die Hunde 6, 26, 31 und 32 erhielten im Studienverlauf keine Medikation. Ein Absetzen der Medikation bis zum 14. Studientag erfolgte bei den Hunden 16 und 23. Eine ausschließlich symptomatische Therapie erfolgte bei den Hunden 9 (Vitamin B, Carprofen) und 12 (Ranitidin, Etiderm[®]). Insgesamt erhielten vorübergehend oder kontinuierlich 22 Hunde Metronidazol, 3 Hunde Amoxicillin-Clavulansäure (Synulox[®]), ein Hund Ciprofloxacin, 4 Hunde Prednisolon, ein Hund Ciclosporin, 20 Hunde Ranitidin, 5 Hunde Omeprazol, ein Hund Sucralfat (Ulcogant[®]), 2 Hunde Psyllium (Pascomucil[®]), 3 Hunde Pankrex[®] (zur Förderung des Nahrungsaufschlusses bei Hunden mit Maldigestion/Malabsorption), ein Hund Lachsölkapseln (Viacutan[®]), 3 Hunde Butylscopolamin (Buscopan[®]), 6 Hunde Novaminsulfon, 2 Hunde Carprofen (Rimadyl[®]), ein Hund Phenylbutazon-Prednisolon (PhenPred[®]), 11 Hunde Metoclopramid, ein Hund Maropitant (Cerenia[®]), 6 Hunde Cobalamin und ein Hund Aktivkohle. Metronidazol wurde an allen Einrichtungen zur Therapie eingesetzt. Amoxicillin-Clavulansäure wurde nur in Berlin verabreicht (allerdings nicht zur IBD-Therapie, sondern vor Diagnosestellung wegen des Verdachts auf eine hämorrhagische Gastroenteritis oder zur postoperativen Versorgung nach der Entnahme von Vollschichtbiopsien), Ciclosporin, Sucralfat, Psyllium, Pankrex, Lachsölkapseln, Phenylbutazon-Prednisolon (zur Behandlung einer Arthrose), Maropitant, Cobalamin und Aktivkohle wurden nur in Berlin verwendet, Ciprofloxacin nur in Köln. Kortikosteroide wurden bei drei Berliner Hunden und einem Hund aus Köln verabreicht. Ranitidin, Omeprazol, Butylscopolamin, Novaminsulfon, Carprofen und Metoclopramid wurden in

Berlin und Köln als Therapeutikum eingesetzt. Die Aktivkohle wurde durch den Besitzer ohne die Aufforderung des behandelnden Tierarztes verabreicht. Die Medikamente wurden im angegebenen Dosierungsrahmen verabreicht, wobei die genaue Dosierung im Einzelfall anhand der Klinik individuell bestimmt wurde.

4.14 Molekularbiologische Untersuchung ausgewählter Bakterien in den Fäzes

4.14.1 Eubakterien

Die logarithmierten, eubakteriellen Zellzahlen wiesen zu Beginn und an Tag 30 der Studie keinen signifikanten Gruppenunterschied auf, jedoch zeigten die Hunde der Probiotikagruppe am 90. Studientag signifikant höhere Werte als die Hunde der Plazebogruppe ($p=0,03$) (siehe Abbildung 12). Während die Mittelwerte in der Plazebogruppe stets absanken, erreichten sie in der Probiotikagruppe nach einem Absinken am Tag 30 zum Abschluss der Studie fast wieder die Ausgangswerte. Es ergab sich in beiden Gruppen keine signifikante Änderung der Anzahl im Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Tieren, die eine Antibiose erhielten und solchen, die keine Antibiose erhielten.

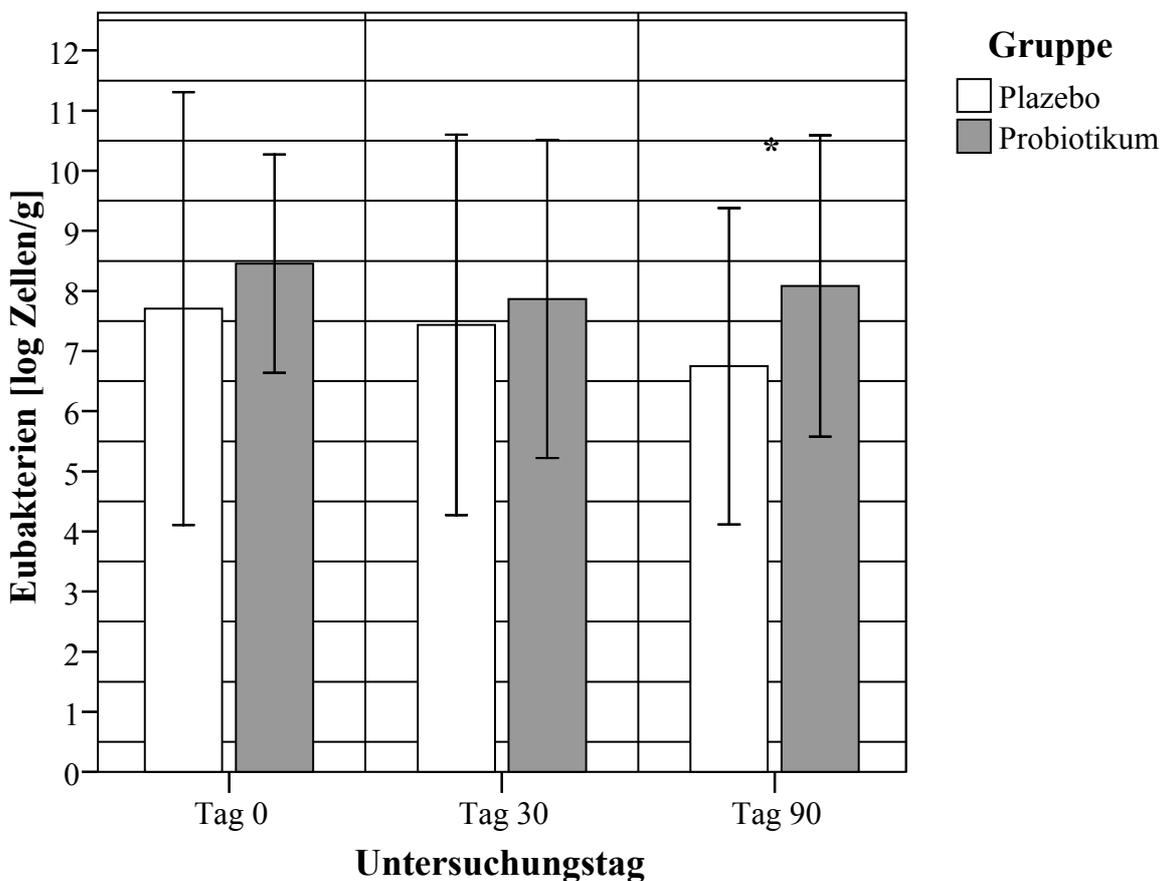


Abb. 12: Eubakterielle Zellzahlen [log Zellen/g] im Gruppenvergleich und Studienverlauf dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung
Das Symbol * zeigt einen signifikanten Gruppenunterschied ($p < 0,05$) an.

4.14.2 Clostridien

Clostridium leptum-Gruppe

Die Zellzahl von zur *Clostridium leptum*-Gruppe gehörenden Bakterien in den Fäzes zeigte zu keinem Zeitpunkt der Studie einen Gruppenunterschied. Es kam in beiden Gruppen zu einem Anstieg des Mittelwertes zum Abschluss der Studie im Vergleich zum Ausgangswert. Die Anzahl an Bakterien der *Clostridium leptum*-Gruppe zeigte sich in der Probiotikagruppe zum Abschluss der Studie als tendenziell höher als der Ausgangswert ($p = 0,055$). In der Placebogruppe war dies nicht der Fall (siehe Tabelle 34). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen Tieren, die eine Antibiose erhielten und solchen, die keine Antibiose erhielten.

Tab. 34: Mittlerer Gehalt an Bakterien der *Clostridium leptum*-Gruppe mit Standardabweichung in den Fäzes der Probanden pro Gruppe und Untersuchungstag

Gruppe Untersuchungstag	Plazebo		Probiotikum		Plazebo		Probiotikum	
	0		30		90		90	
logZellen/g ± Stabw	4,58 ± 2,46	4,86 ± 2,04	4,47 ± 2,78	5,53 ± 2,63	5,7 ± 2,75	6,71 ± 2,68		
n ^a	15	16	14	15	15	16		

Stabw = Standardabweichung; ^adie n-Zahlen geben die Anzahl an Proben an, die in die Berechnung zum jeweiligen Zeitpunkt eingegangen sind

Clostridium coccooides-Gruppe

Vor Beginn der Interventionen und am Tag 30 gibt es keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied in der Zahl der zur *Clostridium coccooides*-Gruppe gehörenden Bakterien in den Fäzes. Zum Abschluss wiesen jedoch die Tiere der Probiotikagruppe signifikant höhere Werte auf als die Tiere der Placebogruppe ($p = 0,031$). Während die Mittelwerte in der Probiotikagruppe stetig anstiegen, erreichten die Mittelwerte in der Placebogruppe am Tag 30 der Studie ihren Höchstwert und sanken dann wieder ab. Im Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte ergab sich, dass die Werte in der Probiotikagruppe signifikant angestiegen waren ($p = 0,032$), die Werte der Placebogruppe jedoch nicht (siehe Tabelle 35). Auch hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Tieren, die eine Antibiose erhielten und solchen, bei denen dies nicht der Fall war.

Tab. 35: Mittlerer Gehalt an Bakterien der *Clostridium coccooides*-Gruppe mit Standardabweichung in den Fäzes der Probanden pro Gruppe und Untersuchungstag

Gruppe Untersuchungstag	Plazebo		Probiotikum		Plazebo		Probiotikum	
	0		30		90		90	
logZellen/g ± Stabw	4,67 ± 1,95	5,25 ± 2,26	6,53 ± 2,51	5,39 ± 2,57	5,28 ± 2,08	6,96 ± 1,54		
n ^a	15	16	14	15	15	16		

Stabw = Standardabweichung; ^adie n-Zahlen geben die Anzahl an Proben an, die in die Berechnung zum jeweiligen Zeitpunkt eingegangen sind

4.14.3 Bifidobakterien

Die Anzahl an *Bifidobacterium* spp. in den Fäzes wies zu keinem Zeitpunkt der Studie einen statistisch signifikanten Gruppenunterschied auf, auch nicht im Hinblick darauf, ob die Tiere eine Antibiose erhielten oder nicht. Zum Abschluss zeigten die Hunde der Probiotikagruppe tendenziell höhere Werte als die Tiere der Plazebogruppe ($p = 0,064$). In der Plazebogruppe kam es zu einem deutlichen Abfall des Mittelwertes, während dieser in der Probiotikagruppe leicht anstieg. Beide Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied der Werte zum Abschluss der Studie im Vergleich zu den Ausgangswerten (siehe Abbildung 13).

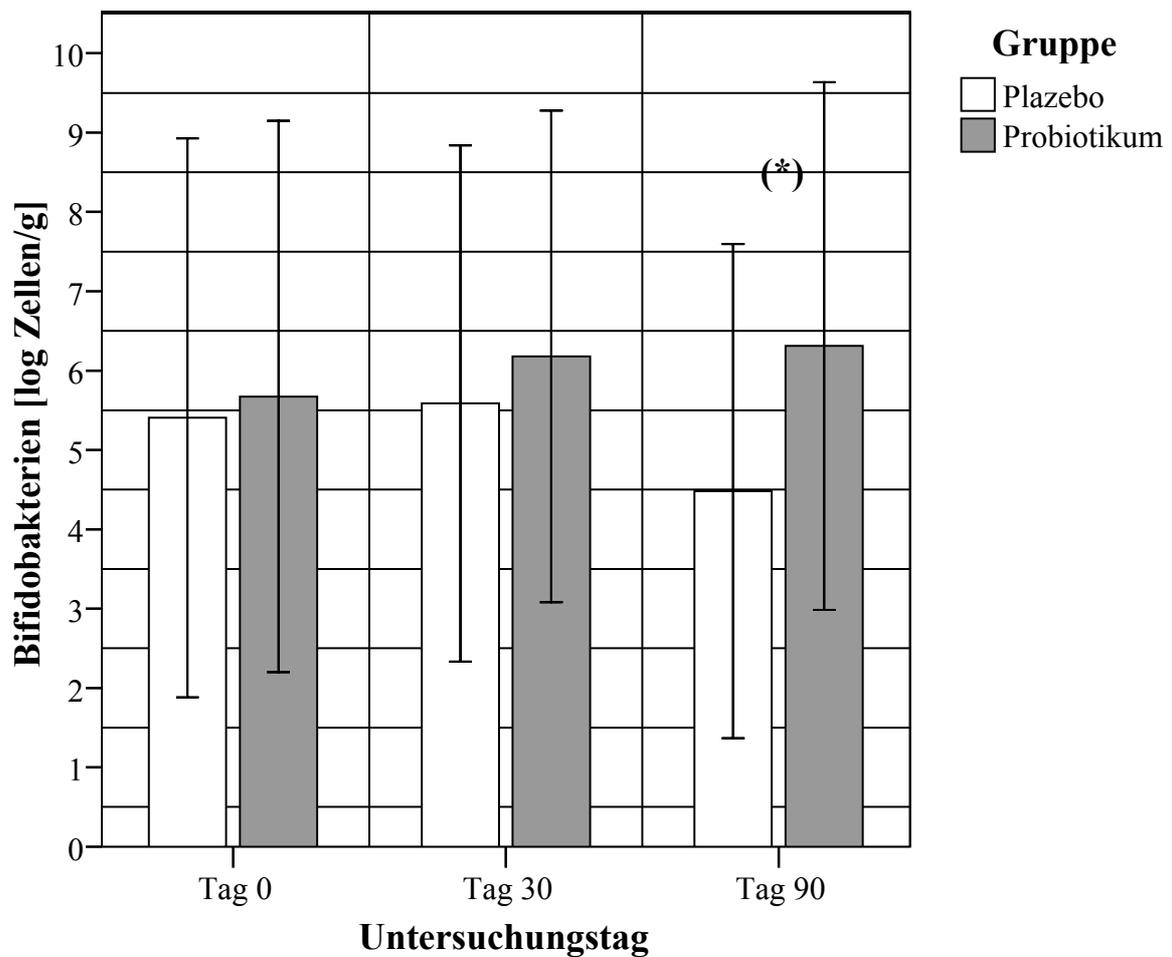


Abb. 13: Anzahl an *Bifidobacterium* spp. in den Fäzes [log Zellen/g] im Gruppenvergleich und Studienverlauf, dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung. Das Symbol (*) zeigt einen tendenziellen Gruppenunterschied ($p < 0,1$) an.

4.14.4 Laktobazillen

Die Anzahl an *Lactobacillus* spp. in den Fäzes zeigte zu keinem Zeitpunkt der Studie einen statistisch signifikanten Gruppenunterschied. Zu Beginn der Studie wiesen beide Gruppen identische Mittelwerte auf. Während es jedoch in der Probiotikagruppe zu einem stetigen Absinken des Mittelwertes kam, sank er in der Placebogruppe zunächst stark ab, um zum Abschluss der Studie die Werte der Probiotikagruppe zu überschreiten. Der Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte ergab in beiden Gruppen keine signifikante Änderung (siehe Tabelle 36). Zu Studienbeginn ergab sich ein signifikanter Unterschied der Anzahl an *Lactobacillus* spp. in den Fäzes der Tiere der Probiotikagruppe zwischen den Tieren, die eine Antibiose erhielten und solchen, die keine Antibiose erhielten. Die Anzahl an *Lactobacillus* spp. war bei Tieren, die keine Antibiose erhielten, signifikant höher ($p = 0,014$). Zum Abschluss der Studie war dies nicht mehr der Fall.

Tab. 36: Mittlerer Gehalt an Laktobazillen mit Standardabweichung in den Fäzes der Probanden pro Gruppe und Untersuchungstag

Gruppe Untersuchungstag	Plazebo		Probiotikum		Plazebo		Probiotikum	
	0		30		90		90	
logZellen/g ± Stabw	5,82 ± 1,76	5,82 ± 1,74	3,88 ± 1,63	5,28 ± 1,55	5,02 ± 1,56	4,82 ± 1,66		
n ^a	15	16	14	15	15	16		

Stabw = Standardabweichung; ^adie n-Zahlen geben die Anzahl an Proben an, die in die Berechnung zum jeweiligen Zeitpunkt eingegangen sind

4.14.5 Probiotikum-DNA

Zu Beginn der Studie konnte in keiner der Fäzesproben Probiotikum-DNA nachgewiesen werden. An den Tagen 30 und 90 wurde sie ausschließlich in den Proben der Probiotikagruppe gefunden. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich der DNA-Menge in den Fäzes aller Hunde der Probiotikagruppe zwischen den Untersuchungstagen 30 und 90 (siehe Tabelle 37). Beim Vergleich der Tiere der Probiotikagruppe, die kein oder nur anfänglich ein Antibiotikum erhielten, mit solchen, die eines erhielten, ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Tab. 37: Probiotikum-DNA-Gehalt in den Fäzes [ng/g] der Probiotikagruppe an Tag 30 und Tag 90 der Studie aller Tiere und derer, die keine Antibiose erhielten

	Probiotikum (alle Tiere)		Probiotikum (ohne Antibiose)	
	Tag 30	Tag 90	Tag 30	Tag 90
Median	3,16 ^a (0,7-45,5)	7,5 (1,1-1390)	6,7 (0,7-14,3)	21,0 (1,1-1390)
n ^b	15	16	8	9

^a: Median (Minimum-Maximum); ^bdie n-Zahlen geben die Anzahl an Fällen an, die in die Berechnung eingingen

5 Diskussion

5.1 Diskussion des Versuchsaufbaus

Die Arbeit diente der Überprüfung des Effekts von *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 auf klinische, verdauungsphysiologische und immunologische Parameter und selektive Aspekte der Mikrobiologie des Gastrointestinaltraktes von Hunden, die an einer chronischen Enteropathie litten.

Bei der Studie handelte es sich um eine doppelblinde, plazebokontrollierte Interventionsstudie. Die Patienten wurden an drei verschiedenen Einrichtungen rekrutiert, zwischen denen die Methodik abgestimmt worden war, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Der Untersuchungszeitraum wurde in dieser Untersuchung ausreichend lang gewählt, da es sich hier um eine Erkrankung handelt, die durch eine rezidivierende Symptomatik gekennzeichnet ist und deren Symptom- und Remissionszeiträume individuell sehr unterschiedlich sind. Die Wahl eines Untersuchungszeitraumes von drei Monaten erscheint in dieser Untersuchung grundsätzlich als adäquat. Dennoch konnte der Krankheitsverlauf vieler Tiere nicht sicher beurteilt werden, da zu Studienbeginn zu viele Rahmenbedingungen verändert wurden (neue Diät, Medikation), wodurch sich der Krankheitsverlauf häufig anders verhielt als zunächst vermutet. Tiere, die anamnestisch einen Krankheitsverlauf aufwiesen, dessen Verhalten innerhalb von drei Monaten hätte beurteilt werden können (Remissionszeiten < 3 Monate), kamen vermutlich durch die Verabreichung einer Medikation und/oder einer Diät in eine länger als drei Monate währende Remission. Der vollständige Verzicht auf eine medikamentelle Therapie ist aus verschiedenen Gründen nicht möglich gewesen. Zur besseren Beurteilung des Krankheitsgeschehens hätte daher nur der Start der Studie auf einen Zeitpunkt verschoben werden können, zu dem klar ist, ob das Tier durch die Medikation/Diät in eine längerwährende Remission kommt oder ob der Krankheitsverlauf weiterhin beurteilbar bleibt. Da es aber bei weniger schwer betroffenen Tieren wahrscheinlicher ist, dass sie durch die medikamentelle Therapie in eine langanhaltende Remission kommen, hätte die Untersuchungen dann vermutlich nur weniger gut auf die Therapie ansprechende Tiere berücksichtigt. Dies hätte die Rekrutierung der notwendigen Patientenzahl deutlich erschwert und den Studienzeitraum verlängert.

Die Wahl von mehr als einer untersuchenden Einrichtung ist dadurch erklärbar, dass in einem adäquaten Zeitraum eine statistisch auswertbare Tierzahl rekrutiert werden sollte und eine homogenere Studienpopulation erreicht werden sollte. Bei mehreren beteiligten Einrichtungen ist eine Vereinheitlichung des Ablaufs besonders wichtig und schwierig, was sich in dieser Untersuchung unter anderem in der uneinheitlichen Erfassung der Parameter aus den Fragebögen und der Anamneseerhebung zeigte. Eine Verkürzung des Studienprotokolls mit der Reduktion der zu erhebenden Parameter hätte den Ablauf vereinheitlicht und damit zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse beigetragen.

Die Einteilung der Probanden in die Probiotika- bzw. Plazebogruppe erfolgte randomisiert mittels einer Zufallsliste, um eine möglichst homogene Verteilung der Tiere in den Versuchsgruppen zu erreichen und Einflussfaktoren durch den Einteilenden auszuschließen. Durch diese Art der Gruppeneinteilung kam es zufällig zu einer unterschiedlichen Gewichtung der Erkrankungsgrade in den beiden Gruppen, da bei der Einteilung die Erkrankungsgrade der Tiere nicht berücksichtigt wurden. So wiesen die Hunde der Probiotikagruppe zu Beginn der Studie signifikant höhere Erkrankungsgrade (erkennbar durch einen höheren CIBDAI-Wert) auf als die Hunde der Plazebogruppe. Eine Einteilung unter Berücksichtigung des CIBDAI-Wertes hätte hier Abhilfe geschaffen.

Zudem wurde nicht berücksichtigt, in welchem Erkrankungsstadium sich die Tiere befanden. Je nachdem, ob sich ein Tier in Remission befindet oder unter einer aktiven chronischen Enteropathie leidet, ändert sich die Indikation des Einsatzes eines Probiotikums. Bei Tieren, die sich in Remission befinden, stellt sich die Frage, ob das betreffende Präparat die Remission verlängern kann, bei einer aktiven Enteropathie, ob es die klinischen Symptome

beeinflusst und eventuell schneller eine Remission herbeiführt. Zudem kann der Effekt eines Probiotikums davon abhängen, in welchem Erkrankungsstadium es eingesetzt wird (Moon et al. 2004). Da das in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurde, ermöglicht die Verteilung der Patienten auf die Gruppen und deren Zahl nicht den Vergleich der Gruppen innerhalb eines Erkrankungsstadiums. Daher kann die Frage, ob durch das eingesetzte *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 eine Remission schneller herbeigeführt oder eine bestehende Remission verlängert wird, nicht zweifelsfrei beantwortet werden.

Bei der randomisierten Aufteilung der Patienten auf die Gruppen kam es außerdem zu einer zufälligen Gewichtung der betroffenen Darmabschnitte. So wiesen 7 Hunde der Placebogruppe klinisch ausschließlich eine Dünndarmentzündung auf. In der Probiotikagruppe traf dies auf kein Tier zu. Das Auftreten bestimmter Symptome wie z. B. das von Flatulenzen ist jedoch abhängig vom betroffenen Darmabschnitt. Um eine vergleichbare Aussage dieser Parameter in Versuchs- und Kontrollgruppe zu erzielen, wäre in zukünftigen Untersuchungen eine Berücksichtigung des Darmabschnitts bei der Gruppeneinteilung sinnvoll. Da aber, wie weiter unten ausgeführt, große Schwankungen im Auftreten der verschiedenen Symptome bestehen, ist es fraglich, ob dies zu einer klareren Aussage verholfen hätte. Zudem hätte es das Studiendesign weiter verkompliziert.

Die Entwicklung der Tiere wurde über einen Zeitraum von 90 Tagen beobachtet und mithilfe klinischer, molekularbiologischer und immunologischer Parameter dokumentiert. Die klinischen Parameter der Tagebücher und Fragebögen waren einem subjektiven Einfluss durch den Besitzer unterworfen, da jedes Tier von einer anderen Person beurteilt wurde. Dies wäre nur durch eine Haltung der Tiere in einer Versuchstiereinrichtung und die Beurteilung durch eine Einzelperson zu umgehen gewesen. Mit Hunden aus Privathaushalten ist das praktisch nicht durchführbar. Die Tagebücher bieten auf der anderen Seite einen sehr genauen Einblick in den Krankheitsverlauf der Tiere und stellen so eine wertvolle Datenquelle für diese Studie dar.

Die Untersuchung molekularbiologischer Daten ermöglicht die Beurteilung des Einflusses von Probiotika auf die Darmmikrobiota. Da eine Veränderung der Darmmikrobiota in der Ätiologie einer chronischen Enteropathie diskutiert wird, ist ein möglicher Effekt von Probiotika ein interessanter Gesichtspunkt.

Die Untersuchung der immunologischen Parameter im Blut wurde als sinnvoll angesehen, da in vorangegangenen Untersuchungen bereits ein Einfluss von Probiotika auf diese Parameter festgestellt wurde und eine Regulation eines fehlgesteuerten Immunsystems in der Therapie hilfreich wäre. Da die immunologisch bedingten pathophysiologischen Abläufe bei einer chronischen Enteropathie jedoch vorrangig das GALT betreffen, wäre eine Untersuchung dieser Parameter in Darmbiopsien zu Beginn und zum Abschluss der Studie aussagekräftiger gewesen. Dies war in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht möglich, da kein Besitzer in eine zweite, aus rein wissenschaftlichen Gründen durchgeführte Endoskopie mit Probenentnahme einwilligte und so kein Vergleich zwischen Darmbiopsien vor und nach der Intervention möglich war.

Generell ist die Untersuchung einer so komplexen und heterogenen Erkrankung schwierig. Sinnvoll wäre sicherlich, die verschiedenen Formen einer chronischen Enteropathie (FRD, ARD, IBD) separat zu behandeln, in „aktive chronische Enteropathie (CE)“ und „Remission“ zu unterteilen und die Ergebnisse anschließend untereinander zu vergleichen. Der Nachteil einer solchen Vorgehensweise liegt in der Zeit, die nötig ist, um eine ausreichende Anzahl an Patienten mit einer bestimmten CE-Form in einem bestimmten Stadium der Erkrankung zu rekrutieren.

5.2 Diskussion der Methoden

Eine vollständige Übereinstimmung der Methodik zwischen den drei beteiligten Einrichtungen konnte nicht erreicht werden. Die Parameter der Fragebögen wurden in einer der drei Einrichtungen gar nicht, in einer anderen nur zu Beginn der Studie erhoben. Es gibt

aber eine vollständige Anzahl an Fragebögen für 10 Tiere aus beiden Gruppen und auch die nur von einzelnen Versuchstagen vorliegenden Fragebögen erwiesen sich als auswertbar und vergleichbar. Die Tagebücher wurden bis auf wenige Ausnahmen zuverlässig ausgefüllt. Die Beurteilung bzw. Erhebung der Parameter der Tagebücher und Fragebögen erfolgte mit Ausnahme von Body Condition Score und Körpermasse subjektiv durch den Besitzer (siehe auch 5.3.1, 5.3.2). Die Bewertung der Kotkonsistenz wurde mithilfe von Fotos in den Tagebüchern vereinfacht und so weitestgehend vereinheitlicht (De Lorenzi et al. 2006). Die Anamneseerhebung erfolgte an den verschiedenen Einrichtungen unterschiedlich und teilweise unregelmäßig, ebenso wie die klinische Untersuchung. Die Anamnese vor Studienbeginn wurde aber für jedes Einzeltier erhoben und der Krankheitsverlauf war für jedes Tier durch andere Parameter wie beispielsweise den CIBDAI zu verfolgen.

5.2.1 Fütterung und Haltung

Die Hunde verblieben im gesamten Studienzeitraum bei ihren Besitzern und erhielten ein standardisiertes Diätfutter. Da der mögliche Effekt des Probiotikums unter praxisnahen Bedingungen getestet werden sollte, wurde die Haltung der Tiere nicht vereinheitlicht, obwohl es durch unterschiedliche Haltungsformen möglicherweise zu Veränderungen der Mikrobiota und der Verteilung und Lokalisation der Mikroorganismen im Gastrointestinaltrakt kommt (Davis et al. 1977). Eine Vereinheitlichung der Haltung hätte nur durch Hospitalisierung erreicht werden können, was sich möglicherweise negativ auf das Krankheitsgeschehen ausgewirkt hätte (siehe 5.1). Zu Beginn der Studie wurde das Futter von den meisten Tieren gut akzeptiert, die Akzeptanz nahm jedoch im Studienverlauf häufig dramatisch ab, was zu acht Studienabbrüchen führte. Die Abbrüche erfolgten meistens noch innerhalb der ersten 14 Studientage. Diese Tiere wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Eine alleinige Aufnahme des Versuchsfutters wurde angestrebt, konnte daher jedoch nicht in jedem Fall gewährleistet werden. Häufig kam es zur unkontrollierten Aufnahme verschiedener Substanzen während der Spaziergänge, durch die Haltung mehrerer Hunde im Haushalt oder durch die Verabreichung von Medikamenten mithilfe von Geschmacksträgern. Ein Einfluss der Diät auf die Zusammensetzung der Mikrobiota wurde bereits in mehreren Untersuchungen nachgewiesen (Williams Smith 1965; Amtsberg et al. 1979; Leimer 1981; Zentek 1995; Van der Steen et al. 1997). Eine Änderung der Zusammensetzung der Mikrobiota durch die Aufnahme kleiner Mengen fremder Substanzen ist eher unwahrscheinlich. Zudem wurden die Besitzer angehalten, diesen Einfluss möglichst auszuschließen. Möglich ist aber ein Einfluss auf das Krankheitsgeschehen durch die Aufnahme von Substanzen, auf die das Tier eine klinische Symptomatik zeigt. So reagierte Hund 13 auf die Aufnahme von Pferdefäzes mit Durchfall. Ebenso Hund 24, der nach Wechsel der Diät am 75. Tag der Studie Durchfall, Erbrechen und Juckreiz zeigte. Der Futterwechsel fand nur bei diesem Tier vor Beendigung der Studie statt, da die Besitzerin zu diesem Zeitpunkt die Studie abbrach. Die Daten des Hundes, die danach erfasst wurden, wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen.

5.2.2 Probiotikum/Plazebo

Die Hunde der Probiotikagruppe erhielten 2x täglich im gesamten Studienzeitraum ein Supplement mit dem aus dem kaninen Gastrointestinaltrakt isolierten *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 in einer Dosierung von $2,35 \times 10^9$ KBE (Spanne $1,85-3,20 \times 10^9$) pro Supplement. Die Dosierung eines probiotischen Futterzusatzes spielt keine unerhebliche Rolle, da der Effekt eines Probiotikums nachgewiesenermaßen dosisabhängig ist. So ist beispielsweise die Laktatbildung bei Hunden und die Antikörperproduktion bei Hühnern dosisabhängig (Molitor 1996; Koenen et al. 2004). Die Dosierung der vorliegenden Untersuchung entspricht in etwa der Dosierung der einzigen der Autorin bekannten Untersuchung über den Einsatz von Bifidobakterien beim Hund (Kogure et al. 1976). Die Tiere, die an einer akuten oder chronischen Diarrhoe litten, erhielten dort $1,13 \times 10^8$ lebende

Zellen/kg KM/Tag einer Zubereitung aus *Bifidobacterium pseudolongum*. In humanmedizinischen Untersuchungen wurden geringere Mengen an Bifidobakterien konsumiert (10^8 KbE/Tag bzw. 10^9 KbE/Tag) (Ishikawa et al. 2003; Kato et al. 2004; Laake et al. 2005). Andere probiotische Stämme beim Hund wurden in höheren Konzentrationen verabreicht. Die Dosierungen lagen zwischen 10^6 und $9,2 \times 10^9$ KbE/g Futter (Molitor 1996; Vahjen und Männer 2003). Je nach Futterraufnahme des jeweiligen Tieres lag damit die tägliche Aufnahme deutlich höher als in der eigenen Untersuchung. Da das Probiotikum aber während der Untersuchung in den Fäzes der Hunde der Probiotikagruppe nachweisbar war, lässt sich also annehmen, dass das Probiotikum in einer Menge verabreicht wurde, die seine Koexistenz neben der anderen Mikrobiota ermöglichte.

Die Lagerung des Probiotikums beim Besitzer erfolgte nach den Angaben des Herstellers in einem verdunkelten, fest verschließbaren Röhrchen. Dieses wurde an einem kühlen Ort ohne direkte Sonneneinstrahlung aufbewahrt. Eine Aufbewahrung im Kühlschrank wurde von Hersteller als möglich angegeben. Die Lagerung war ordnungsgemäß und die Verabreichung erfolgte zuverlässig, da das Bifidobakterium in allen Fäzesproben der Tage 30 und 90 der Hunde der Probiotikagruppe – und nur dort – nachgewiesen werden konnte.

5.2.3 Signalement

Fast alle aufgenommenen Tiere entsprachen den Einschlusskriterien. Es wurde allerdings ein Hund mit einer bekannten exokrinen Pankreasinsuffizienz rekrutiert, als sich bei der histopathologischen Untersuchung von Schleimhautbiopsien herausstellte, dass dieser nun zusätzlich auch eine chronische Enteropathie (IBD/LPE) entwickelt hatte. Bei der Aufnahme der Patienten wurden weder die Rasse noch Alter oder Geschlecht berücksichtigt. Die Geschlechterverteilung der gesamten Studienpopulation war mit 18 männlichen Tieren und 14 weiblichen Tieren relativ ausgeglichen, doch gab es in der Placebogruppe deutlich mehr männliche ($n = 11$) als weibliche ($n = 5$) Tiere. In der Probiotikagruppe war das Geschlechterverhältnis mit 7 männlichen und 9 weiblichen Tieren ausgeglichener. Das ausgeglichene Geschlechterverhältnis stimmt mit Angaben in der Literatur überein, wonach es keine Geschlechtsprädisposition für chronische Enteropathien gibt (Hall und German 2005b). Im Mittel traten die ersten Symptome aller Studientiere im Alter von $3 \pm 3,4$ Jahren auf. Die Hunde der Placebogruppe zeigten die ersten Symptome im Mittel im Alter von $2,6 \pm 2,8$ Jahren, die Hunde der Probiotikagruppe im Alter von $3,3 \pm 3,8$ Jahren, damit war das Alter beim Auftreten der ersten Symptome in beiden Gruppen vergleichbar. Das Alter der Probanden zu Studienbeginn lag im Durchschnitt bei $4,0 \pm 3,4$ Jahren. Die Tiere der Placebogruppe waren $3,7 \pm 3,3$ Jahre alt, die Hunde der Probiotikagruppe $4,3 \pm 3,6$ Jahre alt. Somit war auch das Alter zu Studienbeginn in den beiden Gruppen ähnlich.

Unter den Rassen der betroffenen Tiere gab es einige, die mehrfach vertreten waren (Golden Retriever, Boxer, West Highland White Terrier, Labrador Retriever, Rottweiler). Für Rottweiler, Boxer und West Highland White Terrier sind Rasseprädispositionen beschrieben (Guilford 1996; Allenspach et al. 2007), für die anderen in der eigenen Untersuchung mehrfach betroffenen Rassen wird eine Prädisposition bisher nicht diskutiert. Golden Retriever und Labrador Retriever sind in Deutschland jedoch sehr häufig, wodurch diese Beobachtung erklärt werden könnte. Insgesamt handelte es sich beim Rassenspektrum um eine sehr heterogene Gruppe.

Die Körpermasse der Probanden war in beiden Gruppen ähnlich verteilt. Im Median lag sie bei 28,3 kg, es handelte sich somit um Hunde mittlerer bis größerer Rassen.

5.2.4 Anamnese

Die Ursache der Erkrankung blieb erwartungsgemäß ungeklärt. Bei zwei Hunden kann jedoch ein Auslöser in Betracht gezogen werden: Hund 6 litt vor Studienbeginn unter einer Giardiose, die beim Menschen zu einer Dysfunktion der epithelialen Darmbarriere und einer erhöhten epithelialen Apoptose führt (Troeger et al. 2007). Da in der Ätiologie einer

chronischen Enteropathie gestörte Barrierefunktionen diskutiert werden, könnte die Giardiose möglicherweise zum Ausbruch der Erkrankung beigetragen haben. Unklar bleibt jedoch, ob der Darm bereits durch eine subklinische chronische Enteropathie vorgeschädigt war und so eine Infektion der Giardien begünstigte oder ob die Giardien den Darm vorschädigten und so eine chronische Enteropathie begünstigten.

Hund 21 war bereits seit einem Alter von 1,5 Jahren bekannter Pankreasinsuffizienzpatient und wies eine häufig damit einhergehende Hypocobalaminämie auf. Eine Hypocobalaminämie kann beim Menschen zur Infiltration des Darmes mit Entzündungszellen und zu Villusatrophie führen (Arvanitakis 1978). Auch für den Hund gibt es Hinweise darauf (Williams et al. 1987; Morgan und McConnell 1999). Der Cobalaminmangel könnte also in diesem Fall zur Entstehung der Symptomatik beigetragen haben.

Eine chronische Enteropathie kann klinisch auf das Bild einer Dünndarmerkrankung, einer Dickdarmerkrankung oder auf eine Beteiligung beider Darmabschnitte hinweisen. Bei der Gegenüberstellung der erhobenen Symptome der untersuchten Studientiere mit Literaturangaben zeigten sich sowohl zwischen den einzelnen Literaturstellen als auch im Vergleich mit den eigenen Befunden einige Unterschiede. So zeigten die Tiere in einer Untersuchung häufiger eine Dünndarmsymptomatik (42,9 % der Tiere) oder eine Dickdarmsymptomatik (37,1 % der Tiere) als eine gemischte Symptomatik (20 % der Tiere) (Allenspach et al. 2007). Auch Suter (2006) bezeichnet eine Enterokolitis als „selten“, während in einer anderen Untersuchung eine Dickdarmsymptomatik nie auftrat. Eine Dünndarmsymptomatik und eine gemischte Symptomatik traten dort etwa in gleichem Ausmaß auf (52,4 % und 47,6 % der Tiere) (Münster et al. 2006). In der eigenen Untersuchung wiederum trat eine gemischte Symptomatik am häufigsten auf (71,9 % der Tiere), gefolgt von einer Dünndarmsymptomatik (21,9 % der Tiere). Eine Dickdarmsymptomatik war auch hier sehr selten (6,3 % der Tiere).

Angaben über die Häufigkeit verschiedener Symptome einer chronischen Enteropathie wurden bisher eher selten publiziert. Das Fressen von Gras ist beim Hund als Symptom einer chronischen Enteropathie bekannt (Hall und German 2005b) und trat bei den Hunden 14, 19, 22 und 23 auf. Die absolute Häufigkeit der Symptome Hämatochezie, mukoide Fäzes, Bauchschmerzen, Unbehagen und Tenesmus wurde bisher in keiner publizierten Untersuchung erfasst. Autoren, die Angaben zur Häufigkeit verschiedener Symptome machten, untersuchten Hunde mit einer lymphoplasmazellulären Enteritis bzw. zusätzlich mit einer lymphoplasmazellulären Enterokolitis (Münster et al. 2006; Garcia-Sancho et al. 2007) oder Hunde mit einer Tylosin-responsiven Diarrhea, die als Unterform einer Antibiotika-responsiven Diarrhoe verstanden wird (Westermarck et al. 2005a). Das Auftreten einer reduzierten Aktivität erwies sich trotz derselben Form einer chronischen Enteropathie und vergleichbarer Größe der Studienpopulationen (16 vs. 21 Tiere) in den Untersuchungen von Garcia-Sancho et al. (2007) und Münster et al. (2006) als unterschiedlich (81,0 % vs. 69 %). In der eigenen Untersuchung trat eine reduzierte Aktivität bei 37,5 % der Tiere und damit deutlich seltener auf. Dieser Unterschied könnte mit der heterogeneren Studienpopulation der eigenen Untersuchung zu erklären sein, da hier alle Formen einer chronischen Enteropathie berücksichtigt wurden.

Die Tiere wiesen in akuten Phasen häufig eine reduzierte Aktivität und/oder Unbehagen auf, zeigten aber in keinem Fall Fieber, was sich mit den Literaturangaben deckt (Guilford 1996; Jergens 1999).

Ähnlich unterschiedlich, wie auch beim Auftreten einer veränderten Aktivität, verhielt es sich bei der Häufigkeit des Auftretens eines reduzierten Appetits. Während hier die Ergebnisse der Untersuchung von Garcia-Sancho et al. (2007) und der eigenen vergleichbar sind (69 % und 63 %), weichen die Ergebnisse von Münster et al. (2006) (42,9 %) ab. Ein reduzierter Appetit kann durch Bauchschmerzen hervorgerufen werden, die wiederum oft mit einer

Dünndarmerkrankung assoziiert sind. Allerdings zeigten alle Patienten der Untersuchung, in der das Symptom am seltensten auftrat, eine Dünndarmbeteiligung.

Bei dem Symptom Erbrechen scheint die Häufigkeit von der Form der chronischen Enteropathie beeinflusst zu sein. Während Münster et al. (2006) und Garcia-Sancho et al. (2007) vergleichbare Ergebnisse erzielten (76 % und 88 %), weichen die Ergebnisse von Westermarck et al. (2005a) deutlich ab (43 %). In der eigenen Untersuchung trat das Symptom bei 63 % der Tiere auf und liegt somit zwischen den Daten zu LPE und TRD. Dies könnte damit zusammenhängen, dass hier beide Gruppen berücksichtigt wurden.

Die Häufigkeit einer veränderten Kotkonsistenz wird vermutlich von den Einschlusskriterien für die Tiere der jeweiligen Studie beeinflusst. Münster et al. (2006) und Garcia-Sancho et al. (2007) erzielten unterschiedliche Resultate, obwohl hier die Voraussetzung eine LPE bzw. zusätzlich eine LPC darstellte (90 % vs. 69 %). In der Untersuchung von Westermarck et al. (2005a) wurde nur die Häufigkeit wässriger, mukoider oder blutiger Fäzes oder einer Kombination daraus berücksichtigt, der Anteil betroffener Tiere lag somit mit 64 % eher niedrig.

Ähnlich verhielt es sich bei der Häufigkeit einer erhöhten Kotabsatzfrequenz, die in der eigenen Untersuchung bei allen Patienten vorlag. Bei Münster et al. (2006) zeigte ein vergleichbar hoher Prozentsatz der Hunde dieses Symptom (90 %), während es in der Studie von Westermarck et al. (2005a) in 71 % der Fälle auftrat.

Vergleichbare Studienergebnisse wurden bei den Symptomen Verlust von Körpermasse, Borborygmus und Flatulenz erzielt. In der eigenen Untersuchung traten diese Symptome in 65 % und jeweils 59 % der Fälle auf, bei anderen Autoren in 71 % (Münster et al. 2006), 57 % und 64 % der Fälle (Westermarck et al. 2005a). Das Auftreten dieser Symptome ist oft mit einer Dünndarmerkrankung assoziiert. Der Vergleich mit der vorliegenden Literatur unterstreicht, dass die Erkrankung und das Krankheitsbild mit erheblichen Variationen auftreten. Daraus folgt auch, dass ein möglicher Einfluss eines Probiotikums auf die klinischen Symptome wegen der großen Variationsbreite *per se* schwer zu beurteilen ist.

5.2.5 Klinische Allgemeinuntersuchung

Die Tiere wiesen bei der klinischen Allgemeinuntersuchung in der Regel ein ungestörtes Allgemeinbefinden auf. Dies stimmt mit den Befunden anderer Autoren überein, die den Einfluss eines Probiotikums auf das Allgemeinbefinden untersuchten (Benyacoub et al. 2003; Marcinakova et al. 2006).

Aufgrund einer Entzündung, aber auch aufgrund eines alimentären Lymphoms kann es zu einer Verdickung der Darmwände kommen (Guilford 1996; Nelson 2010). Bei Hund 10 und 28 fielen bei der Palpation des Abdomens zu Studienbeginn verdickte Darmschlingen auf. Bei Hund 10 war außerdem eine Umfangsvermehrung im Abdomen tastbar, deren Charakter und Zusammenhang mit der Symptomatik jedoch ungeklärt blieb. Neoplasien im Darmbereich können ebenfalls zu Durchfall führen und so eine mögliche Differentialdiagnose darstellen (Nelson 2010). Die histologische Untersuchung der Schleimhautbiopsien dieses Tieres ergab jedoch keinen Anhaltspunkt für Malignität, sondern sprach für das Vorliegen einer IBD/LPE.

Darmgeräusche, die bei zwei Tieren bei der Palpation festgestellt wurden (Hund 13 und 28), sind auf Gasansammlungen im Darmkanal zurückzuführen. Diese sind bakterieller Herkunft oder auch durch Aerophagie bedingt (Guilford 1994b). Größere Gasmengen im Lumen sind Ausdruck einer Enteritis (Kealy 1991). Möglicherweise litten die betroffenen Tiere unter einer bakteriellen Überbesiedlung des Dünndarms, was zu einer vermehrten Produktion von Gas geführt haben könnte. Ein Indiz hierfür ist die Remission durch eine Antibiotikatherapie bei Hund 28 mit sofortigem Rezidiv nach dem Absetzen des Medikaments.

Perianale Fisteln, wie Hund 20 sie aufwies, stellen beim Menschen eine bekannte Manifestation einer Kolitis dar (Rankin et al. 1979; Iesalnieks et al. 2009) und auch beim Hund – speziell beim Deutschen Schäferhund (DSH) – gibt es darauf Hinweise (Harkin et al.

1996; Misseghers et al. 2000). Sie könnten also ein Symptom der chronischen Enteropathie dieses Tieres darstellen, da es sich bei dem betroffenen Tier um einen DSH handelte.

5.2.6 Arzneimitteltherapie

Ziel war es, die Arzneimitteltherapie bis zum 14. Tag der Studie abzusetzen, doch dies war nicht immer vertretbar, weshalb mögliche Effekte des Probiotikums durch die Arzneimittelwirkungen überdeckt sein könnten. Die Verabreichung der Antibiotika und der Säureblocker war in Dauer und Anzahl der Tiere in den beiden Gruppen vergleichbar. Antiemetika wurden in Periode 1 und Periode 4 häufiger bei den Hunden der Plazebogruppe eingesetzt, in Periode 2 und Periode 3 bei den Hunden der Probiotikagruppe. Kortikosteroide wurden ausschließlich in der Plazebogruppe eingesetzt. Die Verabreichung nichtsteroidaler Antiphlogistika erfolgte selten, aber unterschiedlich in den beiden Gruppen und den Perioden. Die Verabreichung der Antibiotika in den beiden Gruppen ermöglicht eine Aussage über den Effekt des Probiotikums, da beide Gruppen dieselben Voraussetzungen hatten. Laut Miller und Finegold (1967), Matteuzzi et al. (1983) und Charteris et al. (1998) sind Bifidobakterien gegen das am häufigsten eingesetzte Metronidazol resistent. Da der Effekt eines Probiotikums vermutlich durch seinen Einfluss auf andere Keimgruppen und die Lebensbedingungen im Gastrointestinaltrakt erklärbar ist, ist die mögliche Interaktion mit dem Antibiotikum letztlich unklar. Für Tetrazykline wird angenommen, dass diese ihre Effekte auch durch immunmodulatorische Eigenschaften ausüben (Amin et al. 1996; Attur et al. 1999; Patel et al. 1999). Dieses könnte auch für Metronidazol der Fall sein und so selbst eine Beeinflussung des Immunsystems herbeigeführt haben (Bahr und Ullmann 1983).

Die unterschiedliche Verabreichung der Kortikosteroide in den beiden Gruppen muss bei der Interpretation berücksichtigt werden und erschwert die Vergleichbarkeit. Bei den Hunden, die Kortikosteroide erhielten, handelte es sich um die Tiere 3, 8, 11 und 15, die sich alle in der Plazebogruppe befanden. Hund 3 erhielt das Kortikosteroid Prednisolon ab dem 13. Tag der Studie, da er nach einer anfänglichen Besserung einen Rückfall erlitten hatte. Da außerdem der histologische Befund eine chronische Enteropathie unterstützte, war ein Kortikosteroid indiziert. Hund 8 erhielt das Prednisolon ab dem 14. Tag der Studie, da er eine bis dahin nicht therapierbare chronische Enteropathie gezeigt hatte. Die histologische Untersuchung ergab zudem Befunde, die am ehesten auf eine IBD/LPE hinwiesen. Hund 15 erhielt schon vor Studienbeginn Prednisolon, da durch die vorangegangene antibiotische Therapie keine Besserung erzielt werden konnte und die Befunde der histologischen Untersuchung den Verdacht einer IBD/LPE unterstützten. Es war nicht möglich, das Medikament im Studienverlauf abzusetzen. Die Tatsache, dass es sich bei den Tieren, bei denen ein Einsatz von Kortikosteroiden im Studienverlauf notwendig war, ausschließlich um Tiere der Plazebogruppe handelte, obwohl die Tiere der Plazebogruppe zu Beginn der Studie häufig weniger stark betroffen waren als die Tiere der Probiotikagruppe, könnte bedeuten, dass der Einsatz von *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 die Notwendigkeit des Einsatzes eines Kortikosteroids reduziert hat. Dies müsste jedoch durch weitere Untersuchungen mit spezifischer ausgerichtetem Studiendesign belegt werden. Da die Kortikosteroide nur in der Plazebogruppe verabreicht wurden, könnte sich der Gruppenunterschied weniger deutlich darstellen, als es ohne die Kortikosteroide der Fall gewesen wäre. Bei den Tieren der Plazebogruppe, die Kortikosteroide erhielten, handelte es sich nicht um die am schwersten betroffenen Tiere der Gruppe. Die Hunde 3 und 8 wiesen zu Studienbeginn einen mittleren Grad an klinischen Symptomen auf, Hund 15 einen milden Grad an klinischen Symptomen.

5.2.7 Ausschlussdiagnostik

Ziel der Ausschlussdiagnostik war es festzustellen, ob andere Erkrankungen vorlagen, die die Symptomatik einer chronischen Enteropathie bedingten. Wäre dies der Fall gewesen, hätten die betreffenden Tiere zu diesem Zeitpunkt aus der Studie ausgeschlossen worden. Außerdem sollten es diese Untersuchungen ermöglichen, die Krankheitsbilder und -stadien sowie den

Krankheitsverlauf der einzelnen Hunde zu beurteilen. Manche Daten wurden für einen Gruppenvergleich herangezogen, wenn dieser sinnvoll erschien. Dies geschah entweder mit den zu Studienbeginn erhobenen Daten, um die gleichmäßige Verteilung der Hunde auf die Gruppen einzuschätzen (Kapitel 5.1; 5.2.3) oder um im Studienverlauf auf Gruppenunterschiede zu prüfen (siehe Kapitel 5.3).

5.2.7.1 Hämatologie, Differentialblutbild, Klinische Chemie

Die mit einer chronischen Enteropathie einhergehenden Laborwertveränderungen sind unspezifisch. Durch Stress kann eine **Leukozytose** auftreten (Guilford 1996), dies wurde jedoch in der eigenen Untersuchung nicht beobachtet. Eine **Neutrophilie** mit oder ohne Linksverschiebung kann bei einer chronischen Enteropathie ebenfalls beobachtet werden (Hall und German 2005b), war jedoch in dieser Untersuchung bei keinem Tier vorhanden. Bei einer eosinophilen Gastroenteritis (EGE) kann es zu einer begleitenden **Eosinophilie** kommen, die jedoch selten vorhanden und nicht für eine EGE pathognomonisch ist (Hall und German 2005b). Der an einer EGE leidende Hund (Hund 16) dieser Studie wies keine Eosinophilie auf. Eine **Thrombozytopenie** stellt eine seltene extraintestinale Manifestation der Erkrankung dar, ihre Ätiologie ist unbekannt (Ridgway et al. 2001). Zu Studienbeginn zeigte ein Hund der Probiotikagruppe (Hund 29) eine Thrombozytenzahl, die unter dem von Kraft und Dürr (2005) publizierten Referenzbereich von 150 – 500 G/l lag. Im Studienverlauf kam es jedoch zu einem Anstieg des Wertes in den Referenzbereich. Zu Studienabschluss zeigte ein anderer Hund der Probiotikagruppe eine verringerte Thrombozytenzahl (Hund 32, 89,8 G/l), die zu Studienbeginn noch im Referenzbereich gelegen hatte (208 G/l). In der Kontrolluntersuchung zwei Wochen später lag der Wert mit 306 G/l jedoch wieder im Referenzbereich. Außer einer extraintestinalen Manifestation einer IBD sind auch andere Ursachen für die Thrombozytopenie dieser Tiere in Betracht zu ziehen. Möglicherweise handelt es sich bei beiden Tieren um eine blutabnahmebedingte Thrombozytopenie.

Aufgrund einer chronischen Enteropathie kann es zu einer **Proteinverlustenteropathie** kommen, die sich in einer Hypoalbuminämie und einer Hypoproteinämie äußern kann (Hall und German 2005b). Proteinwerte, die unterhalb des von Kraft und Dürr (2005) publizierten Referenzbereiches lagen (5,4 – 7,5 g/dl, als SI-Einheit 54-75 g/l, siehe Tabelle 7), wiesen die Hunde 8, 13 (Plazebogruppe), 23 und 24 (Probiotikagruppe) zu Studienbeginn auf. Im Studienverlauf zeigten alle Tiere bis auf Hund 13 einen Anstieg des Wertes in den Referenzbereich. Bei Hund 13 kam es zu einem weiteren, leichten Abfall. Ähnlich verhielten sich die **Serumalbuminwerte**. Zu Studienbeginn zeigten die Hunde 8, 13 (Plazebogruppe), 20, 23 und 26 (Probiotikagruppe) unter dem Referenzbereich liegende Werte (2,5 – 4,4 g/dl, als SI-Einheit 362,3-637,6 $\mu\text{mol/l}$) (Kraft und Dürr 2005), die sich fast alle im Studienverlauf normalisierten. Nur Hund 13 wies auch hier einen weiteren, leichten Abfall des Wertes auf. Da dieser Hund zu Studienbeginn und zum Abschluss stark erniedrigte Cobalaminserumspiegel aufwies und zwischen diesen beiden Parametern eine starke Korrelation besteht (Allenspach et al. 2007), könnte hier ein ursächlicher Zusammenhang vermutet werden. Eine Leber- oder Nierenerkrankung als Ursache für den reduzierten Protein- und Albuminspiegel ist unwahrscheinlich, da die entsprechenden Blutwerte dieses Tieres im Normbereich lagen. Es ist anzunehmen, dass die Regulierung der Werte bei den meisten betroffenen Hunden durch die abklingende Enteritis hervorgerufen wurde.

Zu Beginn der Studie lag kein **Plasmakalziumwert** der Hunde unter dem von Kraft und Dürr (2005) publizierten Referenzbereich (2,3 – 3,0 mmol/l), zum Abschluss der Studie zeigte Hund 13 (Plazebogruppe) einen leicht (2,2 mmol/l) und Hund 18 (Probiotikagruppe) einen deutlich erniedrigten Wert (1,1 mmol/l). Da der Verlust von Kalzium über den Darm in einer an Albumin gebundenen Form erfolgt (Hall und German 2005a), ist ein erniedrigter Wert bei Hund 13 erklärbar, da er einen erniedrigten Albuminwert aufwies (246,3 $\mu\text{mol/l}$). Der deutlich erniedrigte Wert von Hund 18 kann auf anderen Ursachen beruhen. Als mögliche Ursache für die Hypokalzämie von Hund 18 käme auch eine Pankreatitis in Frage (Nelson

2010). Dieses Tier wies initial keine Hypoalbuminämie auf und die klinischen Befunde unterstützen diese Diagnose nicht. Eine zuverlässigere Aussage über eine vorliegende Hypokalzämie hätte jedoch nur über den Wert für das ionisierte Kalzium erfolgen können. Das Gesamtkalzium setzt sich aus dem biologisch aktiven ionisierten Kalzium (50 %), dem proteingebundenen Kalzium (40 %) und Kalziumkomplexen (10%) zusammen. Unterschiede in der Proteinkonzentration und vor allem der Albuminkonzentration führen zu Veränderungen des Gesamtkalziums, während das ionisierte Kalzium unverändert bleibt (Nelson 2010). Dieser Wert wurde jedoch bei keinem Tier bestimmt.

Gelegentlich kann durch eine chronische intestinale Entzündung eine reaktive Hepatopathie und somit eine Erhöhung der **Leberenzymwerte** auftreten (Hall und German 2005b). Zu Beginn der Studie zeigten fünf Tiere der Placebogruppe (Hund 1, 10, 11, 12, 14) und sieben Tiere der Probiotikagruppe (Hund 18, 22, 23, 25, 26, 28, 32) erhöhte Werte der leberspezifischen Enzyme ALT und/oder GLDH nach den von Kraft und Dürr (2005) publizierten Referenzbereichen (ALT: bis 55 U/l, GLDH: bis 6 U/l), im Studienverlauf wurde die Anzahl in der Placebogruppe größer. So wiesen zum Abschluss der Studie sieben Hunde der Placebogruppe (Hund 1, 8, 10, 11, 12, 14, 15) und sieben Hunde der Probiotikagruppe (Hund 21, 22, 23, 26, 29, 30, 32) meist leicht erhöhte Enzymaktivitäten für die ALT und/oder die GLDH auf. Hund 11, der im Studienverlauf Prednisolon erhielt, zeigte zum Abschluss der Studie hochgradig erhöhte Werte der Enzyme AP, ALT und GLDH. Zu Beginn der Studie waren diese Werte noch im Referenzbereich bzw. ggr. erhöht. Der Anstieg der AP ist durch das verabreichte Prednisolon zu erklären (Kraft und Dürr 2005). Eine Erhöhung der AP über den physiologischen Bereich war außerdem bei zwei der drei weiteren Hunde, die Prednisolon erhielten (Hund 8, 15), zu verzeichnen. Hund 15 wies zu Beginn (zu diesem Zeitpunkt erhielt er bereits Prednisolon) und zum Abschluss der Studie hochgradig erhöhte Werte des Enzyms AP auf. Dieses Enzym ist nicht leberspezifisch. Es wird außer zur Untersuchung auf posthepatische oder intrahepatische Lebererkrankungen (cholestatische Hepatopathien) auch zur Untersuchung auf primäre und sekundäre Erkrankungen des Skeletts, sowie auf Hyperadrenokortizismus herangezogen (Kraft und Dürr 2005). Bei Hund 15 lagen jedoch keine entsprechenden Hinweise vor. Zum Abschluss der Studie waren bei diesem Tier außerdem die Enzymaktivitäten der ALT und GLDH ggr. erhöht, was durch die Verabreichung von Prednisolon zu erklären wäre.

Aus den klinisch chemischen Parametern lässt sich ableiten, dass bei den eingeschlossenen Patienten mit großer Wahrscheinlichkeit keine anderen Ursachen als eine chronische Enteropathie für die chronische gastrointestinale Symptomatik verantwortlich waren. Die gezeigten Veränderungen waren auf beide Gruppen gleichmäßig verteilt und geben keine Hinweise auf einen Einfluss des Probiotikums.

5.2.7.2 Trypsin-like Immunoreactivity (TLI)

Der TLI-Wert wurde zu Beginn der Studie im Zuge der Ausschlussdiagnostik bestimmt. Es handelt sich dabei um den sensitivsten und spezifischsten Tests, der zur Diagnose einer exokrinen Pankreasinsuffizienz (EPI) herangezogen werden kann (Williams und Batt 1988). Der TLI-Test misst dabei Trypsinogen und Trypsin, die aus dem Pankreas in das Blut eingetreten sind. Es hat sich gezeigt, dass abnormal niedrige Werte eine EPI anzeigen (Williams und Batt 1988; Wiberg et al. 1999). Für ein Tier (Hund 21) war diese Erkrankung bereits bekannt, doch zeigte es neuerdings deutliche Symptome einer chronischen Enteropathie. Die histologische Untersuchung der Schleimhautbiopsien des Gastrointestinaltraktes unterstützten die Verdachtsdiagnose IBD (siehe auch 5.2.7.4). Die Werte der übrigen Tiere lagen im vom untersuchenden Labor angegebenen Referenzbereich, eine EPI konnte bei ihnen differentialdiagnostisch daher ausgeschlossen werden.

5.2.7.3 Röntgen, Ultraschall

Die Ausschlussdiagnostik umfasste nur für einen Teil der Tiere Befunde der Röntgen- und Ultraschalluntersuchung, der Endoskopie und der histologischen Untersuchung der Biopsien. Die Ansammlung von Gas in den Darmschlingen von Hund 6 und 15, die während der Röntgenuntersuchung der Tiere auffiel, kann durch die Produktion von Gas durch die bakterielle Fermentation unverdaulicher Futterinhaltsstoffe oder eine Aerophagie hervorgerufen werden (Guilford 1994b). Vermutlich kam diese durch ein Ungleichgewicht der Darmmikrobiota und/oder eine Maldigestion zustande.

Stumpfe Leberländer, wie sie sich bei Hund 30 im **Ultraschall** darstellten, können durch eine Leberverfettung hervorgerufen werden (Lüerssen und Janthur 1998), die bei einer IBD nicht ungewöhnlich ist (Center et al. 1993; Guilford 1996). Eine Fettleber kann durch eine Malabsorption, durch Proteinverlust (reversibel) oder durch eine steroidale Therapie hervorgerufen werden. Rund 80 % der Patienten zeigen dieses Symptom in unterschiedlichem Ausmaß (Ridgway et al. 2001).

Im Ultraschall darstellbare verdickte Darmwände sind zwar typisch für eine chronische Enteropathie und stellen eine Reaktion der Darmwand auf die Entzündung dar (Parente et al. 2004), korrelieren aber nicht mit der Schwere der Erkrankung (Rudorf et al. 2005). Ebenso verhält es sich mit vergrößerten abdominalen Lymphknoten. Eine mögliche Differentialdiagnose stellt ein alimentäres Lymphom dar (Hall und German 2005b). Die Diagnose eines alimentären Lymphoms ist durch die histologische Untersuchung von Schleimhautbiopsien des Gastrointestinaltraktes möglich (Gaschen et al. 2008). Die Untersuchung der Biopsien der Tiere, die vergrößerte, abdominale Lymphknoten aufwiesen (Hunde 12, 13, 25), ergab in der histologischen Untersuchung allerdings keinen Hinweis auf Malignität.

Nach Penninck et al. (1989), Lamb (1990) und Lüerssen und Janthur (1998) ist die unveränderte Magenwand 3-5 mm dick. Laut Rudorf et al. (2005) beträgt die Darmwandstärke im Duodenum bis 4 mm, der Bereich 4-6 mm wird als „Grauzone“ bezeichnet. Werte über 6 mm weisen auf einen krankhaften Befund hin. Ebenso verhält es sich bei Werten über 4,7 mm im Jejunum. Die Wandstärke ist jedoch abhängig vom Körpergewicht des Hundes. In der vorliegenden Untersuchung wiesen 7 Tiere Darmwanddicken im Grenzbereich zwischen 4 und 6 mm auf, 4 Tiere zeigten Werte über 6 mm. Ein potentieller Zusammenhang zwischen der Darmwanddicke des Dünndarms und dem Schweregrad im histologischen Befund muss in dieser Arbeit sehr vorsichtig beurteilt werden, da bei nur 6 Tieren überhaupt die Dicke der Darmwand im Dünndarmbereich bestimmt und gleichzeitig der Schweregrad der histologischen Befunde angegeben wurde. Es deutet sich allerdings an, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Darmwanddicke und dem Schweregrad der histologischen Veränderungen gibt. Dies entspricht den Befunden anderer Autoren, die ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Darmwanddicke und Schweregrad der histologischen Veränderungen feststellen konnten (Rudorf et al. 2005). Die Darmwandschichtung wurde nur bei 2 Tieren beurteilt (16, 32). Dort wurde sie als unauffällig befundet.

5.2.7.4 Endoskopie, Histologie

Die makroskopischen **Endoskopie**-Befunde wurden subjektiv von den Durchführenden beurteilt. Auch die Schweregradbestimmung folgte keinen festgelegten Kriterien.

Bei einer Lymphangiektasie können während der Endoskopie weiße Lipidtröpfchen oder prominente mukosale Bläschen auffallen, die vermutlich aus der Erweiterung der Villusspitze durch die Ansammlung von Chylus resultieren (Hall und German 2005b). Dilatierte Lymphgefäße im Pylorusbereich fielen nur bei Hund 30 auf.

Rötungen der Darmschleimhaut können bei einer chronischen Enteropathie beobachtet werden. Allerdings stellt sich das Duodenum bei einer LPE in 50 % der Fälle unverändert dar (Guilford 1996). Die Tiere, deren Duodenum sich unverändert darstellte und bei denen dies

auch vermerkt wurde, waren die Hunde 18, 21 und 32. Tatsächlich wiesen diese Tiere histologisch eine mgr. chronisch-aktive Duodenitis (Hund 18), eine mgr. bis hgr. chronisch-aktive lymphoplasmazelluläre Duodenitis (Hund 21) und eine mgr. chronisch-aktive Duodenitis (Hund 32) auf.

Nur bei acht Tieren wurde sowohl endoskopisch als auch histologisch eine Beurteilung der Ausprägung der Veränderungen vorgenommen, jedoch auch nicht immer für alle untersuchten Darmabschnitte. Hund 9 wies beispielsweise makroskopisch eine mgr. granulierte Dünndarmschleimhaut und ggr. bis mgr. fleckige Rötungen im Dünndarm auf. Histologisch wurde eine mgr. Duodenitis unter Beteiligung von Granulozyten beschrieben. Anders bei Hund 12, dessen Kolonschleimhaut makroskopisch mgr. diffus gerötet erschien, der histologisch jedoch eine ausgeprägte lymphoplasmazelluläre Kolitis zeigte. Ähnliches zeigte sich bei Hund 13, dessen Magenschleimhaut makroskopisch mgr. diffus gerötet war, sich mikroskopisch jedoch als grenzwertig verändert erwies. Besonders groß war die Differenz bei Tier 25. Die Hündin zeigte makroskopisch eine ggr. granulierte Dünndarmschleimhaut, histologisch aber eine ausgeprägte Duodenitis. Deshalb kann angenommen werden, dass kein Zusammenhang zwischen der Schwere der makroskopischen und der histologischen Veränderungen besteht. Auch Allenspach et al. (2007) konnten keine Korrelation zwischen dem endoskopischen und histologischen Befund feststellen. Dies steht im Gegensatz zu einer humanmedizinischen Untersuchung, in der eine starke Korrelation zwischen dem histopathologischen und dem endoskopischen Entzündungsgrad festgestellt wurde (D'Argenio et al. 2001). Eine mögliche Ursache für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte in dem starken subjektiven Einfluss der verschiedenen, die Endoskopie durchführenden Untersucher begründet liegen. Auch für die Beurteilung von Schleimhautbiopsien wurde bereits eine große Variation bei der Beurteilung und Befundinterpretation festgestellt (Willard et al. 2002). Möglicherweise sind aber auch Veränderungen im Krankheitsgeschehen zuerst makroskopisch sichtbar und erst verzögert mikroskopisch nachweisbar.

Eine LPE stellt die häufigste IBD-Form dar (Guilford 1996). Dies zeigte sich auch in der eigenen Untersuchung. Von den neun Tieren, deren Befunde der **histologischen Untersuchung** am ehesten für eine IBD sprachen, wiesen 8 Tiere eine LPE auf, nur ein Tier zeigte eine eosinophile Enteritis. Andere IBD-Formen wurden nicht diagnostiziert.

Divergenzen bestehen auch zwischen den klinischen und histologischen Befunden. So kann von den klinischen Symptomen nicht auf den histologisch betroffenen Darmabschnitt geschlossen werden und umgekehrt (Guilford 1996). Dies zeigte sich auch in der vorliegenden Studie. So zeigte beispielsweise Hund 2 klinisch ausschließlich eine Dünndarmsymptomatik. Die histologische Untersuchung der Schleimhautbiopsien ergab jedoch sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm ausgeprägte Veränderungen. Ebenso Hund 3, der klinisch eine Dünndarmsymptomatik aufwies und histologisch mäßiggradige Veränderungen in Dünn- und Dickdarm zeigte. Hund 16 zeigte klinisch eine Dickdarmsymptomatik, in der histologischen Untersuchung ergaben sich jedoch Veränderungen in Dick- und Dünndarm. Die 13 Tiere, die klinisch eine gemischte Symptomatik aufwiesen und deren Schleimhautbiopsien histologisch untersucht wurden, zeigten fast alle im histologischen Befund ebenfalls eine Beteiligung beider Darmabschnitte. Die Ausnahme bildete Hund 22, der klinisch Symptome aufwies, die sowohl auf eine Beteiligung des Dünndarms als auch des Dickdarms schließen ließen. In der histologischen Untersuchung ergaben sich aber nur Veränderungen im Dickdarm. Zu bedenken ist hier allerdings die bereits erwähnten Unsicherheiten in Bezug auf die endoskopische Biopsieentnahme und die histopathologische Untersuchung. Bei der endoskopischen Biopsieentnahme können möglicherweise fokal auftretende Entzündungen verpasst worden sein und nicht alle Darmabschnitte sind mit einem Endoskop zu erreichen (Hall und German 2005a). Auch variiert das Ergebnis der histologischen Beurteilung abhängig davon, welche Person die Probe untersucht (Willard et al. 2002). Letztere Unsicherheit konnte in der

vorliegenden Studie dadurch minimiert werden, dass nur eine Person mit der Untersuchung der Proben betraut wurde.

In diesem Abschnitt lässt sich erkennen, dass große Unterschiede zwischen den Krankheitsbildern der einzelnen Tiere bestanden, sodass eine Beurteilung des probiotischen Effekts erschwert wird. Für weiterführende Untersuchungen zum Nutzen einer probiotischen Therapie auf das makroskopische und mikroskopische Geschehen im Darm wäre es notwendig, bei allen Tieren zu Studienbeginn und nach der Intervention eine Endoskopie und eine histologische Untersuchung von Schleimhautbiopsien vorzunehmen. Um die Auswertung zu vereinfachen, wäre die Durchführung der Endoskopie nach einem festgelegten Bewertungsschema hilfreich.

5.2.8 Fäzes

Die Fäzesproben aus München wurden am Abschluss der Rekrutierungsphase auf Trockeneis nach Berlin versandt. Die in Berlin gesammelten Proben wurden immer gekühlt gelagert und innerhalb weniger Stunden fachgerecht eingefroren. Die Proben aus Köln wurden in Gruppen während der Rekrutierungsphase ungekühlt und unter Sauerstoffeinfluss versandt. Unterschiede sind von daher nicht auszuschließen. Jahreszeitliche Einflüsse auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota, wie sie in einer Untersuchung von Benno et al. (1992b) beobachtet wurden, konnten ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da die Proben über zwei Jahre zu allen Jahreszeiten gesammelt wurden. Da dieser Einfluss aber für beide Gruppen gleichermaßen vorhanden war, konnte eine mögliche Veränderung der untersuchten Keimgruppen durch das Probiotikum bzw. das Placebo zufriedenstellend beurteilt werden.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Tagebücher

Die Parameter, deren Entwicklung im Studienverlauf mithilfe der Tagebücher dokumentiert wurde, sind die Aktivität und der Appetit der Probanden, das Auftreten von Erbrechen, einer Hämatochezie und/oder mukoider Fäzes, die Kotkonsistenz und die Kotabsatzfrequenz.

In Humanstudien über den Einsatz von VSL#3 in der Prävention einer Pouchitis nach der Bildung einer ileoanalen Anastomose aufgrund einer ulzerativen Kolitis wurde mithilfe von Fragebögen zur Beurteilung der Lebensqualität bei Patienten der Probiotikagruppe zum Abschluss der Studie eine signifikant höhere Punktzahl als zu Beginn erzielt, was eine verbesserte Lebensqualität impliziert (Gionchetti et al. 2003). In der vorliegenden Untersuchung kam es in der Probiotikagruppe im Vergleich zum Ausgangszustand zu einer signifikanten Besserung der Aktivität ($p = 0,002$), was als Ausdruck eines besseren Allgemeinbefindens interpretiert werden könnte. Dies war in der Placebogruppe nicht der Fall. Tatsächlich erwies sich die Aktivität der Tiere der Placebogruppe zu Studienbeginn als tendenziell weniger stark reduziert als die der Tiere der Probiotikagruppe ($p = 0,054$). Im Studienverlauf jedoch war die Besserung der Aktivität der Tiere der Probiotikagruppe so stark, dass sie in der dritten Periode eine signifikant weniger stark reduzierte Aktivität aufwiesen als die Tiere der Placebogruppe ($p = 0,007$).

Die vorangegangenen Untersuchungen zum Einfluss von Probiotika auf den Appetit bzw. die Futteraufnahme gesunder Hunde erzielten unterschiedliche Ergebnisse. Die Verabreichung eines *L. acidophilus*-Stammes führte bei gesunden Mischlingswelpen zu einer Stimulation des Appetits und damit zu einer erhöhten Futteraufnahme (Biagi et al. 2007), während die Futteraufnahme durch *Enterococcus faecium* SF68 bei jungen Hunden unbeeinflusst blieb (Benyacoub et al. 2003). In einer anderen Untersuchung wurde die Futteraufnahme gesunder, mutterlos aufzogener Hundewelpen in den ersten acht Lebenstagen durch den verabreichten *Enterococcus faecium*-Stamm eher negativ beeinflusst (Weiß 2003). In der eigenen Untersuchung blieb der Appetit der Probanden durch das Probiotikum weitestgehend unbeeinflusst. Im Gruppenvergleich zeigte sich der Appetit der Tiere der Probiotikagruppe zu

Studienbeginn als tendenziell stärker reduziert als der der Placebogruppe ($p = 0,071$), während es in der Placebogruppe zu einer tendenziellen Besserung des Appetits kam ($p = 0,075$). Die Unterschiede zwischen den vorangegangenen Untersuchungen und im Vergleich zu der eigenen können möglicherweise dadurch zu erklären sein, dass unterschiedliche Probiotika bei verschiedenen Zielgruppen eingesetzt wurden. Es ist bekannt, dass nicht alle Probiotika die gleichen Effekte haben und unter anderem auch das Alter der Zieltierart eine Rolle spielt (Salminen et al. 1998a; Koenen et al. 2004). Denkbar sind auch vom Erkrankungsstatus des Wirts abhängige Unterschiede im Wirkmechanismus der einzelnen Probiotika.

Die Wirkung von Probiotika auf die Kotkonsistenz gesunder Hunde stellt sich in den vorangegangenen Untersuchungen ebenfalls unterschiedlich dar. So kam es durch die Verabreichung eines *L. acidophilus*-Stammes an adulte Tiere zu einer Verbesserung der Kotkonsistenz bei Tieren, die eine weiche Kotkonsistenz aufwiesen (Pascher 2004). Pasupathy et al. (2001) konnten durch die Verabreichung eines *L. acidophilus*-Stammes an gesunde Mischlingswelpen und Mück (2007) durch die Verabreichung von *Enterococcus faecium* DSM 7134 an gesunde, adulte Hunde keine Veränderung der Fäzeskonsistenz bewirken. In einer humanmedizinischen Studie wurde die Konsistenz der Exkremente durch die Verabreichung von *Lactobacillus* La-5 und *Bifidobacterium* Bb-12 an Patienten mit einer ileoanal Anastomose aufgrund einer ulzerativen Kolitis signifikant verbessert (Laake et al. 2005). In der eigenen Untersuchung kam es im Studienverlauf zu einer signifikanten Besserung der Kotkonsistenz beider Gruppen ($p < 0,001$). Auch Gruppenunterschiede waren im gesamten Studienverlauf feststellbar. In den Perioden 1, 2 und 4 zeigten die Hunde der Placebogruppe weniger stark veränderte Kotkonsistenzen ($p < 0,001$), in Periode 3 hingegen die Probiotikagruppe ($p = 0,016$). Da zu Studienbeginn die Tiere der Placebogruppe die weniger stark veränderten Kotkonsistenzen aufwiesen, kann gefolgert werden, dass sich die Tiere der Probiotikagruppe bis zur dritten Periode stärker besserten als die Hunde der Placebogruppe. Dadurch ist jedoch nicht zu erklären, warum die Hunde der Placebogruppe in der vierten Periode die geformteren Konsistenzen aufwiesen. Möglicherweise waren geformtere Konsistenzen nur bei den weniger stark betroffenen Hunden der Placebogruppe möglich. Das mögliche Besserungspotential wurde von den stärker betroffenen Hunden der Probiotikagruppe zwar schon früher erreicht (Periode 3 vs. Periode 4). Möglicherweise war der Einfluss der Arzneimitteltherapie auf diesen zentralen Parameter so groß, dass der Einfluss des Probiotikums überdeckt wurde.

Die **Kotabsatzfrequenz** wurde in vorangegangenen Untersuchungen an gesunden Hunden ebenfalls unterschiedlich beeinflusst. Während durch *Enterococcus faecium* DSM 7134 die Kotabsatzfrequenz unbeeinflusst blieb (Mück 2007), kam es bei Hunden mit erhöhter Kotabsatzfrequenz durch einen *L. acidophilus*-Stamm zu einer tendenziellen Verminderung (Pascher 2004). Möglicherweise hatte das Probiotikum einen regulierenden Effekt auf diese Veränderung. Auch in einer humanmedizinischen Studie mit Patienten, die aufgrund einer ulzerativen Kolitis eine ileoanale Anastomose besaßen, kam es durch die Verabreichung von *Lactobacillus* La-5 und *Bifidobacterium* Bb-12 zu einer signifikanten Verringerung der Defäkationsfrequenz (Laake et al. 2005). In der eigenen Untersuchung ergab sich kein Unterschied der Kotabsatzfrequenz im Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte. Im Gruppenvergleich zeigten jedoch die Hunde der Probiotikagruppe in Periode 2 und Periode 3 signifikant geringere Kotabsatzfrequenzen als die Hunde der Placebogruppe. In Periode 4 konnte kein Gruppenunterschied festgestellt werden. Es kann gemutmaßt werden, dass das Probiotikum in Kombination mit der Arzneimitteltherapie eine Besserung der Kotabsatzfrequenz schneller herbeiführte als die Arzneimitteltherapie allein. Die Ergebnisse wären vermutlich deutlicher, wenn die Tiere nach ihren Erkrankungsgraden gleichmäßig auf die Gruppen verteilt worden wären.

Das Auftreten einer **Hämatochezie** und/oder **mukoider Fäzes** tritt besonders bei Dickdarmerkrankungen auf (Nelson 2010). In einer humanmedizinischen Studie mit Patienten, die eine ileoanale Anastomose aufgrund einer ulzerativen Kolitis besaßen, kam es durch die Verabreichung von *Lactobacillus* La-5 und *Bifidobacterium* Bb-12 zu einem signifikant geringeren Auftreten mukoider Fäzes (Laake et al. 2005). Da sich jedoch in der eigenen Untersuchung alle 7 Hunde, deren Symptome zu Studienbeginn klinisch auf eine reine Dünndarmsymptomatik hinwiesen, in der Placebogruppe befanden (7 von 16 Hunden), sind Gruppenunterschiede dieser Symptome nicht zu bewerten. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass die Hunde der Probiotikagruppe in den ersten drei Perioden signifikant häufiger eine Hämatochezie aufwiesen als die Hunde der Placebogruppe und der Vergleich der Anfangs- und Abschlusswerte in der Probiotikagruppe eine signifikante Abnahme der Häufigkeit dieses Symptoms ergab. Ähnlich, aber nicht so deutlich, zeigte sich der Gruppenunterschied bei dem Auftreten mukoider Fäzes. Es konnte nur in Periode 2 ein tendenziell häufigeres Auftreten bei den Hunden der Probiotikagruppe verzeichnet werden. Betrachtet man die Parameter, die mithilfe des Tagebuches befundet wurden, zusammenfassend, so zeigte sich eine Besserung aller Tiere im Studienverlauf, doch wiesen die Hunde der Placebogruppe in den ersten beiden Perioden häufig signifikant bzw. tendenziell bessere Werte auf als die Hunde der Probiotikagruppe. Sie zeigten in Periode 1 eine tendenziell geringer reduzierte Aktivität und einen tendenziell geringer reduzierten Appetit, signifikant seltener eine Hämatochezie und eine signifikant geringere Kotabsatzfrequenz. In Periode 3 jedoch erwies sich die Probiotikagruppe als diejenige, die häufiger günstigere Werte aufwies. In der 4. Periode zeigten zwar die Hunde der Placebogruppe signifikant häufiger geformte Fäzes, doch waren alle anderen Parameter nicht unterschiedlich. Daraus kann geschlossen werden, dass zwar die Hunde der Probiotikagruppe zunächst die stärker betroffenen Tiere waren, was auch durch den CIBDAI unterstützt wird (siehe 5.3.2), es dann jedoch zu einer Angleichung der Gruppen kam, die Tiere der Probiotikagruppe sich also stärker besserten als die Tiere der Placebogruppe. Die verabreichte Medikation ist vermutlich nicht der Grund für die stärkere Besserung der Hunde der Probiotikagruppe, da die Arzneimittel mit dem vermutlich größten Einfluss auf die Symptomatik entweder in beiden Gruppen in ähnlichem Ausmaß und ähnlicher Dauer (Antibiose) oder nur in der Placebogruppe verabreicht wurden (Kortikosteroide). Vielleicht wäre das Ergebnis ohne die Verabreichung von Prednisolon in der Placebogruppe oder bei Berücksichtigung der Erkrankungsgrade bei der Gruppeneinteilung deutlicher gewesen. Unter Berücksichtigung aller Schwächen des Studiendesigns deuten diese Ergebnisse einen Effekt des Probiotikums auf die Besserung der Leitsymptome bei Hunden an, die wegen einer chronischen Enteropathie therapiert werden.

5.3.2 Fragebogen

Da in der Nutztierernährung eine erhöhte Lebendmassezunahme durch den Einsatz von Probiotika verzeichnet werden konnte (Zeyner und Boldt 2006), war auch in der vorliegenden Studie die Zunahme an **Körpermasse** bei untergewichtigen Tieren und somit eine Normalisierung des **Body Condition Scores (BCS)** von Interesse. Ein Gruppenunterschied im BCS konnte nicht nachgewiesen werden. Betrachtet man allerdings nur die Tiere, die einen BCS < 3 aufwiesen, also untergewichtig waren, so lässt sich in der Probiotikagruppe eine Abnahme der Anzahl an Tieren im Studienverlauf, die als „untergewichtig“ oder „dünn“ bezeichnet wurden, verzeichnen (von 50 % auf 27 %), während es in der Placebogruppe zu einer prozentualen Zunahme an Tieren an Tieren mit BCS < 3 kam (33 % auf 46 %). Hier ist aber zu beachten, dass die absolute Anzahl an Hunden in der Placebogruppe gleich blieb, der Parameter aber statt bei 15 Hunden wie zu Studienbeginn nur noch bei 11 Tieren bestimmt wurde. In der Probiotikagruppe wurde dieser Parameter zwar ebenfalls zu Beginn bei 15 Tieren und zum Studienabschluss bei 11 Tieren untersucht, doch verringerte sich die Anzahl

von anfänglich 7 auf 3 Tiere. Eine mögliche Gewichtszunahme durch die Verabreichung eines Probiotikums könnte durch eine erhöhte Futterraufnahme der Probanden oder eine verbesserte Verdaulichkeit von Futterinhaltsstoffen erzielt werden. In den Untersuchungen von Weiß (2003) und Benyacoub et al. (2003) an wachsenden Hundewelpen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Futterraufnahme zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Somit kam es auch zu keiner unterschiedlichen Gewichtszunahme der Welpen. Pasupathy et al. (2001) untersuchten Hundewelpen und stellten fest, dass es zu keinem Unterschied der Verdaulichkeit von Futterinhaltsstoffen und somit zu keiner unterschiedlichen Gewichtszunahme von Versuchs- und Kontrollgruppe kam. In der Untersuchung von Sauter et al. (2006) über den Einfluss eines probiotischen Mischpräparates auf Hunde, die an einer FRD litten, konnte ebenfalls keine Gewichtszunahme verzeichnet werden. Da in der eigenen Untersuchung auch wie bereits erwähnt der Appetit der Probanden weitestgehend unbeeinflusst blieb und kein statistisch nachweisbarer Einfluss auf die Körpermasse und den BCS bestand, kann vermutet werden, dass das Probiotikum zu keiner Stimulation des Appetits, aber auch zu keiner Erhöhung der Verdaulichkeit von Futterinhaltsstoffen und zu keiner Regulierung der Malabsorption der Probanden führte. Da sich jedoch die Anzahl an Tieren mit einem BCS <3 in der Probiotikagruppe verringerte, ergibt sich ein Hinweis, dass das Probiotikum einen gewissen – wenn auch geringen – Einfluss hatte. Da in der statistischen Untersuchung jedoch kein Signifikanzniveau erreicht wurde, bleibt dies durch weiterführende Untersuchungen zu untermauern.

Sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe kam es zu einer signifikanten Verringerung des **CIBDAI** durch die Verabreichung von *L. acidophilus* NCC 2628, *L. acidophilus* NCC 2766 und *L. johnsonii* NCC 2767 an Hunde mit einer FRD (Sauter et al. 2006). Auch humanmedizinische Untersuchungen der Aktivitätsindizes einer chronischen Enteropathie ergaben ähnliche Ergebnisse. So führte die Verabreichung von *B. breve* Stamm Yakult, *B. bifidum* Stamm Yakult und eines *L. acidophilus*-Stammes an Patienten mit einer moderaten, aktiven ulzerativen Kolitis zu einem signifikanten Abfall des klinischen Aktivitätsindex im Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte in Versuchs- und Kontrollgruppe, zum Abschluss der Studie auch zu einem signifikant niedrigeren Aktivitätsindex in der Probiotikagruppe (Kato et al. 2004). Der CIBDAI der Probanden zeigte in der eigenen Untersuchung zu Beginn der Studie einen signifikant höheren Wert in der Probiotikagruppe. Im folgenden Verlauf konnte kein Gruppenunterschied mehr festgestellt werden. Dies zeigte sich auch bei der Einschätzung des **Krankheitsverlaufs** durch die Besitzer. Es kam in der Probiotikagruppe zu einer signifikanten Besserung des CIBDAI und des subjektiv beurteilten Krankheitsverlaufs und zu einer signifikanten Besserung des CIBDAI und einer tendenziellen Besserung des Krankheitsverlaufs in der Placebogruppe. Möglicherweise kam es hier aber auch zu einem Angleichen der Gruppen und somit zu einer stärkeren Besserung der Tiere der Probiotikagruppe. Vielleicht war der Arzneimitteleinfluss so groß und die damit einhergehende klinische Besserung aller Probanden so stark, dass kein Gruppenunterschied mehr festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu der Studie von Kato et al. (2004) war zum Studienabschluss in der Versuchsgruppe kein niedrigerer Aktivitätsindex erzielt worden als in der Kontrollgruppe. In der genannten Untersuchung wurden nur Patienten mit einer aktiven, moderaten ulzerativen Kolitis untersucht, die zudem alle dieselbe Medikation erhielten. Möglicherweise wurde der probiotische Effekt in der eigenen Untersuchung durch die heterogenere und unterschiedlich therapierte Studienpopulation verschleiert. Eine andere mögliche Ursache ist, dass Menschen auf den Einsatz eines Bifidobakteriums anders reagieren als Hunde.

Im Hinblick auf die Dünndarmsymptome **Flatulenz**, **Borborygmus** und **Bauchschmerzen** konnte beobachtet werden, dass sich zu Studienbeginn zwar kein Gruppenunterschied feststellen ließ, die Tiere der Probiotikagruppe aber bereits 14 Tage nach Beginn der Interventionen tendenziell seltener diese Symptome aufwiesen als die Hunde der

Plazebogruppe. Dies war auch an allen folgenden Untersuchungstagen zu verzeichnen. Nur zum Studienabschluss zeigten die Tiere beider Gruppen das Symptom „Borborygmus“ in gleichem Ausmaß. Die Symptome Borborygmus und Flatulenz entstehen durch die Entwicklung von Gasen im Dünndarm durch den bakteriellen Abbau nichtabsorbierbarer Nährstoffe (Guilford 1994b). Möglicherweise bedingt der Einsatz des Probiotikums eine Regulierung dieses Mechanismus durch seinen Einfluss auf die Darmmikrobiota oder durch eine Verbesserung der Verdaulichkeit von Futterinhaltsstoffen. Das Probiotikum könnte so schneller und effektiver auf diese Symptome wirken als eine alleinige Arzneimitteltherapie. Betrachtet man die Parameter der Fragebögen zusammenfassend, so lässt sich ein ähnlicher Schluss ziehen wie bei der zusammenfassenden Beurteilung der Parameter der Tagebücher. Auch hier zeigte sich, dass die Hunde der Probiotikagruppe eine schlechtere Ausgangsposition hatten als die Hunde der Plazebogruppe und es im Studienverlauf zu einer Angleichung kam. Zum Teil erzielten die Hunde der Probiotikagruppe zum Abschluss der Studie sogar bessere Werte als die Hunde der Plazebogruppe.

5.3.3 Diskussion der Ergebnisse der Blutparameter

5.3.3.1 Hämatologie, Differentialblutbild, Klinische Chemie

In einer humanmedizinischen Untersuchung an Patienten mit einer chronischen Enteropathie (Laake et al. 2005) und in einer veterinärmedizinischen Untersuchung an gesunden Hunden (Benyacoub et al. 2003) kam es zu keiner Beeinflussung hämatologischer, klinisch-chemischer Werte und des Differentialblutbildes. Eine andere veterinärmedizinische Untersuchung mit Hunden, die an einer FRD litten und eine Mischung aus *L. acidophilus* NCC 2628, *L. acidophilus* NCC 2766 und *L. johnsonii* 2767 erhielten, zeigte ebenfalls keine Gruppenunterschiede (Sauter et al. 2006). Dies stimmt mit den Befunden der eigenen Untersuchung überein, in der die statistische Auswertung der Parameter aus Hämatologie, klinischer Chemie und Differentialblutbild zu keinem Zeitpunkt der Studie einen Gruppenunterschied erkennen ließ. Auch innerhalb der Gruppen kam es zu keiner signifikanten Änderung der Werte bei Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte. Es lässt sich erkennen, dass das Probiotikum keinen Einfluss auf die in diesem Zusammenhang untersuchten Blutparameter hatte. Zu anderen Ergebnissen kam eine Untersuchung, in der *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 an 15 gesunde, adulte Hunde verschiedener Rassen verabreicht wurde. Hier kam es zu einem signifikanten Anstieg der Erythrozytenzahl, des Hämatokrits und der Anzahl an Neutrophilen und Monozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Baillon et al. 2004). Die Autoren erklärten die Erhöhung der Erythrozytenzahl und des Hämatokrits durch eine Reduktion der Erythrozytenfragilität durch das Probiotikum. Die größere Konzentration von Neutrophilen wurde durch eine Erhöhung der systemischen Neutrophilenpopulation erklärt, da Probiotika in vorangegangenen *in vitro*-Studien zu einer erhöhten bakteriziden Aktivität der Neutrophilen, der Phagozytose und einem verstärktem oxidativen Burst geführt hatten (Schiffrin et al. 1995; Chiang et al. 2000).

5.3.3.2 Cobalamin, Folsäure

Cobalamin wird bei schweren Dünndarmerkrankungen vermindert aufgenommen (Batt und Morgan 1982; Batt et al. 1983; Levine et al. 1984).

In einer früheren Untersuchung mit Hunden, die an einer FRD erkrankt waren, kam es durch die probiotische Therapie zu keiner Beeinflussung des Cobalaminspiegels im Serum (Sauter et al. 2006). Eine Substitution des Vitamins führte in einer anderen Untersuchung in 100 % der Fälle zu einer Korrektur des Wertes in den physiologischen Bereich (Allenspach et al. 2007). In der vorliegenden Untersuchung konnte ebenfalls kein Einfluss des Probiotikums auf die Cobalaminwerte festgestellt werden. Auch hier kam es durch die Substitution bei allen Patienten zu einer Normalisierung des Wertes. Ein Effekt auf den Cobalaminwert bei nicht substituierten Patienten, die zu Studienbeginn erniedrigte Werte aufwiesen, kann nicht beurteilt werden, da diese sich alle in der Plazebogruppe befanden (Hund 9, 12 und 13) und

die Tierzahl zu gering war. Zum Abschluss der Studie wiesen zwei der drei Hunde weiterhin erniedrigte Cobalaminwerte auf, bei dem dritten Hund wurde der Abschlusswert nicht bestimmt. Das unterstützt die Annahme, dass es trotz klinischer Besserung zu keiner Korrektur des Cobalaminspiegels kommt, wenn das Vitamin nicht substituiert wird.

Folsäure ist aufgrund einer möglichen bakteriellen Überbesiedlung des Dünndarms in erhöhter Konzentration im Serum nachzuweisen (siehe auch 5.2.7.1) (Rutgers et al. 1995). Zu Studienbeginn wiesen 63 % der Tiere Folsäurewerte auf, die über dem Referenzbereich lagen (3 (4)–10 ng/ml), zu Studienabschluss waren es sogar 79 %. Von dieser Entwicklung waren beide Gruppen gleichermaßen betroffen. In der Untersuchung von Sauter et al. (2006) kam es ebenfalls zu einem Anstieg der Folsäurewerte der Versuchs- und der Kontrollgruppe. Die Autoren diskutierten, dass die erhöhte Folsäurekonzentration eine reduzierte Schädigung der Dünndarmmukosa und somit eine erhöhte Folsäureabsorption reflektiert. Dies ist in der eigenen Untersuchung ebenfalls eine denkbare Ursache. In diesem Zusammenhang wäre ein Einfluss des Probiotikums auf die Restitution des Darmepithels denkbar. Da aber die Werte keine signifikanten Gruppenunterschiede aufwiesen, ist es wahrscheinlich, dass das Probiotikum keinen Einfluss auf den Folsäuregehalt im Serum hatte.

5.3.3.3 C-Reaktives Protein (CRP)

Das CRP zählt zu den Akute-Phase-Proteinen, deren Produktion in der Leber durch TNF- α und Il-6 stimuliert wird (Yamashita et al. 1994; Vermeire et al. 2004), die wiederum durch Entzündungszellen freigesetzt werden (Armstrong et al. 1997). Die biologische Funktion des CRP umfasst die Aktivierung des Komplementsystems und die Stimulation von Leukozyten. Es bindet kalziumabhängig an Kohlenhydrate wie bakterielles Lipopolysaccharid und interagiert mit Neutrophilen, Monozyten/Makrophagen und Natural Killer-Zellen, indem es ihre Aktivität steigert. Es ist ein Opsonin und erleichtert die Bindung von Phagozyten an Bakterienzellen (Tizard 2008). Da es allerdings bei Infektionen und entzündlichen Geschehnissen aller Art gebildet wird, hat es sich als ungeeignet erwiesen, um eine chronische Enteropathie zu diagnostizieren (Westermarck et al. 2005a). Zudem ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse über die Aussagekraft dieses Parameters im Zusammenhang mit einer chronischen Enteropathie in vorangegangenen Untersuchungen (Jergens et al. 2003; Allenspach et al. 2007; McCann et al. 2007). Während es sich einerseits als nützlich erwies, um das Ansprechen der Tiere auf die Therapie zu beurteilen (Jergens et al. 2003; McCann et al. 2007) und um Rückfälle zu prognostizieren, korrelierte es in zwei von drei Untersuchungen nicht mit dem Schweregrad der chronischen Enteropathie (Allenspach et al. 2007; McCann et al. 2007). Auch in der eigenen Untersuchung konnte keine Korrelation zwischen dem CRP und dem CIBDAI festgestellt werden (Korrelationskoeffizient nach Kendall-Tau-b: 0,116, Signifikanz (2-seitig): 0,224).

Die Werte für das C-Reaktive Protein wiesen in der eigenen Untersuchung zu Beginn der Studie keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied auf. Ein Hund der Placebogruppe (Hund 16) wies zu Studienbeginn einen erhöhten Wert auf und lag mit 15,4 mg/l nur knapp über dem Referenzbereich (<15 mg/l), während drei Hunde der Probiotikagruppe mit 104,1 mg/l (Hund 20) und 89,1 mg/l (Hunde 21 und 23) deutlich darüber liegende Werte zeigten. Zum Abschluss der Studie zeigten die Hunde der Probiotikagruppe signifikant höhere Werte als die Hunde der Placebogruppe, was aber aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung zu Studienbeginn mit Vorsicht betrachtet werden muss. Die Werte der Hunde, die zu Studienbeginn erhöhte Werte aufgewiesen hatten, zeigten zum Studienabschluss einen gesunkenen Wert, doch nur der Wert von Hund 16 lag zu diesem Zeitpunkt im Referenzbereich. Zusätzlich wies nun ein weiterer Hund der Placebogruppe einen stark erhöhten CRP-Wert auf (Hund 9). In der Probiotikagruppe war dies nicht der Fall. Da in einer früheren Untersuchung bereits ein Abfall des CRP unter einer Tylosintherapie festgestellt wurde (Westermarck et al. 2005a), kann dieser Effekt durch die medikamentelle Therapie der

Probanden hervorgerufen worden sein. Möglicherweise führte das eingesetzte Bifidobakterium aber auch zu einer Reduktion der CRP-Serumkonzentration, doch aufgrund der geringen Tierzahl und der unterschiedlichen Erkrankungsgrade zu Studienbeginn kann dies nicht sicher festgestellt werden (Werte für das Einzeltier siehe Tabellen 50-53 im Anhang).

5.3.4 Lymphozytenphänotypisierung

Mithilfe der Bestimmung des prozentualen Anteils der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen ist eine Aussage über den Immunstatus und den Einfluss immunmodulierender Substanzen möglich. Die dazu herangezogene Durchflusszytometrie stellt eine präzise qualitative und quantitative Methode zur Identifizierung von Lymphozyten im peripheren Blut dar (Byrne et al. 2000). In der vorliegenden Untersuchung wurden CD21⁺-, CD5⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen analysiert. Die isolierten Lymphozyten wurden nach Abschluss der Rekrutierungsphase gemeinsam analysiert, wodurch sich eine in der Literatur noch nicht beschriebene, lange Lagerungszeit von bis zu zwei Jahren bei -80 °C ergab. Durch die lange Lagerungszeit kam es trotz der Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) und fetalem Kälberserum zu einem Absterben der meisten Zellen, was durch eine Propidiumiodidfärbung nachgewiesen werden konnte. Allerdings gab es tote, aber gefärbte (also den gesuchten Rezeptor tragende) und tote, aber ungefärbte (also den gesuchten Rezeptor nicht tragende) Zellpopulationen. Bei der Auswertung konnte beobachtet werden, dass zwischen dem prozentualen Anteil der CD8⁺-Lymphozyten und der Lagerungsdauer in Wochen eine signifikante negative Korrelation bestand (Korrelationskoeffizient nach Pearson: -0,507, Signifikanz (2-seitig): <0,001). Dies war bei den anderen untersuchten Zellpopulationen nicht der Fall. Es kann also angenommen werden, dass CD8-Rezeptoren zuerst oder in größerer Menge nicht mehr nachweisbar sind und sich so die Zellrelationen verschieben. Die Ergebnisse sind daher kritisch zu betrachten.

Das **CD21-Molekül reifer B-Zellen** ist ein Komplementrezeptor (CR2). Bei seinem Liganden handelt es sich um das Komplementmolekül C3d. Kommt es zu einer Bindung eines an C3d gebundenen Antigens an den B-Zellrezeptor (BCR), führt dies ebenfalls zur Bindung von C3d und CD21. Gemeinsam mit einem weiteren Oberflächenmolekül von B-Zellen – CD19 – stabilisiert CD21 den BCR in den Lipid Rafts der Zellmembran. Dadurch wird dessen Internalisierung und Degradierung verzögert und die Signalgebung wird verstärkt (Cherukuri et al. 2001). Der Anteil an CD21⁺-Lymphozyten ist bei Welpen am höchsten und sinkt dann ab. Zwischen den Altersgruppen 1-2 Jahre und 3-5 Jahre wurde aber kein Unterschied mehr festgestellt (Faldyna et al. 2001). Im Alter von 1-5 Jahren betrug der prozentuale Anteil an CD21⁺-Lymphozyten rasseunabhängig $14,4 \pm 5,9 \%$ (Faldyna et al. 2001). In anderen Untersuchungen waren es $12,2 \pm 6,0 \%$ (Chabanne et al. 1995), $11,3 \pm 1,2 \%$ (Kim et al. 2000) bzw. $12,9 \pm 3,9 \%$ (Byrne et al. 2000). In der vorliegenden Untersuchung waren es vor Beginn der Intervention $14,5 \pm 10,7 \%$ in der Probiotikagruppe und $13,6 \pm 7,29 \%$ in der Placebogruppe, was den Angaben in der Literatur entspricht. Nach Abschluss der Supplementierung lag der prozentuale Anteil an CD21⁺-Zellen in der Placebogruppe jedoch mit $17,1 \pm 7,38 \%$ über den Angaben in der Literatur, in der Probiotikagruppe war dies nicht der Fall ($14,5 \pm 6,11 \%$). Dieser Unterschied war weder im Gruppenvergleich noch im Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte innerhalb der Placebogruppe signifikant.

Da in vorangegangenen Untersuchungen zu chronischen Enteropathien beim Hund im Zuge der Erkrankung eine erhöhte Anzahl an IgG-produzierenden Plasmazellen in der Lamina propria (German et al. 2001) und eine erniedrigte Anzahl im peripheren Blut festgestellt wurde und dies durch eine vermehrte Sequestration am Entzündungsort oder eine Exsudation ins Darmlumen erklärt wurde (Guilford 1996), wäre im Umkehrschluss denkbar, dass bei abklingender Entzündung der Anteil an CD21⁺-Lymphozyten im peripheren Blut – wie in der Placebogruppe geschehen – steigt. Dies ist jedoch sehr spekulativ, da der Anstieg auch durch

diverse andere Mechanismen bedingt sein kann. Der Anstieg der CD21⁺-Lymphozyten in der Placebogruppe über den physiologischen Bereich hinaus könnte ebenso als unerwünscht angesehen werden, da Plasmazellen häufig an der pathologischen Immunreaktion im Darm beteiligt sind.

Das **CD5-Antigen** findet sich bei Hunden im Gegensatz zu anderen Spezies nur auf T-Zellen (Tizard 2008). Es kann bei dieser Spezies also als Marker für die Gesamtzahl an T-Zellen herangezogen werden. In der Literatur werden Mittelwerte von $82,8 \pm 4,8 \%$ (Chabanne et al. 1995), $79,7 \pm 1,4 \%$ (Kim et al. 2000) und $83,3 \pm 3,5 \%$ (Byrne et al. 2000) angegeben. In der vorliegenden Untersuchung lagen die Werte etwas unter diesem Bereich, zu Beginn der Studie in der Placebogruppe bei $71,8 \pm 17,4 \%$ und in der Probiotikagruppe bei $74,1 \pm 14,8 \%$. Wahrscheinlich war dies durch den Verlust des CD8⁺-Oberflächenmarkers während der Lagerung bedingt. Es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen oder zu den Werten bei Studienende gezeigt werden. Laut Guilford (1996) ist die Anzahl an T-Lymphozyten im peripheren Blut bei einer IBD entweder normal oder erniedrigt. Dies stimmt mit den Befunden aus der eigenen Untersuchung überein.

Das **CD4-Antigen** findet sich auf T-Helfer-Zellen, die aus dem Extrazellularraum aufgenommene und mit dem MHCII-Molekül präsentierte Antigene erkennen (Tizard 2008). Während in einer vorangegangenen Untersuchung bei Hunden in der Altersgruppe von $12,1 \pm 1,3$ Jahre ein signifikant niedrigerer prozentualer Anteil an CD4⁺-Lymphozyten als in der Vergleichsgruppe mit einem Alter von $3,15 \pm 0,8$ Jahren festgestellt wurde (HogenEsch et al. 2004), wurde in einer anderen Untersuchung kein altersabhängiger Unterschied gezeigt (Faldyna et al. 2001). In der Literatur finden sich für den Anteil von CD4⁺-Zellen gesunder Hunde Werte von $43,2 \pm 6,9 \%$ (Faldyna et al. 2001), $37,3 \pm 8,7 \%$ (Chabanne et al. 1995), $40,9 \pm 2,4 \%$ (Kim et al. 2000) und $45,0 \pm 8,3 \%$ (Byrne et al. 2000). In der vorliegenden Untersuchung lagen die Werte vor Beginn der Supplementierung in der Placebogruppe bei $39,4 \pm 11,9$ und in der Probiotikagruppe bei $43,5 \pm 14,8 \%$, sie stimmen also mit den Werten gesunder Hunde überein. Zum Abschluss der Studie konnte keine signifikante Änderung innerhalb oder zwischen den Gruppen verzeichnet werden. Dies stimmt mit dem Ergebnis anderer Untersuchungen überein, in denen kein Einfluss des eingesetzten *Enterococcus faecium* SF 68 auf den prozentualen Anteil an CD4⁺-Lymphozyten bei jungen Hunden bzw. des eingesetzten *Enterococcus faecium* DSM 7134 bei gesunden Hunden verzeichnet werden konnte (Benyacoub et al. 2003; Mück 2007). Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung weisen darauf hin, dass diese Subpopulation bei einer chronischen Enteropathie im peripheren Blut unverändert ist und dass das Probiotikum - wie auch bei gesunden Hunden - keinen Einfluss auf sie nimmt.

Das Oberflächenmolekül **CD8 β** findet sich auf zytotoxischen T-Zellen, die der Eliminierung intrazellulärer Erreger dienen (Tizard 2008). Es konnte in vorangegangenen Untersuchungen ein höherer Prozentsatz an CD8⁺-T-Zellen bei älteren Tieren festgestellt werden (Faldyna et al. 2001; HogenEsch et al. 2004). Die Angaben in der Literatur liegen bei $19,1 \pm 5,7 \%$ (Faldyna et al. 2001), $28,8 \pm 5,6 \%$ (Byrne et al. 2000), $28,6 \pm 6,6 \%$ (Chabanne et al. 1995) und $21,6 \pm 1,8 \%$ (Kim et al. 2000). In der vorliegenden Untersuchung lagen sie vor Beginn der Studie bei $16,3 \pm 12,8 \%$ in der Placebogruppe und $15,2 \pm 6,2 \%$ in der Probiotikagruppe. Der Unterschied zu den bereits publizierten Werten für CD8⁺-Lymphozyten kam vermutlich durch das Absterben der CD8⁺-T-Zellen oder Verlust des Oberflächenmarkers während der Lagerung zustande. Zwar kam es in der Probiotikagruppe zu einem numerischen Anstieg und in der Placebogruppe zu einem numerischen Abfall an CD8⁺-Lymphozyten, doch konnte ein Einfluss des verabreichten Probiotikums oder eine zeitliche Veränderung im Laufe der Studie nicht gezeigt werden, wie dies auch in anderen Untersuchungen der Fall war (Benyacoub et al. 2003; Mück 2007), die Ergebnisse unterliegen jedoch den oben beschriebenen Unsicherheiten. Der numerische Anstieg der CD8⁺-Lymphozyten in der Probiotikagruppe und der Abfall in der Placebogruppe könnte durch die Verabreichung von Glukokortikoiden in der

Plazebogruppe zu erklären sein, da diese die Apoptose von CD8⁺-T-Zellen erhöhen (Lanza et al. 1996).

Zusammenfassend lässt sich kein Einfluss des eingesetzten Probiotikums auf die untersuchten Lymphozytenpopulationen feststellen. Interessant ist aber die durch den Literaturvergleich erworbene Erkenntnis, dass es in diesem Fall bei Hunden mit chronischen Enteropathien zu keiner Änderung der Anzahl der verschiedenen Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut kam und dass eine lange Lagerungszeit der isolierten Lymphozyten mit einem Verlust von CD8β⁺-Lymphozyten verbunden ist. Da es sich bei einer chronischen Enteropathie um eine Erkrankung handelt, in der ein überreagierendes Immunsystem eine Rolle spielt, wäre die Untersuchung des Anteils tolerogener Subpopulationen im peripheren Blut und im Darm in weiterführenden Untersuchungen interessant.

5.3.5 Diskussion der molekularbiologischen Daten

Zur Bestimmung des Gehaltes an Bakterien der *Clostridium leptum*- und der *Clostridium coccooides*-Gruppe, des Gehaltes an Eubakterien, Laktobazillen und Bifidobakterien wurde eine Real-Time-PCR verwendet. Das Zielgen war das 16SrRNA-Gen. Eine Real-Time PCR besitzt den Vorteil einer höheren Spezifität verglichen mit Methoden, die sich der Kultivierung bedienen, da beispielsweise auf *Clostridium*-Nährmedien nicht nur Clostridien wachsen (Mead 1992; Harmsen et al. 2000) und mittels einer Real-Time-PCR eine Unterscheidung der Clostridien auf Gruppenebene möglich ist (Matsuki et al. 2004). Da die verwendeten gruppen- und einige speziesspezifische Primer aus bereits publizierten wissenschaftlichen Beiträgen (siehe Tabelle 12) übernommen wurden, sei für genauere Angaben zu ihrer Spezifität auf diese Beiträge verwiesen.

5.3.5.1 Eubakterien

Die bakterielle Gesamtzellzahl in den Fäzes wurde mithilfe der Bestimmung des Gehaltes an Eubakterien untersucht (Lyons et al. 2000). Für nähere Informationen, welche Phyla dazu zu zählen sind, sei auf Euzéby (1997) verwiesen. Die Gesamtzellzahl in den Fäzes gesunder Hunde wurde in anderen Untersuchungen nur mithilfe kultureller Methoden bestimmt. Die Zahlen lagen bei $9,4 \pm 0,4 \log \text{KbE/g Fäzes}$ (Ishikawa et al. 1982), $10 \log \text{KbE/g Fäzes}$ (Mentula et al. 2005) und bei $10,8 \pm 0,2 \log \text{KbE/g Fäzes}$ (Amtsberg et al. 1979). Die eubakterielle Gesamtzellzahl lag in der eigenen Untersuchung in der Plazebogruppe zu Beginn der Studie bei $7,7 \pm 1,8 \log \text{Zellen/g Fäzes}$ (mit Antibiotikum $8,3 \pm 1,9$, ohne Antibiotikum $7,8 \pm 2,3$) und in der Probiotikagruppe bei $8,5 \pm 0,9 \log \text{Zellen/g Fäzes}$ (mit Antibiotikum $8,5 \pm 1$, ohne Antibiotikum $8,1 \pm 0,8$) und damit deutlich unter den bisher publizierten Werten. Daraus kann aber nicht geschlossen werden, dass die Gesamtzellzahl bei Hunden mit einer chronischen Enteropathie reduziert ist, da der methodische Ansatz nicht vergleichbar ist. Ein Einfluss der Art der Probenahme ist unwahrscheinlich. Da die Proben vielfach Sauerstoff ausgesetzt waren, kam es vermutlich eher zu einem Wachstum aerober und einem Absterben anaerober Bakterien. Da mittels einer PCR sowohl vitale als auch tote Bakterien nachgewiesen werden, hätte dies eher einen falsch hohen denn einen falsch niedrigen Wert zur Folge gehabt.

Zum Studienabschluss wiesen die Hunde der Probiotikagruppe signifikant höhere Werte auf als die Hunde der Plazebogruppe ($p=0,03$), es kam aber in beiden Gruppen zu einem Abfall der Gesamtkeimzahl, diese war jedoch in der Plazebogruppe deutlicher ausgeprägt als in der Probiotikagruppe. Anders verhielt es sich in einer humanmedizinischen Studie, in der Pouchitispatienten, die sich in Remission befanden, das probiotische Mischpräparat VSL#3 aufnahmen. Es kam zu einem mithilfe einer Real Time-PCR bestimmten Anstieg der bakteriellen Gesamtzellzahl in den Darmbiopsien (Kühbacher 2006). Da die Autoren außerdem eine erhöhte bakterielle Diversität feststellten und für Pouchitispatienten eine Veränderung der intestinalen Mikrobiota, einhergehend mit einer Abnahme der bakteriellen Diversität, bekannt ist (Ott et al. 2004), interpretierten die Autoren dieses Ergebnis als

Wiederaufbau einer normalen intestinalen Mikrobiota. Dass die Verabreichung von Antibiotika keinen Abfall der Gesamtkeimzahl zur Folge hatte, sieht man daran, dass die Gesamtkeimzahl zu Studienbeginn in beiden Gruppen bei den unbehandelten Tieren niedriger ist als bei den behandelten Tieren. Dies war auch zum Studienabschluss der Fall. Grund für die Divergenz zwischen eigener und der humanmedizinischen Studie könnte das unterschiedliche Probenmaterial darstellen. In weiterführenden Untersuchungen wäre zu überprüfen, ob das eingesetzte Probiotikum ohne die Verabreichung von Antibiotika ebenso in der Lage gewesen wäre, die Gesamtzellzahl zu erhöhen. Ebenfalls wäre ein Einfluss auf die bakterielle Diversität zu überprüfen.

5.3.5.2 Clostridien

Das Genus der Clostridien ist extrem heterogen, umfasst >100 Spezies und besteht aus sporenbildenden und nicht sporenbildenden Spezies. Auf Grundlage des phylogenetischen 16S rDNA-Dendrogramms wurden Cluster gebildet. Cluster IV umfasst die *Clostridium leptum*-Gruppe, der Cluster XIV umfasst über 20 Clostridienspezies und wird aufgrund interner Strukturen in die Subcluster a und b unterteilt. Subcluster a umfasst die *Clostridium coccoides*-Gruppe (Collins et al. 1994; Selbitz 2002).

Clostridienkeimzahlen in den Fäzes von Hunden, die mithilfe kultureller Methoden bestimmt wurden, weisen in der bisher publizierten Literatur eine große Spannbreite auf. Es existieren Angaben zwischen 6,5 – 7,5 log KbE/g Fäzes (Greetham et al. 2002) und 10,3 log KbE/g Fäzes (Mentula et al. 2005). Andere Autoren fanden 7,3 log KbE/g Fäzes (Ishikawa et al. 1982), 8 log KbE/g Fäzes (Willard et al. 2000) und 9 log KbE/g Fäzes (Amtsberg et al. 1979). In der eigenen Untersuchung wiesen die Hunde der Placebogruppe zu Beginn der Studie im Durchschnitt $10,6 \pm 3,0$ log Zellen/g Fäzes auf, die Hunde der Probiotikagruppe $10,3 \pm 3,2$ log Zellen/g Fäzes. Die eigenen Werte liegen also in dem Bereich, der auch von anderen Autoren publiziert wurde. Der Vergleich der Werte ist jedoch schwierig, da in den oben genannten Untersuchungen jeweils verschiedene Nährmedien verwendet wurden, die unterschiedliche Anteile an Clostridien nachweisen und zudem das Wachstum anderer Bakterien zulassen. In der eigenen Untersuchung wiederum wurden die Clostridien-Cluster bestimmt, die in der normalen humanen fäkalen Mikrobiota am dominantesten sind. Da aber Vergleiche mit der Zellzahl an Bakterien der *Clostridium leptum*-Gruppe bei gesunden Hunden mit den eigenen Werten nicht möglich sind, da dazu bisher keine Zahlen veröffentlicht wurden, wurden diese Werte herangezogen. Die untersuchten Cluster *Clostridium leptum* und *Clostridium coccoides* gehören zu dem Phylum der *Firmicutes*. In mehreren humanmedizinischen Studien hat sich herausgestellt, dass bei den humanen IBD-Formen der fäkale Anteil an *Firmicutes* im Vergleich zu gesunden Individuen reduziert ist (Sokol et al. 2006; Takaishi et al. 2008; Sokol et al. 2009). Dies interpretierten die Autoren als eine negative Entwicklung, da die *Clostridium leptum*-Gruppe viele butyratproduzierende Spezies umfasst. Butyrat ist die Hauptenergiequelle für die Epithelzellen des Kolons und besitzt immunmodulatorische und antiinflammatorische Eigenschaften (Salminen et al. 1998a; Tuohy et al. 2003). Sie nahmen an, dass ein gesunkener Anteil an butyratproduzierenden Bakterien der *Clostridium leptum*-Gruppe also eine Rolle im Ausbruch humaner IBD spielen könnte (Sokol et al. 2009). Auch in einer neueren Untersuchung an Hunden konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Firmicutes bei gesunden Hunden signifikant höher ist als bei Hunden, die an einer chronischen Enteropathie litten und die Anzahl an Clostridien war bei erkrankten Hunden signifikant niedriger (Suchodolski et al. 2010). In der eigenen Untersuchung kam es im Studienverlauf in der Probiotikagruppe zu einem tendenziellen Anstieg der Bakterien der *Clostridium leptum*-Gruppe ($p = 0,055$) und einem signifikanten Anstieg der Bakterien der *Clostridium coccoides*-Gruppe ($p = 0,032$). In der Placebogruppe war dies nicht der Fall. Zum Abschluss der Studie wiesen die Hunde der Probiotikagruppe signifikant höhere Zellzahlen der Bakterien der *Clostridium coccoides*-Gruppe auf als die Hunde der Placebogruppe ($p = 0,031$). Geht man davon aus, dass die Ergebnisse humaner

Studien auf den Hund übertragen werden können, könnte daraus gefolgert werden, dass es zu einer positiven Veränderung dieser Populationen der Darmmikrobiota kam. Die eigenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu anderen Untersuchungen mit kulturellen Methoden über den Einfluss von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 bzw. *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 auf den Clostridiengehalt bei gesunden Hunden. So führte die Verabreichung dieser Probiotika zu einem Abfall der Clostridienkeimzahlen (Vahjen und Männer 2003; Baillon et al. 2004). Dieser Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen könnte dadurch zu erklären sein, dass ein anderes Probiotikum eingesetzt wurde oder der probiotische Effekt beim gesunden Tier ein anderer ist. Möglicherweise spielt auch hier der Gesundheitsstatus eine Rolle. Zum Abschluss der Studie lagen die Zellzahlen an Clostridien bei mit Antibiotika behandelten Hunden in der Placebogruppe bei $10,6 \pm 2,6$ log Zellen/g Fäzes, bei den unbehandelten Hunden bei $11,1 \pm 5,1$ log Zellen/g Fäzes. In der Probiotikagruppe wiesen die mit Antibiotika behandelten Hunde $14,7 \pm 2,1$ Zellen/g Fäzes, die unbehandelten $14,9 \pm 2,7$ Zellen/g Fäzes auf. Dies zeigt, dass die Verabreichung einer Antibiose keinen eindeutigen Einfluss auf die Anzahl an Clostridien in den Fäzes hatte, die Verabreichung von Probiotika jedoch zu einem deutlichen Anstieg führte.

5.3.5.3 Bifidobakterien

Bifidobakterien gehören ebenso wie die Laktobazillen zu den milchsäureproduzierenden Bakterien (Donnet-Hughes et al. 1999; Ouwehand et al. 2002b). Alle Mitglieder des Genus *Bifidobacterium* sind gram-positive, unbewegliche, nicht sporulierende, kein Gas produzierende, anaerobe, katalase-negative und saccharolytische Mikroorganismen (Ventura et al. 2004). Auch für Bifidobakterien existieren sehr unterschiedliche Angaben über deren Zahl in den Fäzes von Hunden, wie sie mithilfe kultureller Methoden bestimmt wurden. So fanden Greetham et al. (2002) etwa $5,5 - 8,5$ log KbE/g Fäzes, aber auch von 9 log KbE/g Fäzes wurde bereits berichtet (Amtsberg et al. 1979; Mentula et al. 2005). Im Zusammenhang mit humaner IBD sind die fäkalen Zellzahlen im Vergleich mit denen gesunder Individuen reduziert (Sokol et al. 2009).

In der eigenen Untersuchung wiesen die Hunde der Placebogruppe zu Beginn der Studie Bifidobakterien in einer Konzentration von $5,4 \pm 1,8$ log Zellen/g Fäzes auf (mit Antibiotikum $6,0 \pm 2,2$ log Zellen/g Fäzes, ohne Antibiotikum $4,4 \pm 2,3$ log Zellen/g Fäzes), die Hunde der Probiotikagruppe $5,6 \pm 1,6$ log Zellen/g Fäzes (mit Antibiotikum $5,9 \pm 2,0$ log Zellen/g Fäzes, ohne Antibiotikum $5,2 \pm 1,4$ log Zellen/g Fäzes). Somit liegen die Werte an der unteren Grenze der bisher publizierten Daten. Da eine PCR aber sowohl vitale als auch tote Zellen nachweist, ist dieser Einflussfaktor vermutlich nicht von ausschlaggebender Bedeutung. Da für humane Patienten mit einer chronischen Enteropathie bereits unnormale niedrige Werte an Bifidobakterien nachgewiesen wurden, ist es denkbar, dass in der eigenen Untersuchung ähnliche Verhältnisse vorlagen (Ruseler van Embden et al. 1994; Poxton et al. 1997). Die Werte an Bifidobakterien in den Fäzes nach der probiotischen Behandlung waren innerhalb der Gruppen nicht anders als zu Beginn, doch zeigten die Hunde der Probiotikagruppe zum Abschluss der Studie tendenziell höhere Werte als die Hunde der Placebogruppe ($p = 0,064$). Durch die Verabreichung des Präparates VSL#3 oder der fermentierten Milch „Cultura“ (*Lactobacillus* La-5, *Bifidobacterium* Bb12) an humane Patienten mit einer ileoanalen Pouchrekonstruktion wurde ebenfalls ein Anstieg der Bifidobakterien in den Fäzes erzielt (Gionchetti et al. 2003; Laake et al. 2005). Die Untersuchungen wurden mithilfe kultureller Methoden (Laake et al. 2005) oder einer PCR (Gionchetti et al. 2003) durchgeführt. Das eigene Ergebnis stimmt also mit vorangegangenen Untersuchungen überein. Der tendenzielle Unterschied kommt durch den Abfall der Zellzahl in der Placebogruppe zustande. Deshalb kann nicht von einer Normalisierung der Werte gesprochen werden. Es kann höchstens vermutet werden, dass das Probiotikum einen Abfall verhinderte.

In der Studie von Kato et al. (2004) kam es ebenfalls durch die Verabreichung von mit Bifidobakterien fermentierter Milch (*B. breve* Stamm Yakult, *B. bifidum* Stamm Yakult und

L. acidophilus Yit 0168) zu einem signifikanten Anstieg von *B. breve* und *B. pseudocatenulatum* in den Fäzes der Versuchsgruppe, der mithilfe einer Real Time-PCR nachgewiesen wurde, die Zahlen anderer Bifidobakterien wie *B. longum* blieben jedoch unbeeinflusst. Die Autoren dieser Untersuchung erachteten es für möglich, dass dieser Anstieg mit den beobachteten positiven klinischen Effekten in Verbindung stehen könnte (signifikant niedrigerer klinischer Aktivitätsindex in der Probiotikagruppe als in der Placebogruppe zum Studienabschluss, signifikanter Abfall des endoskopischen Aktivitätsindex und des histologischen Scores in der Probiotikagruppe, aber nicht in der Placebogruppe, signifikanter Anstieg des fäkalen Butyrats und Propionats in der Probiotikagruppe, aber nicht in der Placebogruppe). Sie nahmen an, dass dies mit der Normalisierung der intestinalen Mikrobiota assoziiert war, die bereits in anderen Untersuchungen nachgewiesen worden war (Saavedra et al. 1994; Kitajima et al. 1997). Möglicherweise führte das eingesetzte *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 in der eigenen Untersuchung ebenfalls zu einer klinischen Besserung des genutzten klinischen Aktivitätsindex, dies ist jedoch nur schwer überprüfbar, da sich alle Tiere im Studienverlauf signifikant besserten. Da aber die Tiere der Probiotikagruppe zu Studienbeginn stärker erkrankt waren als die Tiere der Placebogruppe, zum Studienabschluss aber kein Gruppenunterschied mehr festgestellt wurde, könnte das Probiotikum zu einer schnelleren und stärkeren Besserung geführt haben. Dies ist anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht belegbar. Die Verabreichung einer Antibiose hatte keinen Einfluss auf die Anzahl an Bifidobakterien in den Fäzes. Die Zellzahlen waren sowohl zu Studienbeginn als auch zum Studienabschluss bei den mit Antibiotika behandelten Tieren höher als bei den unbehandelten Tieren.

5.3.5.4 Laktobazillen

Die Bakterien der Gattung *Lactobacillus* sind lange Stäbchen, die häufig kurze Ketten bilden und selten schwach beweglich sind. Es handelt sich um fakultative Anaerobier (Rolle und Mayr 2007).

In der Literatur existieren sehr unterschiedliche Angaben über deren kulturell bestimmten Gehalt in den Fäzes von Hunden. Sie reichen von 4,5 log KbE/g Fäzes (Williams Smith 1961; Greetham et al. 2002) bis 9,6 log KbE/g Fäzes (Mitsuoka et al. 1976; Amtsberg et al. 1979).

Der Gehalt an Laktobazillen in den Fäzes betrug in der eigenen Untersuchung zu Beginn der Studie in der Placebogruppe $5,8 \pm 1,8$ log Zellen/g und in der Probiotikgruppe $5,8 \pm 1,7$ log Zellen/g. Diese Werte liegen zwar noch innerhalb des publizierten Bereiches, doch an der unteren Grenze. Die meisten Autoren gaben höhere Werte an (Ishikawa et al. 1982; Willard et al. 2000; Mentula et al. 2005). Es ergab sich zu keinem Zeitpunkt der Studie ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied. Auch innerhalb der Gruppen kam es zu keiner signifikanten Änderung der Werte im Vergleich der Ausgangs- und Abschlusswerte. Im Gegensatz dazu führte die Verabreichung des probiotischen Mischpräparates VSL#3 oder der fermentierten Milch „Cultura“ (*Lactobacillus* La-5, *Bifidobacterium* Bb12) an Patienten mit einer ileoanalen Pouchrekonstruktion zu einem Anstieg des Laktobazillengehaltes in den Fäzes. Hier enthielten beide Formulierungen verschiedene *Lactobacillus* spp. (Gionchetti et al. 2003; Laake et al. 2005). Ebenfalls einen tendenziellen Anstieg verzeichneten Sauter et al. (2006) nach der Verabreichung eines probiotischen Mischpräparates aus *Lactobacillus acidophilus* NCC 2628, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2766 und *Lactobacillus johnsonii* NCC 2767 an Hunde mit einer FRD. Der Anstieg ist aber vermutlich durch die Verabreichung von Laktobazillen bedingt. In der eigenen Untersuchung wäre durch verbesserte Lebensbedingungen für Milchsäurebakterien durch das verabreichte Bifidobakterium ein Anstieg von Laktobazillen zu erklären gewesen. Allerdings produzieren einige Bifidobakterien Bakteriozine, die vor allem auf ähnliche Bakterien einen Einfluss haben (Yildirim und Johnson 1998). Daher ist es möglich, dass es in der vorliegenden Untersuchung deshalb zu keinem Anstieg an Laktobazillen kam. Zudem war die Konzentration des

probiotischen Präparats im Vergleich zur Gesamtzahl an Bakterien im Dickdarm so gering, dass weitreichende Veränderungen der Mikrobiota unwahrscheinlich waren. Möglicherweise kam es aber auch durch die Verabreichung der Antibiose bei den allermeisten Tieren zu keinem Anstieg der Laktobazillenzellzahl. Auch hier zeigte sich kein Einfluss der Verabreichung von Antibiotika auf die Zellzahl an Laktobazillen in den Fäzes, da die behandelten Hunde der Placebogruppe zum Studienabschluss $5,5 \pm 2,3$ log Zellen/g Fäzes aufwiesen, die unbehandelten $4,8 \pm 2,5$ log Zellen/g Fäzes. In der Probiotikagruppe wiesen die behandelten Tiere $5,0 \pm 1,6$ log Zellen/g Fäzes auf, die unbehandelten Tiere $4,8 \pm 1,6$ log Zellen/g Fäzes.

5.3.5.5 Probiotische DNA

Die DNA des in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten *B. animalis* NCIMB 41199 konnte vor Beginn der Intervention in keiner Probe nachgewiesen werden, fand sich aber in allen Proben der Versuchsgruppe 30 und 90 Tage nach Beginn der Supplementierung. Daraus kann geschlossen werden, dass das Probiotikum zuverlässig verabreicht wurde. Bei Tieren, die im Studienverlauf Antibiotika bekamen, war die probiotische DNA ebenfalls nachweisbar. Auch in humanmedizinischen Untersuchungen konnten die eingesetzten Bifidobakterien in den Fäzes der Versuchsgruppe identifiziert werden (Ishikawa et al. 2003; Kato et al. 2004). Es kam bei fast allen Tieren von Tag 30 zu Tag 90 zu einer weiteren Zunahme des Gehaltes an probiotischer DNA in den Fäzes. Im Durchschnitt kam es zu einer 40fachen Erhöhung des DNA-Gehaltes. Allerdings war die Spannweite sehr groß. Während es bei vier Tieren zu einer Abnahme des DNA-Gehaltes kam, zeigten andere eine Zunahme um den Faktor 192 oder 373. Im Median kam es nur zu einer Zunahme um den Faktor 1,47.

Bei der Betrachtung aller Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung kann geschlossen werden, dass das Probiotikum einen Einfluss auf die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota hatte. Dieser Einfluss war auf die Bakterien der *Clostridium-coccoides*-Gruppe größer als auf die Bakterien der *Clostridium-leptum*-Gruppe und die Bifidobakterien. Keinen Einfluss hatte es auf den Laktobazillengehalt. Da es durch das Probiotikum zu einem Anstieg einer unter den Normalwerten liegenden Gesamtzellzahl kam und auch zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahlen für die positiven Vertreter der Darmmikrobiota der *Clostridium-leptum*-Gruppe, der *Clostridium-coccoides*-Gruppe und der Bifidobakterien, kann von einer positiven Beeinflussung der Darmmikrobiota ausgegangen werden. Ob es zu einer Abnahme an pathogenen Vertretern der Darmmikrobiota kam, kann hier nicht beurteilt werden. Die fehlende Beeinflussung der Laktobazillenzellzahl ist möglicherweise auf die Produktion von Bakteriozinen durch die Bifidobakterien zurückzuführen (Yildirim und Johnson 1998). Dies müsste jedoch durch weiterführende Untersuchungen bestätigt werden. Grundsätzlich fehlen aber bei Verwendung einer PCR Vergleichswerte für den Gehalt der untersuchten Populationen in den Fäzes gesunder Hunde. Der Vergleich mit den Werten, die mithilfe kultureller Methoden bestimmt wurden, kann zwar einen Hinweis darauf liefern, ob die eigenen Werte in demselben Größenbereich liegen, doch können wegen der unterschiedlichen erfassten Spezies und der Erfassung avitaler Keime durch die PCR keine direkten Vergleiche angestellt werden. Vergleichswerte gesunder Hunde wären deshalb hilfreich. Nur so wäre es möglich, sicher zu beurteilen, ob eine eventuell krankhaft veränderte Zusammensetzung sich normalisiert oder ob eine physiologische Mikrobiota verändert wird. Auch ist es hilfreich zu wissen, wie sich die Anzahl der untersuchten Populationen während einer chronischen Enteropathie verhält, wie dies auch in humanmedizinischen Studien untersucht wurde. In neueren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Darmmikrobiota erkrankter Hunde von der gesunder Hunde unterscheidet (Suchodolski et al. 2010). Doch weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind noch erforderlich. So kann beurteilt werden, ob die untersuchten Populationen, vor allem die Clostridien, während einer kaninen chronischen Enteropathie überhaupt eine Rolle spielen und ihre Veränderung eine

Bedeutung für das Tier hat.

Bei der zusammenfassenden Betrachtung aller Ergebnisse kommt man zu dem Schluss, dass das Probiotikum möglicherweise zu einer klinischen Besserung führte, dies aber durch die Vielschichtigkeit der Erkrankung und durch die ungünstigen Verteilung der Erkrankungsgrade zu Studienbeginn nicht so deutlich zu Tage tritt. Über die Mechanismen, mit denen *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 dies erreicht, kann nur spekuliert werden. Unwahrscheinlich ist eine Manipulation der Lymphozytenwerte im peripheren Blut, denkbar aber eine lokale Manipulation im Darm, die anhand der vorliegenden Daten nicht erfasst wird. Wahrscheinlich handelt es sich aber zumindest teilweise um eine Veränderung der Zusammensetzung der Mikrobiota im Darm, da es in der Probiotikagruppe zu einem Anstieg potentiell positiver Vertreter der Mikrobiota kam.

6 Zusammenfassung

Einsatz von *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 bei Hunden mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Ziel der Studie war es, anhand klinischer, verdauungsphysiologischer und immunologischer Parameter und anhand des Einflusses der Intervention auf die Mikrobiota des Verdauungstraktes die Effizienz des Probiotikums als (unterstützende) Therapie bei Hunden mit chronischer Enteropathie zu evaluieren. Dazu wurden an drei verschiedenen Einrichtungen über zwei Jahre 32 Hunde rekrutiert, die eine chronische oder chronisch intermittierende Diarrhoe aufgrund einer chronisch entzündlichen Erkrankung des Dün- und/oder Dickdarmes aufwiesen. Es handelte sich um eine doppelblinde, plazebokontrollierte und randomisierte Interventionsstudie, in der die Tiere über einen Zeitraum von 90 Tagen beobachtet wurden. Die Tiere erhielten entweder ein Plazebo oder das aus dem kaninen Gastrointestinaltrakt isolierte *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 in einer Dosierung von $1,85-3,20 \times 10^9$ KbE einmal täglich *per os*.

Klinische und verdauungsphysiologische Parameter wurden entweder täglich mithilfe von Tagebüchern erhoben (Aktivität, Appetit, Erbrechen, Kotkonsistenz, Kotabsatzfrequenz, Hämatochezie, Auftreten mukoider Fäzes) oder mithilfe einer klinischen Untersuchung und durch Fragebögen (Körpermasse, Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI), Futterakzeptanz, Entwicklung der Erkrankung im Laufe der Studie, Body Condition Score (BCS), Flatulenzen, Borborygmen, Bauchschmerzen, Unbehagen) im Studienzeitraum erfasst (Tage 0, 14, 30, 60, und 90). Die Blutuntersuchungen zu Beginn und Abschluss der Studie umfassten hämatologische und klinisch-chemische Parameter sowie die Bestimmung von Trypsin-like Immunoreactivity (TLI), Cobalamin, Folsäure und C-reaktivem Protein. Im Blut wurden die Anteile verschiedener Lymphozytenoberflächenmarker (CD21, CD5, CD4 und CD8) erfasst. Die Mikrobiota der Fäzes wurde zu Beginn, in der Mitte der Studie und zum Abschluss mithilfe molekularbiologischer Verfahren selektiv charakterisiert. Der Untersuchungszeitraum wurde in Perioden unterteilt und diese im Gruppenvergleich ausgewertet. Zusätzlich wurden innerhalb der Gruppen Änderungen der verschiedenen Parameter zwischen Beginn und Abschluss verglichen. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Nicht normalverteilte Daten wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests, normalverteilte Daten mithilfe des T-Tests ausgewertet.

Es kam in den Gruppen trotz der randomisierten Verteilung der Tiere auf Plazebo- und Probiotikagruppe zu einer unterschiedlichen Gewichtung der Erkrankungsgrade. So wiesen die Hunde der Probiotikagruppe zu Beginn der Studie signifikant höhere CIBDAI-Werte und eine stärkere Veränderung der in den Tagebüchern und Fragebögen dokumentierten Parameter auf als die Hunde der Plazebogruppe.

Es kam in beiden Gruppen im Laufe der Studie zu einer klinischen Besserung, doch während die Hunde der Plazebogruppe im ersten Drittel der Studie häufig signifikant bzw. tendenziell bessere Werte aufwiesen als die Hunde der Probiotikagruppe, war es zwischen Tag 31 und 60 umgekehrt. Im letzten Drittel zeigte zwar die Plazebogruppe signifikant geformtere Fäzes, die übrigen Parameter zeigten keinen Gruppenunterschied. Bei der Auswertung der Fragebögen zeigte die Probiotikagruppe zu Studienabschluss eine geringere Kotabsatzfrequenz und einen günstigeren CIBDAI. Während die Hunde der Probiotikagruppe zu Beginn der Studie numerisch häufiger Kot absetzten als die Hunde der Plazebogruppe, war es in den Perioden 2 und 3 signifikant umgekehrt. Im letzten Studienabschnitt konnte kein Gruppenunterschied mehr festgestellt werden.

Eine signifikante Beeinflussung von Blutparametern oder der immunologischen Parameter konnte nicht festgestellt werden.

Der Einfluss von *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 auf die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota war gering. Das Probiotikum selbst konnte zu Beginn der Studie bei keinem Tier und in der Mitte und am Abschluss der Studie ausschließlich in der Probiotikagruppe nachgewiesen werden, sodass von einer zuverlässigen Verabreichung durch die Tierhalter auszugehen war.

Die vorliegenden Daten sind aufgrund der Heterogenität der Patienten sowie der individuell ausgerichteten Behandlungsverfahren nicht zweifelsfrei interpretierbar. Es ergaben sich Hinweise auf eine günstigere Beeinflussung des Krankheitsverlaufs bei Tieren der Probiotikagruppe im Vergleich zur Placebogruppe. Für weiterführende Untersuchungen wäre es hilfreich, Patienten mit enger definierter Krankheitssituation auszuwählen.

7 Summary

Effects of *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 in dogs with chronic enteropathies

The aim of the study was to evaluate the influence of the probiotic as a (supportive) therapeutic agent on dogs with chronic enteropathies by examining digestive and immunologic parameters and the evaluation of changes in the microbiota of the digestive tract.

For over the course of 2 years, 32 dogs were recruited at 3 different animal hospitals, which were shown to have had persistent or recurrent diarrhoea due to chronic inflammatory disease of the small and/or large intestine. The study was a double-blinded, placebo-controlled and randomized trail. The dogs were observed for over a period of 90 days. The animals received the placebo or the probiotic *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 at a dosage of $1.85\text{-}3.2 \times 10^9$ CFU once a day *per os*.

Clinical parameters and physiological parameters of digestion were surveyed by keeping diaries of the dog's activities, appetites, and parameters such as vomiting, consistency of faeces, frequency of defecation and occurrence of fresh blood and/or mucus in the faeces. Questionnaires concerning the body weight, Chronic Inflammatory Bowel Disease Activity Index (CIBDAI), acceptance of the diet, changes of the symptoms throughout the study, Body Condition Score (BCS), flatulence, borborygmi, abdominal pain and discomfort were conducted five times throughout the study. Blood examinations at the beginning and end of the study consisted of haematology, clinical chemistry, differential blood cell count as well as determination of the serum TLI, cobalamine, folic acid and C-reactive protein (CRP) concentrations. Lymphocyte phenotyping was conducted to determine the populations of CD21, CD5, CD4 and CD8. Microbial analysis of the faeces using real time polymerase chain reaction was conducted at the beginning of the study, when half of the study was completed, and at the end of the study.

Before assessing the data, the study period was divided into four periods and those were evaluated for both groups. Additional changes from the beginning to the end point of the study were compared for each group. The level of significance was set at $p < 0.05$. Data which were not normally distributed were evaluated by Mann-Whitney-U-Test, and those which were normally distributed by a Student's t-Test.

Despite the randomized distribution of the dogs, the severity of the disease was not equally distributed within the groups. The dogs of the probiotic group showed a significantly higher CIBDAI at the beginning of the study with greater modified parameters recorded in the diaries and questionnaires than the dogs of the placebo group.

Throughout the study, both groups showed clinical improvements, but there was a difference: While the dogs of the placebo group showed better results than the dogs of the probiotic group at the beginning of the study, the probiotic group showed better results between days 31 and 60. At the end of the study, the dogs of the placebo group showed improved consistency of faeces, but the rest of the assayed parameters showed no differences. Analysis of the questionnaires for the probiotic group revealed improved results at the end of the study. They were similar in frequency of defecation and the CIBDAI. While the dogs of the probiotic group showed a higher defecation rate than the dogs of the placebo group at the beginning of the study, the placebo group showed a higher defecation rate in periods 2 and 3. There were no differences between the groups at the end of the study.

Blood and immunological parameters were not significantly influenced by the probiotic.

The influence of *Bifidobacterium animalis* NCIMB 41199 on the microbiota of the faeces was low. Probiotic DNA was only detected in the faeces of the probiotic group after half of the study was completed and at the end of the study. It was not detected in either group at the beginning, nor in the faeces of the dogs of the placebo group.

The achieved data cannot be interpreted without a doubt due to heterogeneity of patients and individually adjusted medication. There is evidence for a positive influence on disease history in the probiotic group compared to the placebo group. For further investigations it would be useful to regard the state of the disease.

8 Literaturverzeichnis

Abreu-Martin, M. T.; Targan, S. R. (1996):

Regulation of immune responses of the intestinal mucosa.

Crit. Rev. Immunol. 16 (3): 277-309.

Ahn, J. B.; Hwang, H. J.; Park, J. H. (2001):

Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen.

J. Microbiol. Biotechnol. 11 (3): 443-451.

Allenspach, K. (2005):

Chronic enteropathies in dogs: pathogenesis, diagnosis and treatment.

Bern, Universität Bern. PhD-Thesis.

Allenspach, K.; Gaschen, F. (2003):

Chronic intestinal diseases in the dog: a review.

Schweiz. Arch. Tierheilkd. 145 (5): 209-219, 221-222.

Allenspach, K.; House, A.; Smith, K.; McNeill, F. M.; Hendricks, A.; Elson-Riggins, J.; Riddle, A.; Steiner, J. M.; Werling, D.; Garden, O. A.; Catchpole, B.; Suchodolski, J. S. (2010):

Evaluation of mucosal bacteria and histopathology, clinical disease activity and expression of Toll-like receptors in German shepherd dogs with chronic enteropathies.

Vet. Microbiol. 146 (3-4): 326-35.

Allenspach, K.; Rufenacht, S.; Sauter, S.; Grone, A.; Steffan, J.; Strehlau, G.; Gaschen, F. (2006):

Pharmacokinetics and clinical efficacy of cyclosporine treatment of dogs with steroid-refractory inflammatory bowel disease.

J. Vet. Intern. Med. 20 (2): 239-244.

Allenspach, K.; Wieland, B.; Grone, A.; Gaschen, F. (2007):

Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome.

J. Vet. Intern. Med. 21 (4): 700-708.

Amin, A. R.; Attur, M. G.; Thakker, G. D.; Patel, P. D.; Vyas, P. R.; Patel, R. N.; Patel, I. R.; Abramson, S. B. (1996):

A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93 (24): 14014-14019.

Amtsberg, G.; Drochner, W.; Meyer, H. (1979):

Einfluss der Futterzusammensetzung auf die Darmflora des Hundes.

In: Internationales Symposium "Ernährung von Hund und Katze". / H. Meyer (Hrsg.).

Hannover: Schlütersche Verlagsanstalt. S. 161-168.

Anonym (2011):

Liste der für Futtermittel zugelassenen Zusatzstoffe.

Abgerufen am: 23.06.2011

www.bvl.bund.de.

- Armstrong, A. M.; Gardiner, K. R.; Kirk, S. J.; Halliday, M. I.; Rowlands, B. J. (1997):
Tumor necrosis factor and inflammatory bowel disease.
Br. J. Surg. 84: 1051-1058.
- Arvanitakis, C. (1978):
Functional and morphological abnormalities of the small intestinal mucosa in pernicious
anemia - a prospective study.
Acta Hepatogastroenterol. (Stuttg) 25 (4): 313-318.
- Atreya, I.; Atreya, R.; Neurath, M. F. (2008):
NF-kappaB in inflammatory bowel disease.
J. Intern. Med. 263 (6): 591-6.
- Attur, M. G.; Patel, R. N.; Patel, P. D.; Abramson, S. B.; Amin, A. R. (1999):
Tetracycline up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E2 production independent of
its effect on nitric oxide.
J. Immunol. 162 (6): 3160-3167.
- Bahr, V.; Ullmann, U. (1983):
The influence of metronidazole and its two main metabolites on murine *in vitro* lymphocyte
transformation.
Eur. J. Clin. Microbiol. 2 (6): 568-570.
- Baillon, M. L.; Marshall-Jones, Z. V.; Butterwick, R. F. (2004):
Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs.
Am. J. Vet. Res. 65 (3): 338-343.
- Bamias, G.; Marini, M.; Moskaluk, C. A.; Odashima, M.; Ross, W. G.; Rivera-Nieves, J.;
Cominelli, F. (2002):
Down-regulation of intestinal lymphocyte activation and Th1 cytokine production by
antibiotic therapy in a murine model of Crohn's disease.
J. Immunol. 169 (9): 5308-14.
- Bamias, G.; Nyce, M. R.; De La Rue, S. A.; Cominelli, F. (2005):
New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease.
Ann. Intern. Med. 143 (12): 895-904.
- Batt, R. M.; Carter, M. W.; McLean, L. (1984):
Morphological and biochemical studies of a naturally occurring enteropathy in the Irish setter
dog: a comparison with coeliac disease in man.
Res. Vet. Sci. 37 (3): 339-346.
- Batt, R. M.; Horadagoda, N. U.; Simpson, K. W. (1991):
Role of the pancreas in the absorption and malabsorption of cobalamin (vitamin B-12) in
dogs.
J. Nutr. 121 (11 Suppl): S75-S76.
- Batt, R. M.; McLean, L.; Riley, J. E. (1988):
Response of the jejunal mucosa of dogs with aerobic and anaerobic bacterial overgrowth to
antibiotic therapy.
Gut 29 (4): 473-482.

- Batt, R. M.; Morgan, J. O. (1982):
Role of serum folate and vitamin B12 concentrations in the differentiation of small intestinal abnormalities in the dog.
Res. Vet. Sci. 32 (1): 17-22.
- Batt, R. M.; Needham, J. R.; Carter, M. W. (1983):
Bacterial overgrowth associated with a naturally occurring enteropathy in the German shepherd dog.
Res. Vet. Sci. 35 (1): 42-46.
- Bauer, E.; Williams, B. A.; Smidt, H.; Verstegen, M. W.; Mosenthin, R. (2006):
Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals.
Curr. Issues Intest. Microbiol. 7 (2): 35-51.
- Beasley, S. S.; Manninen, T. J.; Saris, P. E. (2006):
Lactic acid bacteria isolated from canine faeces.
J. Appl. Microbiol. 101 (1): 131-138.
- Benno, Y.; Nakao, H.; Uchida, K.; Mitsuoka, T. (1992a):
Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs.
J. Vet. Med. Sci. 54 (4): 703-706.
- Benno, Y.; Nakao, H.; Uchida, K.; Mitsuoka, T. (1992b):
Individual and seasonal variations in the composition of fecal microflora of beagle dogs.
Bifidobact. Microfl. 11: 69-76.
- Benyacoub, J.; Czarnecki-Maulden, G. L.; Cavadini, C.; Sauthier, T.; Anderson, R. E.; Schiffrin, E. J.; von der Weid, T. (2003):
Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs.
J. Nutr. 133 (4): 1158-1162.
- Berg, R. D. (1996):
The indigenous gastrointestinal microflora.
Trends Microbiol. 4 (11): 430-435.
- Bernet, M. F.; Brassart, D.; Neeser, J. R.; Servin, A. L. (1994):
Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria.
Gut 35 (4): 483-489.
- Biagi, G.; Cipollini, I.; Pompei, A.; Zaghini, G.; Matteuzzi, D. (2007):
Effect of a *Lactobacillus animalis* strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs.
Vet. Microbiol. 124 (1-2): 160-165.
- Bibiloni, R.; Fedorak, R. N.; Tannock, G. W.; Madsen, K. L.; Gionchetti, P.; Campieri, M.; De Simone, C.; Sartor, R. B. (2005):
VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis.
Am. J. Gastroenterol. 100 (7): 1539-1546.

- Bielecka, M.; Biedrzycka, E.; Smoragiewicz, W.; Smieszek, M. (1998):
Interaction of Bifidobacterium and Salmonella during associated growth.
Int. J. Food Microbiol. 45 (2): 151-155.
- Biourge, V.; Vallet, C.; Levesque, A.; Sergheraert, R.; Chevalier, S.; Roberton, J. L. (1998):
The use of probiotics in the diet of dogs.
J. Nutr. 128 (12 Suppl): 2730S-2732S.
- Blumberg, R. S. (1998):
Current concepts in mucosal immunity. II. One size fits all: nonclassical MHC molecules fulfill multiple roles in epithelial cell function.
Am. J. Physiol. 274 (2 Pt 1): G227-G231.
- Blumberg, R. S.; Balk, S. P. (1994):
Intraepithelial lymphocytes and their recognition of non-classical MHC molecules.
Int. Rev. Immunol. 11 (1): 15-30.
- Boris, S.; Barbes, C. (2000):
Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens.
Microbes Infect. 2 (5): 543-546.
- Bourlioux, P.; Koletzko, B.; Guarner, F.; Braesco, V. (2003):
The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," in Paris, 14. Juni 2002.
Am. J. Clin. Nutr. 78 (4): 675-683.
- Brandtzaeg, P. (1995):
Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system.
A.p.m.i.s. 103 (1): 1-19.
- Breves, G.; Walter, C.; Burmester, M.; Schroeder, B. (2000):
In vitro studies on the effects of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus var. toyoi* on nutrient transport in pig jejunum.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl) 84 (1-2): 9-20.
- Brook, I. (1999):
Bacterial interference.
Crit. Rev. Microbiol. 25 (3): 155-172.
- Burgener, I. A.; Konig, A.; Allenspach, K.; Sauter, S. N.; Boisclair, J.; Doherr, M. G.; Jungi, T. W. (2008):
Upregulation of toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs.
J. Vet. Intern. Med. 22 (3): 553-560.
- 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.
Vet. Immunol. Immunopathol. 73 (2): 167-182.

- Calder, P. C. (2007):
Immunological parameters: what do they mean?
J. Nutr. 137 (3 Suppl 2): 773S-780S.
- Cario, E.; Podolsky, D. K. (2000):
Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease.
Infect. Immun. 68 (12): 7010-7017.
- Center, S. A.; Crawford, M. A.; Guida, L.; Erb, H. N.; King, J. (1993):
A retrospective study of 77 cats with severe hepatic lipidosis: 1975-1990.
J. Vet. Intern. Med. 7 (6): 349-359.
- 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).
Vet. Immunol. Immunopathol. 49 (3): 189-198.
- Chapman, M. A. (2001):
The role of the colonic flora in maintaining a healthy large bowel mucosa.
Ann. R. Coll. Surg. Engl. 83 (2): 75-80.
- Charteris, W. P.; Kelly, P. M.; Morelli, L.; Collins, J. K. (1998):
Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Bifidobacterium isolates from the human gastrointestinal tract.
Lett. Appl. Microbiol. 26 (5): 333-337.
- Chen, Y.; Inobe, J.; Marks, R.; Gonnella, P.; Kuchroo, V. K.; Weiner, H. L. (1995):
Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance.
Nature 376 (6536): 177-180.
- Cherukuri, A.; Dykstra, M.; Pierce, S. K. (2001):
Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation.
Immunity 14 (6): 657-660.
- Corthesy, B.; Kraehenbuhl, J. P. (1999):
Antibody-mediated protection of mucosal surfaces.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 236: 93-111.
- Craven, M.; Simpson, J. W.; Ridyard, A. E.; Chandler, M. L. (2004):
Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995-2002).
J. Small Anim. Pract. 45 (7): 336-342.
- D'Argenio, G.; Cosenza, V.; Riegler, G.; Della Valle, N.; Deritis, F.; Mazzacca, G. (2001):
Serum transglutaminase correlates with endoscopic and histopathologic grading in patients with ulcerative colitis.
Dig. Dis. Sci. 46 (3): 649-657.

- Darfeuille-Michaud, A.; Neut, C.; Barnich, N.; Lederman, E.; Di Martino, P.; Desreumaux, P.; Gambiez, L.; Joly, B.; Cortot, A.; Colombel, J. F. (1998):
Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease.
Gastroenterol. 115 (6): 1405-1413.
- Davis, C. P.; Cleven, D.; Balish, E.; Yale, C. E. (1977):
Bacterial association in the gastrointestinal tract of beagle dogs.
Appl. Environ. Microbiol. 34 (2): 194-206.
- Davis, P. J.; Williams, S. C. (1998):
Protein modification by thermal processing.
Allergy 53 (46 Suppl): 102-105.
- Day, M. J.; Bilzer, T.; Mansell, J.; Wilcock, B.; Hall, E. J.; Jergens, A.; Minami, T.; Willard, M.; Washabau, R. (2008):
Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group.
J. Comp. Pathol. 138 Suppl 1: S1-43.
- De Lorenzi, D.; Freiche, V.; Tams, T.; Elliott, D.; McNeill, E.; Rodriguez, C. (2006):
Waltham Focus: Pitfalls in gastrointestinal disorders in the dog.
Aimargues, Frankreich: Royal Canin
- De Simone, C.; Pugnaroni, L.; Cilli, A.; Forastieri, E. M.; Bernardini, B.; Delogu, G.; Sorice, F. (1984):
Pharmacokinetic assessment of immunosuppressive activity of antibiotics in human plasma by a modification of the mixed lymphocyte reaction.
Crit Care Med 12 (6): 483-485.
- Deguchi, Y.; Morishita, T.; Mutai, M. (1985):
Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of Bifidobacteria.
Agric. Biol. Chem. 49: 13-19.
- Deplancke, B.; Gaskins, H. R. (2001):
Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer.
Am. J. Clin. Nutr. 73 (6): 1131S-1141S.
- Dieleman, L. A.; Goerres, M. S.; Arends, A.; Sprengers, D.; Torrice, C.; Hoentjen, F.; Grenther, W. B.; Sartor, R. B. (2003):
Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment.
Gut 52 (3): 370-376.
- Donnet-Hughes, A.; Rochat, F.; Serrant, P.; Aeschlimann, J. M.; Schiffrin, E. J. (1999):
Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose.
J. Dairy Sci. 82 (5): 863-869.

- Dubos, R.; Schaedler, R. W.; Costello, R.; Hoet, P. (1965):
Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract.
J. Exp. Med. 122: 67-76.
- Duchmann, R.; Kaiser, I.; Hermann, E.; Mayet, W.; Ewe, K.; Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1995):
Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD).
Clin. Exp. Immunol. 102 (3): 448-455.
- Duncan, S. H.; Louis, P.; Flint, H. J. (2004):
Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product.
Appl. Environ. Microbiol. 70 (10): 5810-5817.
- Elson, C. O.; Sartor, R. B.; Tennyson, G. S.; Riddell, R. H. (1995):
Experimental models of inflammatory bowel disease.
Gastroenterol. 109 (4): 1344-1367.
- Elwood, C. M.; Hamblin, A. S.; Batt, R. M. (1997):
Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subsets and MHC Class II expression in the canine small intestine.
Vet. Immunol. Immunopathol. 58 (3-4): 195-207.
- Euzéby, J. (1997):
List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet.
Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 590-592.
- Faldyna, M.; Levá, L.; Knötigová, P.; Toman, M. (2001):
Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs -- a flow cytometric study.
Vet. Immunol. Immunopathol. 82 (1-2): 23-37.
- FAO/WHO (2001):
Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food.
Abgerufen am: 23.06.2011
<http://www.mesanders.com/prodefn.asp>.
- Favier, C.; Neut, C.; Mizon, C.; Cortot, A.; Colombel, J. F.; Mizon, J. (1997):
Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease.
Dig. Dis. Sci. 42 (4): 817-822.
- Fellermann, K.; Steffen, M.; Stein, J.; Raedler, A.; Hamling, J.; Ludwig, D.; Loeschke, K.; Stange, E. F. (2000):
Mycophenolate mofetil: lack of efficacy in chronic active inflammatory bowel disease.
Aliment. Pharmacol. Ther. 14 (2): 171-176.
- Ferraris, R. P.; Yasharpour, S.; Lloyd, K. C.; Mirzayan, R.; Diamond, J. M. (1990):
Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions.
Am. J. Physiol. 259 (5 Pt 1): G822-G837.

- Flesja, K.; Yri, T. (1977):
Protein-losing enteropathy in the Lundehund.
J. Small Anim. Pract. 18 (1): 11-23.
- Fogle, J. E.; Bissett, S. A. (2007):
Mucosal immunity and chronic idiopathic enteropathies in dogs.
Compend. Contin. Educ. Vet. 29 (5): 290-302.
- Fox, I. W.; Hoag, W. G.; Strout, J. (1965):
Breed susceptibility, pathogenicity and epidemiology of endemic coliform enteritis in the dog.
Lab. Anim. Care 15: 194-200.
- Frolova, L.; Drastich, P.; Rossmann, P.; Klimesova, K.; Tlaskalova-Hogenova, H. (2008):
Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis.
J. Histochem. Cytochem. 56 (3): 267-74.
- Fuller, R. (1989):
Probiotics in man and animals.
J. Appl. Bacteriol. 66 (5): 365-378.
- Garcia-Pineros, A. J.; Hildesheim, A.; Williams, M.; Trivett, M.; Strobl, S.; Pinto, L. A. (2006):
DNase treatment following thawing of cryopreserved PBMC is a procedure suitable for lymphocyte functional studies.
J. Immunol. Methods 313 (1-2): 209-213.
- Garcia-Sancho, M.; Rodriguez-Franco, F.; Sainz, A.; Mancho, C.; Rodriguez, A. (2007):
Evaluation of clinical, macroscopic, and histopathologic response to treatment in nonhypoproteinemic dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis.
J. Vet. Intern. Med. 21 (1): 11-17.
- Garside, P.; Mowat, A. M. (2001):
Oral tolerance.
Semin. Immunol. 13 (3): 177-185.
- Garside, P.; Mowat, A. M.; Khoruts, A. (1999):
Oral tolerance in disease.
Gut 44 (1): 137-142.
- Gaschen, L.; Kircher, P.; Stussi, A.; Allenspach, K.; Gaschen, F.; Doherr, M.; Grone, A. (2008):
Comparison of ultrasonographic findings with clinical activity index (CIBDAI) and diagnosis in dogs with chronic enteropathies.
Vet. Radiol. Ultrasound 49 (1): 56-64.
- Geier, M. S.; Butler, R. N.; Howarth, G. S. (2005):
Differential efficacy of probiotic species in amelioration of dextran sulphat sodium-induced colitis in rats.
Gastroenterol. 128: A603-A604.

- Geier, M. S.; Butler, R. N.; Howarth, G. S. (2007):
Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options;
probiotics, prebiotics and synbiotics.
Int. J. Food Microbiol. 115 (1): 1-11.
- German, A. (2001):
The mucosal immune system, and the mucosal immune response in dogs with chronic
enteropathies.
ACVIM Proceedings, Denver, Colorado, 23.-26. Mai 2001
- German, A. J. (2009):
Small intestinal bacterial overgrowth and antibiotic-responsive diarrhoea.
55. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin
Thema: Prävention und Management chronischer Erkrankungen, Berlin, Verlag der DVG
Service GmbH: 100-103.
- German, A. J.; Day, M. J.; Ruaux, C. G.; Steiner, J. M.; Williams, D. A.; Hall, E. J. (2003a):
Comparison of direct and indirect tests for small intestinal bacterial overgrowth and
antibiotic-responsive diarrhea in dogs.
J. Vet. Intern. Med. 17 (1): 33-43.
- German, A. J.; Hall, E. J.; Day, M. J. (1999a):
Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine.
J. Comp. Pathol. 120 (2): 129-145.
- German, A. J.; Hall, E. J.; Day, M. J. (2001):
Immune cell populations within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies.
J. Vet. Intern. Med. 15 (1): 14-25.
- German, A. J.; Hall, E. J.; Day, M. J. (2003b):
Chronic intestinal inflammation and intestinal disease in dogs.
J. Vet. Intern. Med. 17 (1): 8-20.
- German, A. J.; Hall, E. J.; Moore, P. F.; Ringler, D. J.; Newman, W.; Day, M. J. (1999b):
The distribution of lymphocytes expressing [alpha][beta] and [gamma][delta] T-cell receptors,
and the expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 in the canine intestine.
J. Comp. Pathol. 121 (3): 249-263.
- German, A. J.; Helps, C. R.; Hall, E. J.; Day, M. J. (2000):
Cytokine mRNA expression in mucosal biopsies from German shepherd dogs with small
intestinal enteropathies.
Dig. Dis. Sci. 45 (1): 7-17.
- Gibson, P. R.; Moeller, I.; Kagelari, O.; Folino, M.; Young, G. P. (1992):
Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in
neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells *in vitro*.
J. Gastroenterol. Hepatol. 7 (2): 165-172.

Gionchetti, P.; Rizzello, F.; Helwig, U.; Venturi, A.; Lammers, K. M.; Brigidi, P.; Vitali, B.; Poggioli, G.; Miglioli, M.; Campieri, M. (2003):
Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial.
Gastroenterol. 124 (5): 1202-1209.

Gionchetti, P.; Rizzello, F.; Venturi, A.; Brigidi, P.; Matteuzzi, D.; Bazzocchi, G.; Poggioli, G.; Miglioli, M.; Campieri, M. (2000a):
Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial.
Gastroenterol. 119 (2): 305-309.

Gionchetti, P.; Rizzello, F.; Venturi, A.; Campieri, M. (2000b):
Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel diseases.
J. Gastroenterol. Hepatol. 15 (5): 489-493.

Gomes, A. M. P.; Malcata, F. X. (1999):
Bifidobacterium spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics.
Trends Food Sci. Technol. 10 (4-5): 139-157.

Gorbach, S. L.; Nahas, L.; Plaut, A. G.; Weinstein, L.; Patterson, J. F.; Levitan, R. (1968):
Studies of intestinal microflora. V. Fecal microbial ecology in ulcerative colitis and regional enteritis: relationship to severity of disease and chemotherapy.
Gastroenterol. 54 (4): 575-587.

Gordon, J. I.; Hooper, L. V.; McNevin, M. S.; Wong, M.; Bry, L. (1997):
Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT.
Am. J. Physiol. 273 (3 Pt 1): G565-G570.

Greetham, H. L.; Giffard, C.; Hutson, R. A.; Collins, M. D.; Gibson, G. R. (2002):
Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach.
J. Appl. Microbiol. 93 (4): 640-646.

Gualtieri, M. (2006):
Valutazione clinica preliminare dell'azione di *Lactobacillus acidophilus*, ceppo "LB" termo-inattivato liofilizzato, nel trattamento della diarrea acuta e cronica nel cane e nel gatto.
Veterinaria 5: 33-40.

Guarner, F.; Malagelada, J. R. (2003):
Gut flora in health and disease.
Lancet 361 (9356): 512-519.

Guilford, W. G. (1994a):
Adverse reactions to food: a gastrointestinal perspective.
Compend. Contin. Educ. Vet. 16 (8): 957-968.

Guilford, W. G. (1994b):
Nutritional management of gastrointestinal tract diseases of dogs and cats.
J. Nutr. 124 (12 Suppl): 2663S-2669S.

- Guilford, W. G. (1996):
Idiopathic inflammatory bowel diseases.
In: Strombeck's small animal gastroenterology. / W. G. Guilford, S. A. Center, D. R. Strombeck, Williams und Meyer (Hrsg.).
Philadelphia: W. B. Saunders Company. S. 451-486.
- Guilliams, T. G. (1999):
Healthy microbial organisms.
The Standard 2 (2): 1-7.
- Guslandi, M.; Mezzi, G.; Sorghi, M.; Testoni, P. A. (2000):
Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease.
Dig. Dis. Sci. 45 (7): 1462-1464.
- Haenel, H.; Müller-Beuthow, W. (1956):
Comparative quantitative examination of the bacterial count in the feces of man and some vertebrates.
Zentralbl. Bakteriol. [Orig.] 167 (2): 123-133.
- Hall, E. J.; Batt, R. M. (1990):
Enhanced intestinal permeability to ⁵¹Cr-labeled EDTA in dogs with small intestinal disease.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 196 (1): 91-95.
- Hall, E. J.; Batt, R. M. (1992):
Dietary modulation of gluten sensitivity in a naturally occurring enteropathy of Irish setter dogs.
Gut 33 (2): 198-205.
- Hall, E. J.; German, A. J. (2005a):
Diseases of the small intestine.
In: Textbook of veterinary internal medicine
Diseases of the dog and cat. / S. J. Ettinger und E. C. Feldman (Hrsg.).
Philadelphia: W. B. Saunders Company. S. 1332-1378.
- Hall, E. J.; German, A. J. (2005b):
Inflammatory bowel disease.
In: Textbook of veterinary internal medicine
Diseases of the dog and cat. / S. J. Ettinger und E. C. Feldman (Hrsg.).
Philadelphia: W. B. Saunders Company. S. 1367-1374.
- Haller, D. (2005):
Molecular Interactions of commensal enteric bacteria with the intestinal epithelium and the mucosal immune system: implications for chronic intestinal inflammation.
In: Probiotics and prebiotics: scientific aspects. / G. W. Tannock (Hrsg.).
Wymondham: Caister Academic Press. S. 129-154.
- Halstensen, T. S.; Scott, H.; Brandtzaeg, P. (1990):
Human CD8+ intraepithelial T lymphocytes are mainly CD45RA-RB+ and show increased co-expression of CD45R0 in celiac disease.
Eur. J. Immunol. 20 (8): 1825-1830.

Hampe, J.; Cuthbert, A.; Croucher, P. J.; Mirza, M. M.; Mascheretti, S.; Fisher, S.; Frenzel, H.; King, K.; Hasselmeyer, A.; MacPherson, A. J.; Bridger, S.; van Deventer, S.; Forbes, A.; Nikolaus, S.; Lennard-Jones, J. E.; Foelsch, U. R.; Krawczak, M.; Lewis, C.; Schreiber, S.; Mathew, C. G. (2001):

Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations.

Lancet 357 (9272): 1925-1928.

Harkin, K. R.; Walshaw, R.; Mullaney, T. P. (1996):

Association of perianal fistula and colitis in the German shepherd dog: response to high-dose prednisone and dietary therapy.

J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 32 (6): 515-520.

Harmsen, H. J.; Gibson, G. R.; Elfferich, P.; Raangs, G. C.; Wildeboer-Veloo, A. C.; Argaiz, A.; Roberfroid, M. B.; Welling, G. W. (2000):

Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria.

FEMS Microbiol. Lett. 183 (1): 125-129.

Hartmann, F. (2000):

Colitis ulcerosa.

In: Klinische Gastroenterologie. / E. G. Hahn und J. F. Riemann (Hrsg.).

Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. S. 905-928.

Hassinen, J. B.; Durbin, G. T.; Tomarelli; Bernhart, F. W. (1951):

The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*.

J. Bacteriol. 62 (6): 771-777.

Hayden, D. W.; Van Kruiningen, H. J. (1982):

Lymphocytic-plasmacytic enteritis in German shepherd dogs.

J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 18: 89-96.

He, F.; Morita, H.; Ouwehand, A. C.; Hosoda, M.; Hiramatsu, M.; Kurisaki, J.; Isolauri, E.; Benno, Y.; Salminen, S. (2002):

Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by Bifidobacterium strains.

Microbiol. Immunol. 46 (11): 781-785.

Herias, M. V.; Hesse, C.; Telemo, E.; Midtvedt, T.; Hanson, L. A.; Wold, A. E. (1999):

Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats.

Clin. Exp. Immunol. 116 (2): 283-290.

Hermiston, M. L.; Gordon, J. I. (1995):

Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin.

Science 270 (5239): 1203-1207.

Hess, A. D.; Tutschka, P. J.; Santos, G. W. (1981):

Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. II. Induction of specific alloantigen unresponsiveness mediated by a nylon wool adherent suppressor cell.

J. Immunol. 126 (3): 961-968.

- Hoffmann, R. M.; Kruis, W. (2002):
Probiotics and prebiotics-a renaissance?
Internist (Berl.) 43 (11): 1400-1406.
- HogenEsch, H.; Thompson, S.; Dunham, A.; Ceddia, M.; Hayek, M. (2004):
Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study.
Vet. Immunol. Immunopathol. 97 (1-2): 77-85.
- Inan, M. S.; Rasoulpour, R. J.; Yin, L.; Hubbard, A. K.; Rosenberg, D. W.; Giardina, C. (2000):
The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line.
Gastroenterology 118 (4): 724-734.
- Iotzova, G. (2005):
"Null" phenotype of persistently KSHV-infected B-Lymphocytes.
München, Ludwig-Maximilians-Universität. Dissertation.
- Ishikawa, H.; Akedo, I.; Umesaki, Y.; Tanaka, R.; Imaoka, A.; Otani, T. (2003):
Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis.
J. Am. Coll. Nutr. 22 (1): 56-63.
- Ishikawa, H.; Baba, E.; Matsumoto, H. (1982):
Studies on bacterial flora of the alimentary tract of dogs. III. Fecal flora in clinical and experimental cases of diarrhea (author's transl).
Nippon Juigaku Zasshi 44 (2): 343-347.
- Isolauri, E. (2001):
Probiotics in human disease.
Am. J. Clin. Nutr. 73 (6): 1142S-1146S.
- Isolauri, E.; Sutas, Y.; Kankaanpaa, P.; Arvilommi, H.; Salminen, S. (2001):
Probiotics: effects on immunity.
Am. J. Clin. Nutr. 73 (2 Suppl): 444S-450S.
- Jergens, A. E. (1999):
Inflammatory bowel disease. Current perspectives.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 29 (2): 501-521, vii.
- Jergens, A. E.; Moore, F. M.; Kaiser, M. S.; Haynes, J. S.; Kinyon, J. M. (1996):
Morphometric evaluation of immunoglobulin A-containing and immunoglobulin G-containing cells and T cells in duodenal mucosa from healthy dogs and from dogs with inflammatory bowel disease or nonspecific gastroenteritis.
Am. J. Vet. Res. 57 (5): 697-704.
- Jergens, A. E.; Schreiner, C. A.; Frank, D. E.; Niyo, Y.; Ahrens, F. E.; Eckersall, P. D.; Benson, T. J.; Evans, R. (2003):
A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease.
J. Vet. Intern. Med. 17 (3): 291-297.

- Jiang, T.; Mustapha, A.; Savaiano, D. A. (1996):
Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*.
J. Dairy Sci. 79 (5): 750-757.
- Jijon, H.; Backer, J.; Diaz, H.; Yeung, H.; Thiel, D.; McKaigney, C.; De Simone, C.; Madsen, K. (2004):
DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function.
Gastroenterology 126 (5): 1358-1373.
- Johansson, M. L.; Molin, G.; Jeppsson, B.; Nobaek, S.; Ahrne, S.; Bengmark, S. (1993):
Administration of different Lactobacillus strains in fermented oatmeal soup: *in vivo* colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora.
Appl. Environ. Microbiol. 59 (1): 15-20.
- Johnston, K. L. (1999):
Small intestinal bacterial overgrowth.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 29 (2): 523-550, vii.
- Jungi, T. W. (2000):
Klinische Veterinärimmunologie.
Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag GmbH
- Kanasugi, H.; Hasegawa, T.; Goto, Y.; Ohtsuka, H.; Makimura, S.; Yamamoto, T. (1997):
Single administration of enterococcal preparation (FK-23) augments non-specific immune responses in healthy dogs.
Int. J. Immunopharmacol. 19 (11-12): 655-659.
- Kato, I.; Tanaka, K.; Yokokura, T. (1999):
Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes.
Int. J. Immunopharmacol. 21 (2): 121-131.
- Kato, K.; Mizuno, S.; Umesaki, Y.; Ishii, Y.; Sugitani, M.; Imaoka, A.; Otsuka, M.; Hasunuma, O.; Kurihara, R.; Iwasaki, A.; Arakawa, Y. (2004):
Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis.
Aliment. Pharmacol. Ther. 20 (10): 1133-1141.
- Kealy, J. K. (1991):
Röntgendiagnostik bei Hund und Katze. 2. Auflage.
Stuttgart: Enke Verlag
- Keighley, M. R.; Arabi, Y.; Dimock, F.; Burdon, D. W.; Allan, R. N.; Alexander-Williams, J. (1978):
Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora.
Gut 19 (12): 1099-1104.
- Kidd, P. (2003):
Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease.
Altern. Med. Rev. 8 (3): 223-246.

- Kim, H. W.; Chew, B. P.; Wong, T. S.; Park, J. S.; Weng, B. B.; Byrne, K. M.; Hayek, M. G.; Reinhart, G. A. (2000):
Dietary lutein stimulates immune response in the canine.
Vet. Immunol. Immunopathol. 74 (3-4): 315-327.
- Kimmel, S. E.; Waddell, L. S.; Michel, K. E. (2000):
Hypomagnesemia and hypocalcemia associated with protein-losing enteropathy in Yorkshire terriers: five cases (1992-1998).
J. Am. Vet. Med. Assoc. 217 (5): 703-706.
- Kjelgaard-Hansen, M.; Kristensen, A. T.; Jensen, A. L. (2003):
Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum.
J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 50 (3): 164-168.
- Klär, I. (2008):
Einfluss der Verfütterung des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415 im frühen postnatalen Stadium auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Mikrobiota bei Ferkeln.
Berlin, Freie Universität Berlin. Dissertation.
- Kleinschmidt, S.; Meneses, F.; Nolte, I.; Hewicker-Trautwein, M. (2006):
Retrospective study on the diagnostic value of full-thickness biopsies from the stomach and intestines of dogs with chronic gastrointestinal disease symptoms.
Vet. Pathol. 43 (6): 1000-1003.
- Kleinschmidt, S.; Meneses, F.; Nolte, I.; Hewicker-Trautwein, M. (2007):
Characterization of mast cell numbers and subtypes in biopsies from the gastrointestinal tract of dogs with lymphocytic-plasmacytic or eosinophilic gastroenterocolitis.
Vet. Immunol. Immunopathol. 120 (3-4): 80-92.
- Koenen, M. E.; Kramer, J.; van der Hulst, R.; Heres, L.; Jeurissen, S. H.; Boersma, W. J. (2004):
Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens.
Br. Poult. Sci. 45 (3): 355-366.
- Kogure, K.; Suemoto, M.; Tagawa, M.; Kurokawa, K. (1976):
Clinical evaluation of bifidobacterial preparation (R-103) in diarrhea in dogs.
J. Jap. Vet. Med. Assoc. 29: 439-442.
- Kraft, W.; Dürr, U. M. (2005):
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 6. Auflage.
Stuttgart: Schattauer
- Kruis, W. (2004):
Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease.
Aliment. Pharmacol. Ther. 20 (Suppl 4): 75-78.

- Kruis, W.; Fric, P.; Pokrotnieks, J.; Lukas, M.; Fixa, B.; Kascak, M.; Kamm, M. A.; Weismueller, J.; Beglinger, C.; Stolte, M.; Wolff, C.; Schulze, J. (2004):
Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine.
Gut 53 (11): 1617-1623.
- Kruis, W.; Schutz, E.; Fric, P.; Fixa, B.; Judmaier, G.; Stolte, M. (1997):
Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis.
Aliment. Pharmacol. Ther. 11 (5): 853-858.
- Kuhn, R.; Lohler, J.; Rennick, D.; Rajewsky, K.; Muller, W. (1993):
Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis.
Cell 75 (2): 263-274.
- Kull, P. A.; Hess, R. S.; Craig, L. E.; Saunders, H. M.; Washabau, R. J. (2001):
Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic characteristics of intestinal lymphangiectasia in dogs: 17 cases (1996-1998).
J. Am. Vet. Med. Assoc. 219 (2): 197-202.
- Kuwabara, M.; Nariai, Y.; Horiuchi, Y.; Hirano, Y.; Miyamori, M.; Yamashita, N.; Iizuka, T. (2005):
Preventive effects of *Bacillus subtilis* DB9011 administration on post-surgical cell-mediated immunosuppression in dogs.
J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 58: 687-691.
- Laake, K. O.; Bjorneklett, A.; Aamodt, G.; Aabakken, L.; Jacobsen, M.; Bakka, A.; Vatn, M. H. (2005):
Outcome of four weeks' intervention with probiotics on symptoms and endoscopic appearance after surgical reconstruction with a J-configured ileal-pouch-anal-anastomosis in ulcerative colitis.
Scand. J. Gastroenterol. 40 (1): 43-51.
- Laflamme, D. P. (1997):
Development and validation of a body condition score system for dogs.
Canine Pract. 22: 10-15.
- Lamb, C. R. (1990):
Abdominal ultrasonography in small animals: Intestinal tract and mesentery, kidneys, adrenal glands, uterus and prostate.
J. Small Anim. Pract. 31: 295-304.
- Lanza, L.; Scudeletti, M.; Puppo, F.; Bosco, O.; Peirano, L.; Filaci, G.; Fecarotta, E.; Vidali, G.; Indiveri, F. (1996):
Prednisone increases apoptosis in in vitro activated human peripheral blood T lymphocytes.
Clin. Exp. Immunol. 103 (3): 482-490.
- Leahy, S. C.; Higgins, D. G.; Fitzgerald, G. F.; van Sinderen, D. (2005):
Getting better with bifidobacteria.
J. Appl. Microbiol. 98 (6): 1303-1315.

- Lee, Y.-K.; Salminen, S. (1995):
The coming of age of probiotics.
Trends Food Sci. Technol. 6 (7): 241-245.
- Lehrer, S. B.; Horner, W. E.; Reese, G. (1996):
Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology.
Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36: 553-564.
- Leib, M. S. (2000):
Chronic colitis in dogs.
In: Kirk's current veterinary therapy
Small animal practice. / J. D. Bonagura (Hrsg.).
Philadelphia: W. B. Saunders Company. S. 643-648.
- Leimer, J. (1981):
Occurrence of various bacterial species in the intestinal flora of the dog.
Wien. Tierärztl. Monatsschr. 68 (8/9): 314-315.
- Levine, J. S.; Allen, R. H.; Alpers, D. H.; Seetharam, B. (1984):
Immunocytochemical localization of the intrinsic factor-cobalamin receptor in dog-ileum:
distribution of intracellular receptor during cell maturation.
J. Cell Biol. 98 (3): 1111-1118.
- Lievin, V.; Peiffer, I.; Hudault, S.; Rochat, F.; Brassart, D.; Neeser, J. R.; Servin, A. L. (2000):
Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity.
Gut 47 (5): 646-652.
- Littman, M. P.; Dambach, D. M.; Vaden, S. L.; Giger, U. (2000):
Familial protein-losing enteropathy and protein-losing nephropathy in Soft Coated Wheaten Terriers: 222 cases (1983-1997).
J. Vet. Intern. Med. 14 (1): 68-80.
- Loftus, E. V., Jr.; Sandborn, W. J. (2002):
Epidemiology of inflammatory bowel disease.
Gastroenterol. Clin. North Am. 31 (1): 1-20.
- Luckschander, N.; Hall, J. A.; Gaschen, F.; Forster, U.; Wenzlow, N.; Hermann, P.; Allenspach, K.; Dobbelaere, D.; Burgener, I. A.; Welle, M. (2010):
Activation of nuclear factor-kappaB in dogs with chronic enteropathies.
Vet. Immunol. Immunopathol. 133 (2-4): 228-236.
- Lüerssen, D.; Janthur, M. (1998):
Bauch- und Beckenhöhle.
In: Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze. / C. Poulsen Nautrup und R. Tobias (Hrsg.).
Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG. S. 165-181.

- Lyons, S. R.; Griffen, A. L.; Leys, E. J. (2000):
Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria.
J. Clin. Microbiol. 38 (6): 2362-2365.
- Madsen, K.; Cornish, A.; Soper, P.; McKaigney, C.; Jijon, H.; Yachimec, C.; Doyle, J.; Jewell, L.; De Simone, C. (2001):
Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function.
Gastroenterol. 121 (3): 580-591.
- Madsen, K. L.; Doyle, J. S.; Jewell, L. D.; Tavernini, M. M.; Fedorak, R. N. (1999):
Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice.
Gastroenterol. 116 (5): 1107-1114.
- Malchow, H. A. (1997):
Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?
J. Clin. Gastroenterol. 25 (4): 653-658.
- Marcinakova, M.; Simonova, M.; Stropfova, V.; Laukova, A. (2006):
Oral application of *Enterococcus faecium* strain EE3 in healthy dogs.
Folia Microbiol. (Praha) 51 (3): 239-242.
- Marsella, R. (2009):
Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs.
Am. J. Vet. Res. 70 (6): 735-740.
- Marteau, P.; Flourie, B.; Pochart, P.; Chastang, C.; Desjeux, J. F.; Rambaud, J. C. (1990):
Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an *in vivo* study in lactase-deficient humans.
Br. J. Nutr. 64 (1): 71-79.
- Matsuki, T.; Watanabe, K.; Fujimoto, J.; Takada, T.; Tanaka, R. (2004):
Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces.
Appl. Environ. Microbiol. 70 (12): 7220-7228.
- Matteuzzi, D.; Crociani, F.; Brigidi, P. (1983):
Antimicrobial susceptibility of Bifidobacterium.
Ann. Microbiol. (Paris) 134A (3): 339-349.
- McCann, T. M.; Ridyard, A. E.; Else, R. W.; Simpson, J. W. (2007):
Evaluation of disease activity markers in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease.
J. Small Anim. Pract. 48 (11): 620-625.
- McMahon, L. A.; House, A. K.; Catchpole, B.; Elson-Riggins, J.; Riddle, A.; Smith, K.; Werling, D.; Burgener, I. A.; Allenspach, K. (2010):
Expression of Toll-like receptor 2 in duodenal biopsies from dogs with inflammatory bowel disease is associated with severity of disease.
Vet. Immunol. Immunopathol. 135 (1-2): 158-163.

- Mead, G. C. (1992):
Principles involved in the detection and enumeration of clostridia in foods.
Int. J. Food Microbiol. 17 (2): 135-143.
- Meile, L.; Le Blay, G.; Thierry, A. (2008):
Safety assessment of dairy microorganisms: Propionibacterium and Bifidobacterium.
Int. J. Food Microbiol. 126 (3): 316-320.
- Mentula, S.; Harmoinen, J.; Heikkila, M.; Westermarck, E.; Rautio, M.; Huovinen, P.; Kononen, E. (2005):
Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs.
Appl. Environ. Microbiol. 71 (8): 4169-4175.
- Metchnikoff, I. I. (1907):
The prolongation of life: optimistic studies. 1. Auflage.
London: William Heinemann
- Meyer, H.; Zentek, J. (2010):
Ernährung des Hundes, Grundlagen - Fütterung - Diätetik. 6. Auflage.
Stuttgart: Parey Verlag
- Miller, L. G.; Finegold, S. M. (1967):
Antibacterial sensitivity of Bifidobacterium (*Lactobacillus bifidus*).
J. Bacteriol. 93 (1): 125-130.
- Mimura, T.; Rizzello, F.; Helwig, U.; Poggioli, G.; Schreiber, S.; Talbot, I. C.; Nicholls, R. J.; Gionchetti, P.; Campieri, M.; Kamm, M. A. (2004):
Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis.
Gut 53 (1): 108-114.
- Misseghers, B. S.; Binnington, A. G.; Mathews, K. A. (2000):
Clinical observations of the treatment of canine perianal fistulas with topical tacrolimus in 10 dogs.
Can. Vet. J. 41 (8): 623-627.
- Mitsuoka, T.; Kimura, N.; Kobayashi, A. (1976):
Studies on the composition of the fecal flora of healthy dogs with the special references of Lactobacillus flora and Bifidobacterium flora (author's transl).
Zentralbl. Bakteriol. [Orig. A] 235 (4): 485-493.
- Modler, H. W. (1994):
Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications.
Int. Dairy J. 4 (5): 383-407.
- Molitor, D. (1996):
In vitro- und *in vivo*-Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) als Futterzusatz bei Hunden.
Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover. Dissertation.

- Montes, A. J.; Pugh, D. G. (1993):
The use of probiotics in food-animal practice.
Vet. Med. 88: 282-288.
- Moon, G.; Myung, S. J.; Jeong, J. Y.; Yang, S. K.; Cho, Y. K.; Lee, S. M.; Chang, H. S.;
Byeon, J. S.; Lee, Y. J.; Lee, G. H.; Hong, W. S.; Kim, J. H.; Min, Y. I.; Kim, J. S. (2004):
Prophylactic effect of Lactobacillus GG in animal colitis and its effect on cytokine secretion
and mucin gene expressions.
Korean J. Gastroenterol. 43 (4): 234-245.
- Moore, W. E.; Cato, E. P.; Holdeman, L. V. (1969):
Anaerobic bacteria of the gastrointestinal flora and their occurrence in clinical infections.
J. Infect. Dis. 119 (6): 641-649.
- Moreau, M. C.; Gaboriau-Routhiau, V. (2000):
Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-
associated lymphoid tissue.
In: Probiotics 3: Immunomodulation by the gut microflora and probiotics. / R. Fuller und G.
Perdigon (Hrsg.).
Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. S. 69-114.
- Morgan, L. W.; McConnell, J. (1999):
Cobalamin deficiency associated with erythroblastic anemia and methylmalonic aciduria in a
border collie.
J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 35 (5): 392-395.
- Mortensen, P. B.; Clausen, M. R. (1996):
Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease.
Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 216 (Suppl 31): 132-148.
- Mowat, A. M.; Parker, L. A.; Beacock-Sharp, H.; Millington, O. R.; Chirido, F. (2004):
Oral tolerance: overview and historical perspectives.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 1029: 1-8.
- Mück, S. (2007):
Einsatz von *Enterococcus faecium* DSM 7134 beim adulten Hund.
Wien, Veterinärmedizinische Universität Wien. Dissertation.
- Münster, M.; Hörauf, A.; Bilzer, T. (2006):
Assessment of disease severity and outcome of dietary, antibiotic, and immunosuppressive
interventions by use of the canine IBD activity index in 21 dogs with chronic inflammatory
bowel disease.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 119 (11-12): 493-505.
- Murphy, K. M.; Travers, P.; Walport, M. (2009):
Janeway Immunologie. 7. Auflage.
Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH

- Nelson, R. W., Couto, C. G. (2010):
Untersuchungen des Verdauungsapparates.
In: Innere Medizin der Kleintiere. / R. W. Nelson, Couto, C. G. (Hrsg.).
München, Jena: Elsevier GmbH. S. 390-410.
- Neumann, E.; Oliveira, M. A.; Cabral, C. M.; Moura, L. N.; Nicoli, J. R.; Vieira, E. C.; Cara, D. C.; Podoprigora, G. I.; Vieira, L. Q. (1998):
Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice.
Braz. J. Med. Biol. Res. 31 (12): 1565-1573.
- Niessner, M.; Volk, B. A. (1995):
Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR).
Clin. Exp. Immunol. 101 (3): 428-435.
- O'Mahony, L.; Feeney, M.; O'Halloran, S.; Murphy, L.; Kiely, B.; Fitzgibbon, J.; Lee, G.; O'Sullivan, G.; Shanahan, F.; Collins, J. K. (2001):
Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice.
Aliment. Pharmacol. Ther. 15: 1219-1225.
- Ogura, Y.; Bonen, D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran, T.; Karaliuskas, R.; Duerr, R. H.; Achkar, J. P.; Brant, S. R.; Bayless, T. M.; Kirschner, B. S.; Hanauer, S. B.; Nunez, G.; Cho, J. H. (2001):
A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.
Nature 411 (6837): 603-606.
- Orth, T.; Peters, M.; Schlaak, J. F.; Krummenauer, F.; Wanitschke, R.; Mayet, W. J.; Galle, P. R.; Neurath, M. F. (2000):
Mycophenolate mofetil versus azathioprine in patients with chronic active ulcerative colitis: a 12-month pilot study.
Am. J. Gastroenterol. 95 (5): 1201-1207.
- Osman, N.; Adawi, D.; Ahrne, S.; Jeppsson, B.; Molin, G. (2004):
Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.
Dig. Dis. Sci. 49 (2): 320-327.
- Ott, S. J.; Musfeldt, M.; Wenderoth, D. F.; Hampe, J.; Brant, O.; Folsch, U. R.; Timmis, K. N.; Schreiber, S. (2004):
Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease.
Gut 53 (5): 685-693.
- Otte, J. M.; Podolsky, D. K. (2004):
Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms.
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 286 (4): G613-G626.

- Ouwehand, A.; Isolauri, E.; Salminen, S. (2002a):
The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood.
Eur. J. Nutr. 41 (Suppl. 1): I32-I37.
- Ouwehand, A. C.; Salminen, S.; Isolauri, E. (2002b):
Probiotics: an overview of beneficial effects.
Antonie Van Leeuwenhoek 82 (1-4): 279-289.
- Parente, F.; Greco, S.; Molteni, M.; Anderloni, A.; Maconi, G.; Bianchi Porro, G. (2004):
Modern imaging of Crohn's disease using bowel ultrasound.
Inflamm. Bowel Dis. 10 (4): 452-461.
- Parvez, S.; Malik, K. A.; Ah Kang, S.; Kim, H. Y. (2006):
Probiotics and their fermented food products are beneficial for health.
J. Appl. Microbiol. 100 (6): 1171-1185.
- Pascher, M. (2004):
Effekte eines probiotischen Laktobazillus-Stammes (*Lactobacillus acidophilus*) auf verdauungsphysiologische Parameter von Hunden.
Wien, Veterinärmedizinische Universität Wien. Dissertation.
- Pascher, M.; Hellweg, P.; Khol-Parisini, A.; Zentek, J. (2008):
Effects of a probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain on feed tolerance in dogs with non-specific dietary sensitivity.
Arch. Anim. Nutr. 62 (2): 107-116.
- Pasupathy, K.; Sahoo, A.; Pathak, N. N. (2001):
Effect of lactobacillus supplementation on growth and nutrient utilization in mongrel pups.
Arch. Tierernähr. 55 (3): 243-253.
- Patel, R. N.; Attur, M. G.; Dave, M. N.; Patel, I. V.; Stuchin, S. A.; Abramson, S. B.; Amin, A. R. (1999):
A novel mechanism of action of chemically modified tetracyclines: inhibition of COX-2-mediated prostaglandin E2 production.
J. Immunol. 163 (6): 3459-3467.
- Paterson, S. (1995):
Food hypersensitivity in 20 dogs with skin and gastrointestinal signs.
J. Small Anim. Pract. 36 (12): 529-534.
- Pelto, L.; Isolauri, E.; Lilius, E. M.; Nuutila, J.; Salminen, S. (1998):
Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects.
Clin. Exp. Allergy 28 (12): 1474-1479.
- Penninck, D. G.; Nyland, T. G.; Fischer, P. E.; Kerr, L. Y. (1989):
Ultrasonography of the normal canine gastrointestinal tract.
Vet. Radiol. 30: 272-276.

- Perdigon, G.; Maldonado Galdeano, C.; Valdez, J. C.; Medici, M. (2002):
Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system.
Eur. J. Clin. Nutr. 56 (Suppl. 4): S21-S26.
- Pessi, T.; Sutas, Y.; Hurme, M.; Isolauri, E. (2000):
Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG.
Clin. Exp. Allergy 30 (12): 1804-1808.
- Pibot, P.; Biourge, V.; Elliott, D. (2006):
Enzyklopädie der klinischen Diätetik des Hundes.
Paris: Aniwa SAS
- Picard, C.; Fioramonti, J.; Francois, A.; Robinson, T.; Neant, F.; Matuchansky, C. (2005):
Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits.
Aliment. Pharmacol. Ther. 22 (6): 495-512.
- Playfair, J. H. L.; Baron, D. (1995):
Immunologie. 5. Auflage.
Berlin, Wien: Blackwell Wissenschaftsverlag
- Plumb, D. C. (2011):
Plumb's Veterinary Drug Handbook. 7. Auflage.
Ames: Iowa State University Press
- Radford-Smith, G. L.; Taylor, P.; Florin, T. H. (1999):
Mycophenolate mofetil in IBD patients.
Lancet 354 (9187): 1386-1387.
- Rasic, J. L.; Kurmann, J. A. (1983):
Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and
technological aspects and bibliography.
Experientia Suppl. 39: 1-295.
- Rembacken, B. J.; Snelling, A. M.; Hawkey, P. M.; Chalmers, D. M.; Axon, A. T. (1999):
Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a
randomised trial.
Lancet 354 (9179): 635-639.
- Ridgway, J.; Jergens, A. E.; Niyo, Y. (2001):
Possible causal association of idiopathic inflammatory bowel disease with thrombocytopenia
in the dog.
J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 37 (1): 65-74.
- Ridyard, A. E.; Nuttall, T. J.; Else, R. W.; Simpson, J. W.; Miller, H. R. (2002):
Evaluation of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine mRNA expression within the
colonic mucosa of dogs with idiopathic lymphocytic-plasmacytic colitis.
Vet. Immunol. Immunopathol. 86 (3-4): 205-214.

Riemann, J. F.; Martin, W.-R. (1996):
Morbus Crohn.

In: Klinische Gastroenterologie. / E. G. Hahn und J. F. Riemann (Hrsg.).
Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S. 881-904.

Rinkinen, M.; Jalava, K.; Westermarck, E.; Salminen, S.; Ouwehand, A. C. (2003a):
Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor
for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?
Vet. Microbiol. 92 (1-2): 111-119.

Rinkinen, M.; Westermarck, E.; Salminen, S.; Ouwehand, A. C. (2003b):
Absence of host specificity for *in vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal
mucus.
Vet. Microbiol. 97 (1-2): 55-61.

Roberfroid, M. B. (1996):
Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory
fructooligosaccharides.
Nutr. Rev. 54 (11 Pt 2): S38-S42.

Roberfroid, M. B.; Bornet, F.; Bouley, C.; Cummings, J. H. (1995):
Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusions of an International Life
Sciences Institute (ILSI) [Europe] workshop held in Barcelona, Spain.
Nutr. Rev. 53 (5): 127-130.

Rolfe, R. D. (2000):
The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health.
J. Nutr. 130 (2S Suppl.): 396S-402S.

Rolle, M.; Mayr, A. (2007):
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Auflage.
Stuttgart: Enke Verlag

Rosser, E. J., Jr. (1993):
Diagnosis of food allergy in dogs.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 203 (2): 259-262.

Rowland, I. R.; Grasso, P. (1975):
Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria.
Appl. Microbiol. 29 (1): 7-12.

Ruaux, C. G.; Steiner, J. M.; Williams, D. A. (2001a):
Biochemical markers of cobalamin deficiency accompanying severe hypo-cobalaminemia in
the cat.
J. Vet. Intern. Med. 15: 272.

Ruaux, C. G.; Steiner, J. M.; Williams, D. A. (2001b):
Metabolism of amino acids in cats with severe cobalamin deficiency.
Am. J. Vet. Res. 62 (12): 1852-1858.

- Rudorf, H.; van Schaik, G.; O'Brien, R. T.; Brown, P. J.; Barr, F. J.; Hall, E. J. (2005):
Ultrasonographic evaluation of the thickness of the small intestinal wall in dogs with
inflammatory bowel disease.
J. Small Anim. Pract. 46 (7): 322-326.
- Ruseler van Embden, J. G. H.; Schouten, W. R.; van Lieshout, L. M. C. (1994):
Pouchitis: result of microbial imbalance?
Gut 35: 658-664.
- Rutgers, H. C.; Batt, R. M.; Elwood, C. M.; Lamport, A. (1995):
Small intestinal bacterial overgrowth in dogs with chronic intestinal disease.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 206 (2): 187-193.
- Saarela, M.; Mogensen, G.; Fonden, R.; Matto, J.; Mattila-Sandholm, T. (2000):
Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties.
J. Biotechnol. 84 (3): 197-215.
- Saleh, F. A.; El-Sayed, E. M. (2004):
Isolation and characterization of bacteriocins produced by *Bifidobacterium lactis* BB-12 and
Bifidobacterium longum BB-46.
9th Egyptian conference for dairy science and technology, International Agriculture Centre,
Cairo, Egypt, 9.-11. Oktober, Egyptian Society of Dairy Science: 323-337.
- Salminen, S.; Bouley, C.; Boutron-Ruault, M. C.; Cummings, J. H.; Franck, A.; Gibson, G.
R.; Isolauri, E.; Moreau, M. C.; Roberfroid, M.; Rowland, I. (1998a):
Functional food science and gastrointestinal physiology and function.
Br. J. Nutr. 80 (Suppl. 1): S147-S171.
- Salminen, S.; Ouwehand, A. C.; Isolauri, E. (1998b):
Clinical applications of probiotic bacteria.
Int. Dairy J. 8 (5-6): 563-572.
- Sanders, M. E. (2003):
Probiotics: considerations for human health.
Nutr. Rev. 61 (3): 91-99.
- Sartor, R. B. (1997):
Review article: Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation
and arthritis.
Aliment. Pharmacol. Ther. 11 (Suppl. 3): 17-22.
- Sauter, S. N.; Allenspach, K.; Gaschen, F.; Grone, A.; Ontsouka, E.; Blum, J. W. (2005):
Cytokine expression in an *ex vivo* culture system of duodenal samples from dogs with chronic
enteropathies: modulation by probiotic bacteria.
Domest. Anim. Endocrinol. 29 (4): 605-622.
- Sauter, S. N.; Benyacoub, J.; Allenspach, K.; Gaschen, F.; Ontsouka, E.; Reuteler, G.;
Cavadini, C.; Knorr, R.; Blum, J. W. (2006):
Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhoea treated with an
elimination diet.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.) 90 (7-8): 269-277.

- Savage, D. C. (1977):
Interactions between the host and its microbes.
In: Microbial ecology of the gut. / R. T. J. Clarke und T. Bauchop (Hrsg.).
London, New York, San Francisco: Academic Press. S. 277-310.
- Scardovi, V. (1986):
Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924.
In: Bergey's manual of systematic bacteriology. / P. B. Butler, V. M. Vaughn und C. S. Nolley (Hrsg.).
Baltimore: Williams and Wilkins. S. 1418-1434.
- Schlegel, H. G. (2006):
Allgemeine Mikrobiologie. 8. Auflage.
Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Schreiner, N. M. S.; Gaschen, F.; Gröne, A.; Sauter, S. N.; Allenspach, K. (2008):
Clinical Signs, Histology, and CD3-Positive Cells before and after Treatment of Dogs with Chronic Enteropathies.
J. Vet. Intern. Med. 22 (5): 1079-1083.
- Schultz, M.; Veltkamp, C.; Dieleman, L. A.; Grenther, W. B.; Wyrick, P. B.; Tonkonogy, S. L.; Sartor, R. B. (2002):
Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice.
Inflamm. Bowel Dis. 8 (2): 71-80.
- Schulz, S.; Kunz, C. (2002):
Probiotika, Präbiotika, Colonic food - Definitionen und mögliche Einsatzgebiete.
Monatsschr. Kinderheilkd. 150 (7): 808-816.
- Schwierk, V. M.; Steiner, J. M. (2010):
Vitamin-B12-Mangel als Komplikation chronischer Gastrointestinalerkrankungen bei Hund und Katze.
Kleintierpraxis 1: 25-36.
- Scott, D. W.; Miller, W. H.; Griffin, C. E. (1995):
Immunological skin diseases in canine food hypersensitivity.
In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. / (Hrsg.).
Philadelphia: W.B. Saunders Company. S. 528-533.
- Seksik, P.; Rigottier-Gois, L.; Gramet, G. (2001):
Molecular analysis of the fecal flora of patients with inactive colonic Crohn's disease.
Gastroenterol. 120 (5, Suppl. 1): A519.
- Sellon, R. K.; Tonkonogy, S.; Schultz, M.; Dieleman, L. A.; Grenther, W.; Balish, E.; Rennick, D. M.; Sartor, R. B. (1998):
Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice.
Infect. Immun. 66 (11): 5224-5231.

- Shanahan, F. (2001):
Probiotics in inflammatory bowel disease.
Gut 48 (5): 609.
- Shibolet, O.; Karmeli, F.; Eliakim, R.; Swennen, E.; Brigidi, P.; Gionchetti, P.; Campieri, M.; Morgenstern, S.; Rachmilewitz, D. (2002):
Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats.
Inflamm. Bowel Dis. 8 (6): 399-406.
- Shibolet, O.; Podolsky, D. K. (2007):
TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction.
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 292 (6): G1469-G1473.
- Shimamura, S.; Abe, F.; Ishibashi, N.; Miyakawa, H.; Yaeshima, T.; Araya, T.; Tomita, M. (1992):
Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of Bifidobacterium species.
J. Dairy Sci. 75 (12): 3296-3306.
- Shroff, K. E.; Meslin, K.; Cebra, J. J. (1995):
Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut.
Infect. Immun. 63 (10): 3904-3913.
- Shryock, T. R.; Mortensen, J. E.; Baumholtz, M. (1998):
The effects of macrolides on the expression of bacterial virulence mechanisms.
J. Antimicrob. Chemother. 41 (5): 505-512.
- Simpson, K. W. (1994):
Small intestinal bacterial overgrowth.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 205 (3): 405-407.
- Simpson, K. W.; Rishniw, M.; Bellosa, M.; Liotta, J.; Lucio, A.; Baumgart, M.; Czarnecki-Maulden, G.; Benyacoub, J.; Bowman, D. (2009):
Influence of *Enterococcus faecium* SF68 probiotic on giardiasis in dogs.
J. Vet. Intern. Med. 23 (3): 476-481.
- Singh, V. K.; Mehrotra, S.; Agarwal, S. S. (1999):
The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy.
Immunol. Res. 20 (2): 147-161.
- Sissons, J. W. (1989):
Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals - a review.
J. Sci. Food Agric. 49: 1-13.
- Smith, K. M.; Eaton, A. D.; Finlayson, L. M.; Garside, P. (2000):
Oral tolerance.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162 (4): S175-S178.

- Sokol, H.; Seksik, P.; Furet, J. P.; Firmesse, O.; Nion-Larmurier, I.; Beaugerie, L.; Cosnes, J.; Corthier, G.; Marteau, P.; Dore, J. (2009):
Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota.
Inflamm. Bowel Dis. 15 (8): 1183-1189.
- Sonea, I. M.; Jergens, A. E.; Sacco, R. E.; Niyo, Y.; Merten, E.; Kauffman, L. K.; Moore, P. F. (2000):
Flow cytometric analysis of colonic and small intestinal mucosal lymphocytes obtained by endoscopic biopsy in the healthy dog.
Vet. Immunol. Immunopathol. 77 (1-2): 103-119.
- Stavric, S.; Kornegay, E. T. (1995):
Microbial probiotics for pigs and poultry.
In: Biotechnology in animal feeds and animal feeding. / R. J. Wallace und A. Chesson (Hrsg.).
Weinheim, New York: Verlag Chemie. S. 205-231.
- Steiner, J. M. (2005):
Diarrhea.
In: Textbook of veterinary internal medicine. / S. J. Ettinger und E. C. Feldman (Hrsg.).
Philadelphia: W. B. Saunders Company. S. 137-143.
- Steiner, J. M.; Broussard, J.; Mansfield, C. S. (2001):
Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity (cPLI) concentrations in dogs with spontaneous pancreatitis.
J. Vet. Int. Med. 15 (3): 274.
- Stokes, C.; Waly, N. (2006):
Mucosal defence along the gastrointestinal tract of cats and dogs.
Vet. Res. 37 (3): 281-293.
- Stonehewer, J.; Simpson, J. W.; Else, R. W.; Macintyre, N. (1998):
Evaluation of B and T lymphocytes and plasma cells in colonic mucosa from healthy dogs and from dogs with inflammatory bowel disease.
Res. Vet. Sci. 65 (1): 59-63.
- Strompfova, V.; Marcinakova, M.; Simonova, M.; Bogovic-Matijasic, B.; Laukova, A. (2006):
Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs.
Anaerobe 12 (2): 75-79.
- Suchodolski, J. S.; Xenoulis, P. G.; Paddock, C. G.; Steiner, J. M.; Jergens, A. E. (2010):
Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease.
Vet. Microbiol. 142 (3-4): 394-400.
- Suter, P. F. (2006):
Chronische (idiopathische) Dünndarmentzündung (chronic inflammatory bowel disease = IBD).
In: Praktikum der Hundeklinik. / P. F. Suter und B. Kohn (Hrsg.).
Stuttgart: Parey Verlag. S. 721-724.

- Sutherland-Smith, J.; Penninck, D. G.; Keating, J. H.; Webster, C. R. (2007):
Ultrasonographic intestinal hyperechoic mucosal striations in dogs are associated with lacteal dilation.
Vet. Radiol. Ultrasound 48 (1): 51-57.
- Szebeni, B.; Veres, G.; Dezsöfi, A.; Rusai, K.; Vannay, A.; Mraz, M.; Majorova, E.; Arato, A. (2008):
Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease.
Clin. Exp. Immunol. 151 (1): 34-41.
- Tagg, J. R.; Dajani, A. S.; Wannamaker, L. W. (1976):
Bacteriocins of gram-positive bacteria.
Bacteriol. Rev. 40 (3): 722-756.
- Talwalkar, A.; Kailasapathy, K. (2003):
Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen.
J. Dairy Sci. 86 (8): 2537-2546.
- Tamura, Z. (1983):
Nutriology of bifidobacteria.
Bifidobact. Microfl. 2 (1): 3-16.
- Tannock, G. W. (1998):
Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics.
Int. Dairy J. 8 (5-6): 527-533.
- Tissier, H. (1906):
Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin.
Crit. Rev. Soc. Biol. 60: 259-361.
- Tizard, I. R. (2008):
Veterinary Immunology - An Introduction. 7. Auflage.
Philadelphia: W. B. Saunders Company
- Topping, D. L. (1996):
Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria.
Asia Pacific J. Clin. Nutr. 5 (1): 15-19.
- Troeger, H.; Epple, H. J.; Schneider, T.; Wahnschaffe, U.; Ullrich, R.; Burchard, G. D.; Jelinek, T.; Zeitz, M.; Fromm, M.; Schulzke, J. D.; Troeger, H.; Epple, H.-J.; Schneider, T.; Wahnschaffe, U.; Ullrich, R.; Burchard, G.-D.; Jelinek, T.; Zeitz, M.; Fromm, M.; Schulzke, J.-D. (2007):
Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum.[see comment].
Gut 56 (3): 328-335.
- Tumulty, J. W.; Broussard, J. D.; Steiner, J. M.; Peterson, M. E.; Williams, D. A. (2004):
Clinical effects of short-term oral budesonide on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in dogs with inflammatory bowel disease.
J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 40 (2): 120-123.

- Tuohy, K. M.; Probert, H. M.; Smejkal, C. W.; Gibson, G. R. (2003):
Using probiotics and prebiotics to improve gut health.
Drug Discov. Today 8 (15): 692-700.
- Uchida, K.; Ogami, E.; Terrada, A. (1969):
Intestinal microflora of dogs.
Bull. Nippon Vet. Zootechn. College 17: 42-46.
- Vaden, S. L. (1995):
Cyclosporine.
In: Kirk's Current Veterinary Therapy
Small Animal Practice. / J. D. Bonagura (Hrsg.).
Philadelphia: W. B. Saunders Company. S. 73-81.
- Vahjen, W.; Männer, K. (2003):
The effect of a probiotic *Enterococcus faecium* product in diets of healthy dogs on
bacteriological counts of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Clostridium* spp. in faeces.
Arch. Tierernähr. 57 (3): 229-233.
- Vahjen, W.; Taras, D.; Simon, O. (2007):
Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB10415 on cell numbers of total
Enterococcus spp., *E. faecium* and *E. faecalis* in the intestine of piglets.
Curr. Issues Intest. Microbiol. 8 (1): 1-7.
- Van der Steen, I.; Rohde, J.; Zentek, J.; Amtsberg, G. (1997):
Fütterungseinflüsse auf das Vorkommen und die Enterotoxinbildung von *Clostridium*
perfringens im Darmkanal des Hundes.
Kleintierpraxis 42: 871-886.
- Van Kruiningen, H. J.; Montali, R. J.; Strandberg, J. D.; Kirk, R. W. (1965):
A granulomatous colitis of dogs with histologic resemblance to Whipple's disease.
Vet. Pathol. 2 (6): 521-544.
- Veltkamp, C.; Tonkonogy, S. L.; Schultz, M.; Sartor, R. B. (1999):
Lactobacillus plantarum is superior to Lactobacillus GG in preventing colitis in IL-10
deficient mice.
Gastroenterol. 116: A838-A838.
- Ventura, M.; van Sinderen, D.; Fitzgerald, G. F.; Zink, R. (2004):
Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria.
Antonie Van Leeuwenhoek 86 (3): 205-223.
- Venturi, A.; Gionchetti, P.; Rizzello, F.; Johansson, R.; Zucconi, E.; Brigidi, P.; Matteuzzi,
D.; Campieri, M. (1999):
Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data
on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis.
Aliment. Pharmacol. Ther. 13 (8): 1103-1108.
- Vermeire, S.; Van Assche, G.; Rutgeerts, P. (2004):
C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease.
Inflamm. Bowel Dis. 10 (5): 661-665.

- Vesa, T. H.; Marteau, P.; Korpela, R. (2000):
Lactose intolerance.
J. Am. Coll. Nutr. 19 (2 Suppl.): 165S-175S.
- Walkley, H. M.; Neiger, R. (2000):
Accuracy of three non-invasive tests to diagnose small intestinal bacterial overgrowth in dogs.
J. Small Anim. Pract. 41: 478.
- Walter, J.; Hertel, C.; Tannock, G. W.; Lis, C. M.; Munro, K.; Hammes, W. P. (2001):
Detection of Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, and Weissella species in human feces
by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis.
Appl. Environ. Microbiol. 67 (6): 2578-2585.
- Washabau, R. J.; Day, M. J.; Willard, M. D.; Hall, E. J.; Jergens, A. E.; Mansell, J.; Minami,
T.; Bilzer, T. W. (2010):
Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal
inflammation in companion animals.
J. Vet. Intern. Med. 24 (1): 10-26.
- Washabau, R. J.; Holt, D. E. (2005):
Diseases of the large intestine.
In: Textbook of veterinary internal medicine
Diseases of the dog and cat. / S. J. Ettinger und E. C. Feldman (Hrsg.).
Philadelphia: W. B. Saunders Company. S. 1378-1408.
- Weiner, H. L. (1997):
Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases.
Immunol. Today 18 (7): 335-343.
- Weiß, M. (2003):
Wirkungen von *Enterococcus faecium* auf den Organismus neonataler Hundewelpen.
München, Ludwig-Maximilians-Universität München. Dissertation.
- Westermarck, E.; Skrzypczak, T.; Harmoinen, J.; Steiner, J. M.; Ruaux, C. G.; Williams, D.
A.; Eerola, E.; Sundback, P.; Rinkinen, M. (2005a):
Tylosin-responsive chronic diarrhea in dogs.
J. Vet. Intern. Med. 19 (2): 177-186.
- Westermarck, E.; Wiberg, M.; Steiner, J. M.; Williams, D. (2005b):
Exocrine pancreas insufficiency in dogs and cats.
In: Textbook of veterinary internal medicine. / S. J. Ettinger und E. C. Feldman (Hrsg.).
Philadelphia: W. B. Saunders Company. S. 1492-1495.
- Wiberg, M. E.; Nurmi, A. K.; Westermarck, E. (1999):
Serum trypsinlike immunoreactivity measurement for the diagnosis of subclinical exocrine
pancreatic insufficiency.
J. Vet. Intern. Med. 13 (5): 426-432.

- Willard, M. D.; Jergens, A. E.; Duncan, R. B.; Leib, M. S.; McCracken, M. D.; DeNovo, R. C.; Helman, R. G.; Slater, M. R.; Harbison, J. L. (2002):
Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 220 (8): 1177-1182.
- Willard, M. D.; Simpson, R. B.; Cohen, N. D.; Clancy, J. S. (2000):
Effects of dietary fructooligosaccharide on selected bacterial populations in feces of dogs.
Am. J. Vet. Res. 61 (7): 820-825.
- Willard, M. D.; Simpson, R. B.; Delles, E. K.; Cohen, N. D.; Fossum, T. W.; Kolp, D.; Reinhart, G. (1994a):
Effects of dietary supplementation of fructo-oligosaccharides on small intestinal bacterial overgrowth in dogs.
Am. J. Vet. Res. 55 (5): 654-659.
- Willard, M. D.; Simpson, R. B.; Fossum, T. W.; Cohen, N. D.; Delles, E. K.; Kolp, D. L.; Carey, D. P.; Reinhart, G. A. (1994b):
Characterization of naturally developing small intestinal bacterial overgrowth in 16 German shepherd dogs.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 204 (8): 1201-1206.
- Williams, D. A.; Batt, R. M. (1988):
Sensitivity and specificity of radioimmunoassay of serum trypsin-like immunoreactivity for the diagnosis of canine exocrine pancreatic insufficiency.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 192 (2): 195-201.
- Williams, D. A.; Batt, R. M.; McLean, L. (1987):
Bacterial overgrowth in the duodenum of dogs with exocrine pancreatic insufficiency.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 191 (2): 201-206.
- Williams Smith, H. (1965):
Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition.
J. Pathol. Bacteriol. 89 (1): 95-122.
- Winckler, C. (1997):
In-vitro-Untersuchungen zur Wirkung von *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus var. canon* und *Bacillus cereus var. toyoi* auf die intestinale Barriere beim Schwein.
Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen. Dissertation.
- Winckler, C.; Breves, G.; Boll, M.; Daniel, H. (1999):
Characteristics of dipeptide transport in pig jejunum *in vitro*.
J. Comp. Physiol. B. 169 (7): 495-500.
- Yamashita, K.; Fujinaga, T.; Miyamoto, T.; Hagio, M.; Izumisawa, Y.; Kotani, T. (1994):
Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs.
J. Vet. Med. Sci. 56 (3): 487-492.

Yildirim, Z.; Johnson, M. G. (1998):
Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by
Bifidobacterium bifidum NCFB 1454.
J. Food Prot. 61 (1): 47-51.

Zentek, J. (1995):
Influence of diet composition on the microbial activity in the gastro-intestinal tract of dogs. II:
Effects on the microflora in the ileum chyme.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.) 74 (1-2): 53-61.

Zentek, J. (2000):
Bakterienflora des caninen Gastrointestinaltrakts.
Kleintierpraxis 45 (7): 493-568.

Zentek, J.; Hellweg, P.; Khol-Parisini, A.; Weingart, C.; Kohn, B.; Münster, M. (2007):
Chronisch entzündliche gastrointestinale Erkrankungen bei Hund und Katze.
Kleintierpraxis 6: 356-367.

Zentek, J.; Molitor, D.; Kamphues, J. (1998):
Prüfung intestinaler Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) bei Hunden.
Kleintierpraxis 43: 187-197.

Zeyner, A.; Boldt, E. (2006):
Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on
diarrhoea patterns and performance of piglets.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.) 90 (1-2): 25-31.

9 Anhang

Tab. 38: Materialien und Geräte, die zur Entnahme, Aufbereitung und Lagerung der Proben herangezogen wurden

Materialien/Geräte	Hersteller
BLUTRÖHRCHEN	
EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Lithium-Heparin-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serumröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MATERIALIEN ZUR LYMPHOZYTENISOLIERUNG	
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
KÜHLGERÄTE	
Tiefkühltruhe Typ HFC 586 Basic	Heraeus, Herrenberg, Deutschland
Sanyo Ultra Low Temperature Freezer MDF 594	Sanyo, München, Deutschland
Kühlakku	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tab. 39: Geräte, die im Zuge der Differentialdiagnostik verwendet wurden

Geräte	Hersteller
BLUTANALYSEGERÄTE	
Sysmex XT 2000i	Fa. Sysmex Deutschland, Norderstedt, Deutschland
QBC	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Cell-Dyn® 3500 R	Fa. Abbott Deutschland, Wiesbaden, Deutschland
Konelab 30i	Thermo Scientific, München, Deutschland
Roche/Hitachi 911	Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
ZENTRIFUGE	
Megafuge1.0 R	Fa. Hereaus, Herrenberg, Deutschland
RÖNTGengeräte	
Philips Optimus 56/65/80, Version 3.5, Class I, Type B	Philips Medical Systems, Hamburg, Deutschland
Philips Medio 50 CP-H	Philips Medical Systems, Hamburg, Deutschland
R 309 LM	RALCO S.R.L., Biassono, Italien
ULTRASCHALLGERÄTE	
Megas GPX	Esaote, Köln, Deutschland
V. 300, Typ Sigma 110D	Kontron Instruments, Rossdorf, Deutschland
Logiq 500	General Electric Medical Systems, München, Deutschland
Logiq 5 Expert	General Electric Medical Systems, München, Deutschland
ENDOSKOPE	
Pentax EG-2470K	Pentax Europe GmbH, Hamburg, Deutschland
Karl Storz 60118 PKS	KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Olympus CF Typ 18	Olympus, Hamburg, Deutschland
Olympus GIF Typ PQ 20	Olympus, Hamburg, Deutschland
Olympus PCF-140L	Olympus, Hamburg, Deutschland

Tab. 40: Im Rahmen der Studie beauftragte Fremdlabore

Labor	Sitz
IDEXX Vet Med Labor	Ludwigsburg, Deutschland
synlab.vet Labor	Köln, Deutschland
Laboklin	Bad Kissingen, Deutschland
Alomed	Radolfzell-Böhringen, Deutschland
Tierärztliches Labor Freiburg	Freiburg im Breisgau, Deutschland
Zentrum für Pathologie, Labor Prof. Dr. Thomas Bilzer	Düsseldorf, Deutschland

Tab. 41: Materialien und Geräte zur Lymphozytenisolierung und -phänotypisierung

Materialien/Geräte	Hersteller
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll (Biocoll Separating Solution)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
RPMI 1640 Medium (1x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RNase-freie DnaseI (Deoxyribonuclease from bovine pancreas)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumiodid	Invitrogen Life Science, Darmstadt, Deutschland
ANTIKÖRPER	
mouse-anti-dog CD4	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
mouse-anti-dog CD8	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
mouse-anti-dog B-cells	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
rat-anti-canine CD5	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
mouse-anti-rat IgG2a heavy chain-FITC	Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA
goat-anti-mouse IgG1-FITC	Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA
goat-anti-mouse IgG1-FITC	Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA
goat-anti-mouse IgG1-FITC	Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA
GERÄTE	
Autoklav "Varioklav ® Dampfsterilisation Typ 500"	ThermoScientific, München, Deutschland
Zentrifuge "Megafuge 1.OR"	Heraeus, ThermoScientific, München, Deutschland
Brutschrank	Binde, Tuttlingen, Deutschland
Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Software „BD Cell Quest Pro“	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tab. 42: Materialien und Geräte für die vorbereitenden Arbeiten und zur Durchführung einer Real-Time PCR

Materialien/Geräte	Hersteller
WASCHEN DER GLASPERLEN	
Glasperlen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure „Hydrochloric Acid“	J.T. Baker, Deventer, Holland
Autoklav "Varioklav® Dampfsterilisation, Typ 500"	ThermoScientific, München, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
HERSTELLUNG DER GITC-LÖSUNG	
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-Lauroylsarcosine	Fluka Analytical/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Antifoam Y-30 Emulsion	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Dithiothreit-Lösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Guanidinisothiocyanat (GITC)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührer IKA RH-KT/C	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Waage "ACCULAB Sartorius Group Atilon ATL-224-I"	Sartorius Group, Göttingen, Deutschland
Autoklav "Varioklav® Dampfsterilisation, Typ 25 T"	ThermoScientific, München, Deutschland
HERSTELLUNG DER Rnase	
Ribonuclease A	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LAGERUNG DER PROBEN	
Tiefkühltruhe "Heto Ultra Freeze 375"	ThermoScientific, München, Deutschland
Tiefkühltruhe "Typ HFC 586 Basic"	Heraeus, Herrenberg, Deutschland
Tiefkühltruhe "Sanyo Ultra Low Temperature Freezer MDF 594"	Sanyo, München, Deutschland

Materialien/Geräte	Hersteller
DNA-AUFREINIGUNG	
Proteinase K	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Lysis-Puffers B3, Nucleo-Spin® Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
BW-Wasch-Puffer, Nucleo-Spin® Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
B5-Wasch-Puffer, Nucleo-Spin® Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
BE-Elutions-Puffer, Nucleo-Spin® Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Ethanol Rotipuran® ≥99,8% p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Siliziumsäule, Nucleo-Spin® Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Eppendorf-Tubes à 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Biometra TB 1 Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortexer "Lab Dancer S-40"	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge "Biofuge fresco"	Heraeus, Herrenberg, Deutschland
BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION IN DEN PROBEN	
TNE-Buffer	Bio-Rad, München, Deutschland
Hoechst 33258	Bio-Rad, München, Deutschland
NanoDrop® Fluorospectrometer ND 3300	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Software "ND 3300"	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Materialien/Geräte	Hersteller
EINWIEGEN DER PROBEN	
Szintillationsröhrchen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Waage "Sartorius BP 110S"	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage "Sartorius Laboratory Typ L-610"	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage "Sartorius BP 1200"	Sartorius, Göttingen, Deutschland
DNA-EXTRAKTION	
Phenol „Roti®-Phenol/C/I“	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform „Trichlormethan, Rotisolv® HPLC“	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isoamylalkohol Rotipuran® ≥98,5%, p.a. ACS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol „2-Propanol Rotipuran® ≥ 99,8% p.a., ACS, ISO“	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol Rotipuran® 96% p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysis-Puffers T1, Nucleo-Spin® Tissue	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Oak-Ridge®-Zentrifugenröhrchen	Nalgene® Labware als Teil von Thermo Scientific, München, Deutschland
Glaspipetten à 10 und 20 ml	
Pipettierhilfe	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Spritze à 20 ml	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland
Kanüle 14G	Kruuse, Langeskov, Dänemark
Wasserbad "Haake W13, Typ 003-5009"	Thermo Scientific, München, Deutschland
Vortex-Genie 2®, Modell G-560 E	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Retschmühle "Retsch MM 200"	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Zentrifuge "Sorvall® RC 5B Plus, Du Pont"	ThermoScientific, München, Deutschland
Tiefkühltruhe "Sanyo Biomedical Freezer, Modell MDF-U333"	Sanyo, München, Deutschland
Tiefkühltruhe "Typ HFC 586 Basic"	Heraeus, Herrenberg, Deutschland
Tiefkühltruhe "Sanyo Ultra Low Temperature Freezer MDF 594"	Sanyo, München, Deutschland

Materialien/Geräte	Hersteller
	RT-PCR
2x Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
ROX (6-carboxy-X-Rhodamine)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Primer "1512-F"	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer "785-R"	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer "Sg Clept-F"	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer "Sg Clept-R3"	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer "g-Ccoc-F"	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer "g-Ccoc-R"	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer "LAC 1"	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer "LAC 2"	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer "g-Bifid-F"	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer "g-Bifid-R"	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer "MGB Taq Man® Probe"	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
RNasefreies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT-PCR-Gefäße à 0,2 ml und passende Deckel	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Eppendorf-Tubes à 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Automatische 1-Kanal-Transfer-Pipetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen à 10, 100 und 1000 µl	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Thermo Cycler "Stratagene Mx 3000 P™"	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Software "Stratagene Mx Pro"	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

Datum:

- Aktivität:
 - normal geringgradig reduziert
 - mittelgradig reduziert hochgradig reduziert

- Appetit:
 - frisst auf frisst nicht auf, aber mehr als die Hälfte
 - frisst weniger als die Hälfte frisst nicht

- Erbrechen: nein ja
 - wenn ja: 1x 2x 3x öfter

- Kotbeschaffenheit:

	1.Mal	2.Mal	3.Mal	4.Mal	5.Mal
normal					
weich					
sehr weich					
wässrig					

	1.Mal	2.Mal	3.Mal	4.Mal	5.Mal
zusätzlich Blut oder Schleim					

- Kotabsatz heute insgesamt:
 - 1x 2x 3x 4x 5x öfter

- Bemerkungen:

Abb. 14: Tagebuch

Tab. 43: Signalement der Probanden

Hund	Rasse	Geschlecht	Körpermasse zu Studienbeginn [kg]	Geburtsdatum	Studienbeginn	Gruppe
Santo (1)	Mittelschnauzer	m	15,4	15.07.2005	30.01.2007	Plazebogruppe
Zulu (2)	Boxer	wk	22,5	09.05.2004	02.03.2007	Plazebogruppe
Esther (3)	Irish Setter	w	18,8	24.02.2006	04.04.2007	Plazebogruppe
Santos (4)	Husky	m	29	01.01.2005	09.05.2007	Plazebogruppe
Charlie (5)	Cairn-Terrier-Mix	m	8,7	02.07.2006	25.06.2007	Plazebogruppe
Ragi (6)	Zwerg-Langhaar-Teckel	m	4	04.05.2006	30.08.2007	Plazebogruppe
Winni (7)	Dobermann	wk	30	01.06.2006	13.09.2007	Plazebogruppe
Emma G. (8)	Rottweiler	w	35,5	01.01.1999	27.09.2007	Plazebogruppe
Lou (9)	Golden Retriever	m	33	26.05.2004	17.11.2006	Plazebogruppe
Humphrey (10)	Golden Retriever	m	28,3	01.01.2002	23.11.2006	Plazebogruppe
Dusty T. (11)	Labrador	mk	26,5	01.08.2003	24.01.2007	Plazebogruppe
Sam (12)	Labrador	m	30	20.10.2005	15.03.2007	Plazebogruppe
Aladin (13)	Belgischer Schäferhund	mk	41,1	01.01.2002	23.10.2007	Plazebogruppe
Igor (14)	Labrador	m	40	15.10.1998	29.04.2008	Plazebogruppe
Dusty S. (15)	West Highland White Terrier	m	9,5	01.07.1997	06.06.2008	Plazebogruppe
Edda (16)	Berner Sennenhund	wk	32,2	05.11.2006	31.08.2007	Plazebogruppe
Wilson (17)	Golden Retriever	m	28	18.05.2006	19.07.2007	Probiotikagruppe
Elroy (18)	Collie	m	20	15.06.2006	28.07.2007	Probiotikagruppe
Emma N. (19)	Boxer	w	25	01.01.2004	10.08.2007	Probiotikagruppe
Mac (20)	Deutscher Schäferhund	m	33,5	10.08.2000	10.10.2007	Probiotikagruppe
Emma S. (21)	Briard	w	38	21.06.1999	15.12.2007	Probiotikagruppe
Betty (22)	Rottweiler	w	38	26.01.1998	12.02.2008	Probiotikagruppe
Staff (23)	Labrador	m	34	05.01.2005	23.02.2008	Probiotikagruppe
Amun (24)	Bordeaux-Dogge	m	48,6	30.05.2007	29.02.2008	Probiotikagruppe

Hund	Rasse	Geschlecht	Körpermasse zu Studienbeginn [kg]	Geburtsdatum	Studienbeginn	Gruppe
Nicky (25)	West Highland White Terrier	wk	9,9	14.05.2001	23.11.2006	Probiotikagruppe
Anakin (26)	Malinois	m	36,5	20.08.2005	24.11.2006	Probiotikagruppe
Donna (27)	Husky	w	19,95	25.10.2005	08.02.2007	Probiotikagruppe
Goja (28)	Bouvier	w	29	18.02.2005	15.03.2007	Probiotikagruppe
Nils (29)	Rottweiler	m	42	01.07.1997	03.06.2008	Probiotikagruppe
Lisa (30)	Rauhhaarteckel	w	10,3	01.01.2000	23.06.2008	Probiotikagruppe
Wanda (31)	Groenendael	wk	19,95	01.03.2006	11.01.2008	Probiotikagruppe
Schnuke (32)	Mischling	w	14,2	25.03.2006	30.01.2008	Probiotikagruppe

Tab. 44: Vorhandensein anamnestisch erfasster Parameter der in die Studie eingeschlossenen Hunde mit chronischer Enteropathie

Hund	Aktivität	Appetit	Erbrechen	Hämatochezie	Schleim in den Fäzes	Kotkonsistenz	KAF	Gewichtsverlust	Flatulenz	Borborygmus	Bauchschmerzen	Unbehagen	Tenesmus
1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2	0	0	1	k.A.	k.A.	1	1	1	1	1	1	0	k.A.
3	0	1	1	k.A.	k.A.	1	1	1	1	1	0	0	k.A.
4	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
5	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
6	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	k.A.
7	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	k.A.
8	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	k.A.
9	0	0	0	k.A.	1	1	1	1	0	1	1	1	k.A.
10	0	0	0	k.A.	1	1	1	k.A.	0	0	1	1	k.A.
11	0	1	0	k.A.	k.A.	1	1	1	1	1	0	1	k.A.
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	k.A.
13	0	0	0	k.A.	k.A.	1	1	1	1	1	0	1	k.A.
14	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
15	0	1	1	k.A.	1	1	1	1	1	1	1	1	k.A.
16	1	0	0	0	1	1	1	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0
17	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
18	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
19	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
20	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	k.A.
22	1	0	1	k.A.	k.A.	1	1	1	0	1	0	1	1
23	1	1	1	1	k.A.	1	1	0	0	1	0	1	k.A.
24	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
25	1	1	0	k.A.	k.A.	1	1	0	0	1	1	1	k.A.
26	0	0	1	k.A.	k.A.	1	1	1	0	0	0	0	k.A.
27	1	0	1	k.A.	1	1	1	0	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
28	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	k.A.	k.A.	k.A.
29	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
30	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
31	0	1	0	k.A.	k.A.	1	1	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1
32	0	0	0	1	1	1	1	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1

KAF: Kotabsatzfrequenz; 0: Parameter unverändert; 1: Parameter verändert; k.A.: keine Angabe

Tab. 45: Anamnese

Hund	Dauer der Symptome seit [Monate]	Symptomphasen	betroffener Darmabschnitt
1	6	erst intermittierend, dann kontinuierlich	gemischt
2	2	erst 1-2x/Monat, dann 1x/Woche	Dünndarm
3	2	intermittierend	Dünndarm
4	5	kontinuierlich	Dünndarm
5	2	kontinuierlich, unter Therapie	
		intermittierend	gemischt
6	2	intermittierend	gemischt
7	18	4-5x/Jahr	gemischt
8	1	kontinuierlich	Dünndarm
9	12	alle 4-6 Wochen über 2 Wochen	Dünndarm
10	35	2x/Woche	gemischt
11	3	kontinuierlich	Dünndarm
12	17	2x/Woche	gemischt
13	6	kontinuierlich	Dünndarm
14	48	1-2x/Monat	gemischt
15	2	intermittierend	gemischt
16	2	kontinuierlich	Dickdarm
17	12	3-4x im ersten Lebensjahr, Dauer 2-3 Tage	gemischt
18	6	Dauer über 3-4 Tage, nahezu kontinuierlich	gemischt
19	24	6x in 2 Jahren, Abstände werden immer kürzer	gemischt
20	1	kontinuierlich	gemischt
21	7	intermittierend	gemischt
22	3	intermittierend	gemischt
23	36	intermittierend	gemischt
24	1,5	kontinuierlich	gemischt
25	66	intermittierend	gemischt
26	5	intermittierend	gemischt
27		2x/Woche	gemischt
28	18	intermittierend, antibiotikaresponsiv	gemischt
29	1	1x/Woche über 3-4 Tage	gemischt
30	4,5	alle 14 Tage	gemischt
31		2 Tage/Woche	Dickdarm
32		alle 2 Wochen 1 Tag	gemischt

Tab. 46: Befunde der hämatologischen Untersuchung, des Differentialblutbildes und der klinischen Chemie der Hunde 1-8 im Studienverlauf

Gruppe Hund	Plazebo															
	1		2		3		4		5		6		7		8	
Untersuchungstag	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90
WBC [G/l]	11,5		6,8	9,1	9,6	8,5	14,6	8,7	13,9	8,3	8,7	8,4	6,6	5,1	18,2	10,6
HCT [l/l]	0,6		0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4
PLT [G/l]	245,0		338,0	321,0	361,0	287,0	369,0	213,0	222,0	238,0	269,0	276,0	197,0	200,0	604,0	395,0
neutrophile Granulozyten [G/l]	9,4		5,2	5,5	6,7	6,5	7,4		10,0	5,9	3,9	4,3	4,4	3,2	15,6	8,5
eosinophile Granulozyten [G/l]	1,3		0,2	0,1	0,0		0,9	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,5	1,8	0,2
Lymphozyten [G/l]	2,9		2,4	2,9	2,8	1,6	5,7	1,0	3,5	1,8	4,9	3,3	2,1	1,4	4,4	1,7
Monozyten [G/l]	0,2		0,3	0,5	0,6	0,2	0,4	0,7	1,1	0,2	0,9	0,5	0,1	0,1	0,5	0,5
Glukose [mmol/l]	5,9	5,9	5,3	5,5	6,2	5,9	6,0	4,8	5,8	6,2	6,0	5,6	5,6	5,6	4,9	5,7
Calcium [mmol/l]		2,8	2,8	2,7	2,7	2,7		2,7	2,7	2,6	2,9	2,8	2,6	2,7	2,3	2,6
ALT [U/l]	80,0	64,0	49,0	54,0	47,0	49,0	34,0	54,0	43,0	26,0	28,0	42,0	27,0	26,0	26,0	130,0
AP [U/l]	37,0	35,0	47,0	56,0	64,0	53,0	57,0	44,0	71,0	63,0	50,0	39,0	169,0	141,0	57,0	379,0
AST [U/l]	22,0	15,0	30,0	24,0	25,0	24,0	37,0	46,0	31,0	20,0	19,0	20,0	11,0	13,0	38,0	40,0
GLDH [U/l]	1,8	0,5	0,0	0,5	3,9	1,4	0,5	1,9	3,9	2,2	3,1	4,0	2,1	0,5	1,8	23,3
Protein [g/l]	62,2	63,0	65,9	65,1	56,5	56,8	62,8	72,0	61,3	63,2	62,0	60,4	64,9	58,5	41,6	52,2
Albumin [µmol/l]	463,7	475,3	437,6	395,6	444,8	428,9	389,8	536,1	468,0	444,8	460,8	443,4	437,6	453,5	276,8	384,0

WBC: White Blood Cells (Leukozyten); HCT: Hämatokrit; PLT: Platelets (Thrombozyten); ALT: Alanin-Amino-Transferase; AP: Alkalische Phosphatase; AST: Aspartat-Amino-Transferase; GLDH: Glutamat-Dehydrogenase

Tab. 47: Befunde der hämatologischen Untersuchung, des Differentialblutbildes und der klinischen Chemie der Hunde 9-16 im Studienverlauf

Gruppe Hund	Plazebo															
	9		10		11		12		13		14		15		16	
	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90
Untersuchungstag																
WBC [G/l]	8,9	8,8	9,8	12,4	7,4	17,4	10,8	11,8	6,6	9,8	6,9	7,4	7,2	12,0	17,2	8,0
HCT [l/l]	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4
PLT [G/l]	278,0	313,0	418,0	441,0	169,0	216,0	176,0	201,0	466,0	367,0	278,0	248,0	708,0	614,0	352,0	300,0
neutrophile Granulozyten [G/l]											4,8	4,9	5,2	9,7		
eosinophile Granulozyten [G/l]	0,4	0,2	0,6	0,5	0,7	0,2	0,9	0,1	0,9	1,0	1,0	1,0	0,0	0,2		
Lymphozyten [G/l]	3,6	3,6	1,7	2,7	3,1	1,7	2,8	1,5	1,7	1,7	1,5	1,1	0,5	1,3		
Monozyten [G/l]	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2	1,2	0,3	0,7	0,3	0,6	0,1	0,1	0,3	1,0		
Glukose [mmol/l]		6,0	5,4	6,2	6,0	6,2	5,7	5,7	4,2	6,0	5,7	5,1	7,0	7,2	5,5	5,9
Calcium [mmol/l]		2,5	2,5	2,6	2,4	2,4	2,3	2,7	2,3	2,2	2,8	2,9	2,7	2,7		2,7
ALT [U/l]		42,0	64,0	62,0	127,0	1476,0	59,0	64,0	25,4	30,0	64,0	57,0	49,0	104,0	34,0	33,0
AP [U/l]		60,0	32,0	44,0	39,0	2198,0	39,0	87,0	41,0	46,0	101,0	140,0	658,0	3450,0	81,0	79,0
AST [U/l]		27,0	37,0	33,0	42,0	118,0	31,0	17,0	22,5	26,0	19,0	30,0	14,0	16,0		
GLDH [U/l]		1,0	4,3	3,3	9,6	126,3	3,8	6,4	1,3	4,5	0,0	0,5	0,5	11,5		
Protein [g/l]	58,0	55,0	63,0	65,0	57,0	57,0	57,0	67,0	41,0	36,0	59,0	64,0	66,0	63,0	65,0	65,0
Albumin [μ mol/l]	434,7	420,2	420,2	434,7	449,2	463,7	449,2	507,2	275,3	246,3	457,9	433,3	439,0	408,6	573,9	541,9

WBC: White Blood Cells (Leukozyten); HCT: Hämatokrit; PLT: Platelets (Thrombozyten); ALT: Alanin-Amino-Transferase; AP: Alkalische Phosphatase; AST: Aspartat-Amino-Transferase; GLDH: Glutamat-Dehydrogenase

Tab. 48: Befunde der hämatologischen Untersuchung, des Differentialblutbildes und der klinischen Chemie der Hunde 17-24 im Studienverlauf

Gruppe Hund	Probiotikum															
	17		18		19		20		21		22		23		24	
Untersuchungstag	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90
WBC [G/l]	10,5	13,6	10,3	8,3	11,9	10,0	15,9	11,2	6,6	6,5	7,1	10,6	10,6	9,1	15,9	16,8
HCT [l/l]	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
PLT [G/l]	340,0	245,0	311,0	178,0	164,0	202,0	333,0	208,0	325,0	212,0	413,0	251,0	167,0	206,0	188,0	199,0
neutrophile Granulozyten [G/l]	6,3	7,2	4,8	5,3	8,3	6,7	12,1	7,6	3,6	4,2	3,8	6,9	6,3	4,5	10,8	10,3
eosinophile Granulozyten [G/l]	0,1	1,0	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3	0,6	0,7	0,3	0,4	0,4		0,5	1,0	1,3
Lymphozyten [G/l]	3,7	5,2	3,3	2,5	1,8	1,7	1,3	1,5	1,0	1,0	0,9	2,5		3,4	3,7	1,9
Monozyten [G/l]	0,1	0,5	0,3	0,8	0,2	0,4	1,4	0,7	0,4	0,3		0,8		0,3	0,3	0,7
Glukose [mmol/l]	5,0	5,2	4,9	6,3	5,4	6,2	4,6	5,2	6,7	6,4	5,7	4,9	6,0	5,9	5,9	5,8
Calcium [mmol/l]	2,7	2,7	2,8	1,1	2,6	2,6	2,4	2,8	2,4	2,7	2,6	2,5	2,4	2,8	3,0	3,3
ALT [U/l]	38,0	33,0	77,0	36,0	44,0	45,0	36,0	51,0	30,0	66,0	93,0	63,0	256,0	61,0	32,0	39,0
AP [U/l]	46,0	54,0	41,0	46,0	34,0	49,0	79,0	101,0	404,0	532,0	104,0	241,0	65,0	54,0	93,0	73,0
AST [U/l]	26,0	30,0	21,0	17,0	26,0	27,0	21,0	19,0	17,0	26,0	45,0	29,0	30,0	20,0	25,0	28,0
GLDH [U/l]	0,5	4,0	3,8	1,4	1,5	4,5	2,1	0,5	1,7	10,4	29,5	6,6	37,0	3,7	1,8	0,5
Protein [g/l]	68,0	57,0	58,0	59,0	65,0	61,0	69,0	66,0	60,0	63,0	59,0	65,0	43,0	60,0	22,0	78,0
Albumin [µmol/l]	478,2	424,6	415,9	439,0	433,3	386,9	342,0	370,9	404,3	407,2	369,5	382,5	340,5	465,4	399,9	397,0

WBC: White Blood Cells (Leukozyten); HCT: Hämatokrit; PLT: Platelets (Thrombozyten); ALT: Alanin-Amino-Transferase; AP: Alkalische Phosphatase; AST: Aspartat-Amino-Transferase; GLDH: Glutamat-Dehydrogenase

Tab. 49: Befunde der hämatologischen Untersuchung, des Differentialblutbildes und der klinischen Chemie der Hunde 25-32 im Studienverlauf

Gruppe Hund	Probiotikum															
	25		26		27		28		29		30		31		32	
Untersuchungstag	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90
WBC [G/l]	10,4		9,0	11,3	11,7	11,8	6,3	8,5	7,8	5,2	7,7	7,0	5,5	6,2	5,8	11,4
HCT [l/l]	0,5		0,4	0,6	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
PLT [G/l]	300,0		269,0	271,0	264,0	265,0	328,0	290,0	76,0	318,0	266,0	304,0	255,0	302,0	208,0	89,8
neutrophile Granulozyten [G/l]									5,7	3,3	4,5					
eosinophile Granulozyten [G/l]	0,2			0,5	0,4	1,2	0,6	0,8	0,1	0,1	0,2	0,0				
Lymphozyten [G/l]	1,7			3,4	4,1	5,0	1,9	2,2	1,8	1,2	1,8	0,6				
Monozyten [G/l]	0,8			0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,6	0,3	0,3	0,1				
Glukose [mmol/l]	8,3		4,7	5,6		6,7	5,9	6,4	5,6	5,3	6,3	4,5	5,0	4,7	5,4	5,7
Calcium [mmol/l]	2,6		2,4	2,7	2,6	2,6	2,8	2,8	2,7	2,7	3,1		3,1	2,4	2,6	2,6
ALT [U/l]	45,0		75,0	119,0	45,5	29,0	108,0	31,0	32,0	109,0	29,0	61,3	34,0	23,0	56,0	57,0
AP [U/l]	208,0		154,0	87,0	33,0	39,0	605,0	48,0	224,0	314,0	650,0		46,0	49,0	27,0	37,0
AST [U/l]	34,0			39,0	13,6	31,0	36,0	20,0	14,0	82,0	20,0					
GLDH [U/l]	9,0			5,5	2,4	3,2	28,3	3,0	0,5	6,8	0,5					
Protein [g/l]	69,0		57,0	67,0	56,0	56,0	65,0	61,0	66,0	66,0	76,0		67,0	65,0	61,0	61,0
Albumin [µmol/l]	536,1		347,8	449,2	554,7	405,7	478,2	405,7	420,2	431,8	518,7		565,1	539,2	5594,5	518,7

WBC: White Blood Cells (Leukozyten); HCT: Hämatokrit; PLT: Platelets (Thrombozyten); ALT: Alanin-Amino-Transferase; AP: Alkalische Phosphatase; AST: Aspartat-Amino-Transferase; GLDH: Glutamat-Dehydrogenase

Tab. 50: Befunde von Trypsin-like Immunoreactivity, Vitamin B₁₂, Folsäure und C-Reaktives Protein der Hunde 1-8 im Studienverlauf

Gruppe Hund	Plazebo															
	1		2		3		4		5		6		7		8	
Untersuchungstag	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90
TLI [$\mu\text{g/l}$]	29,3		23,9		15,2		19,0		15,7		13,4		15,8		30,3	
Vitamin B ₁₂ [pg/ml]	281,0	796,0	447,0	310,0	379,0	515,0	180,0	2000,0	462,0	517,0	304,0	527,0	498,0	331,0	115,0	2000,0
Folsäure [ng/ml]	13,3	18,1	6,0	10,2	12,5	11,3	11,8	12,3	12,8	12,9	13,6	16,6	9,7	11,8	5,3	13,8
CRP [mg/l]	2,2	1,0	2,5	3,5	2,6	1,0	3,1		1,0	1,0	7,9	2,6	1,0	1,0	13,0	1,0

TLI: Trypsin-like Immunoreactivity; CRP: C-Reaktives Protein

Tab. 51: Befunde von Trypsin-like Immunoreactivity, Vitamin B₁₂, Folsäure und C-Reaktives Protein der Hunde 9-16 im Studienverlauf

Gruppe Hund	Plazebo															
	9		10		11		12		13		14		15		16	
Untersuchungstag	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90
TLI [$\mu\text{g/l}$]	10,5		9,6		14,3 9,8		11,8		13,5		14,6		40,3		16,3 31,2	
Vitamin B ₁₂ [pg/ml]	289,0		440,0 399,0		1128,0 900,0		153,0 210,0		127,0 116,0		377,0 337,0		423,0 841,0		373,0 1176,0	
Folsäure [ng/ml]	9,2		21,0 12,0		9,0 27,0		5,6 7,5		4,5 7,4		19,6 16,0		21,2 24,0		15,5 16,2	
CRP [mg/l]	0,1	62,8	4,3	1,0	1,0	1,0	1,0		1,0		1,0	1,0	1,0	1,5	15,4	1,0

TLI: Trypsin-like Immunoreactivity; CRP: C-Reaktives Protein

Tab. 52: Befunde von Trypsin-like Immunoreactivity, Vitamin B₁₂, Folsäure und C-Reaktives Protein der Hunde 17-24 im Studienverlauf

Gruppe Hund	Probiotikum															
	17		18		19		20		21		22		23		24	
Untersuchungstag	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90
TLI [$\mu\text{g/l}$]	18,0		14,1		>50		16,6		3,1		24,4		6,5		20,3	
Vitamin B ₁₂ [pg/ml]	302,0	405,0	683,0	740,0	408,0	313,0	101,0	375,0	24,0	2000,0	413,0	570,0	355,0	300,0	579,0	360,0
Folsäure [ng/ml]	16,2	13,3	16,4	14,1	12,2	12,9	5,7	20,6	14,9	15,3	10,9	15,7	18,5	>24	17,1	15,1
CRP [mg/l]	2,8	3,0	1,0	1,0	8,5	13,0	104,1	35,0	89,1	69,6	1,8	2,7	89,1	27,0	2,0	11,2

TLI: Trypsin-like Immunoreactivity; CRP: C-Reaktives Protein

Tab. 53: Befunde von Trypsin-like Immunoreactivity, Vitamin B₁₂, Folsäure und C-Reaktives Protein der Hunde 25-32 im Studienverlauf

Gruppe Hund	Probiotikum															
	25		26		27		28		29		30		31		32	
Untersuchungstag	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90
TLI [$\mu\text{g/l}$]	14,3		10,9		17,1		17,4		18,4		21,8		12,9 16,9		16,1 21,9	
Vitamin B ₁₂ [pg/ml]	750,0		473,0	541,0	330,0	269,0	334,0	355,0	354,0	404,0	458,0	864,0	346,0	742,0		
Folsäure [ng/ml]	7,9		10,7	6,6	5,0	6,1	3,2	8,5	15,1	19,9	15,3	16,7	13,7	10,7	13,5	
CRP [mg/l]	4,1	6,9	1,0	8,2	5,3	14,8	1,0	1,7	3,3	1,0	1,0	1,0	4,6	3,3	10,0	

TLI: Trypsin-like Immunoreactivity; CRP: C-Reaktives Protein

Tab. 54: Übersicht über die pathologischen Befunde der Probanden von Röntgen, Ultraschall und Endoskopie

Hund	Röntgenbefund	Ultraschallbefund	Endoskopiebefund
2			Oesophagus mit Galleflüssigkeit gefüllt, gerötet, Kardialia ggr. gerötet und offenstehend, Magenfalten etwas ödematös, Pylorus mit Gallereflux, Duodenum gerötet, viel Galleflüssigkeit, Kolon mit viel Kot gefüllt
3			im Oesophagus Galleflüssigkeit, Kardialia offenstehend, Magen ggr. gerötet, Pylorus offenstehend, Duodenum mgr. gerötet
6	eine gasgefüllte Darmschlinge		
7	ggr. Kardiomegalie		
8	zwei kleine röntgendichte Strukturen	homogene Hepato- und Splenomegalie, im rechten Mesogastrium angespannt, Darmschlingen bis zu 7 mm dick, caudal der rechten Niere zystenähnliche Struktur ca. 1 x 1 cm groß	Magenschleimhaut fleckig gerötet, viel Schaum mit Gallebeimengungen, Peyersche Platten deutlich sichtbar
9		Darmwände bis 5,3 mm, im proximalen Dünndarm dicker als im distalen Dünndarm, vereinzelt mesenteriale Lymphknoten darstellbar	Magen mit Wasser gefüllt, Schleimhaut im Dünndarm mgr. granuliert, ggr. - mgr., fokal fleckige Rötungen in Magen und Dünndarm, mittelgradig granulierter Dünndarm und Magenausgang

Hund	Röntgenbefund	Ultraschallbefund	Endoskopiebefund
10		Darmwände Duodenum 5,1 mm, Kolon descendens bis 2,2 mm	im Magen wenig Galle, Kolon mgr. granuliert, Ausprägung caudal stärker als cranial, Pylorus gerötet, im Kolon distal vereinzelt Erosionen, granuliert, teilweise erosive Kolonschleimhaut
11		Dünndarmwände bis 7mm	Dünndarm abschnittsweise granuliert, im Magen vereinzelt ggr. Erosionen
12	Oesophagus hypomotil, dilatiert bis 1,5 cm	Magenwand im Fundusbereich bis 8,6 mm dick, Wand des Duodenum descendens bis 6,1 mm dick, Lamina muscularis hypertrophiert, Kolonwände <1,6 mm, mesenteriale Lymphknotenpakete 4 x 1 cm	Atonie während gesamter Untersuchung, mgr. Dilatation des Oesophagus, diffuse Rötung der Kardial, Kolon mgr. diffus gerötet, ggr. - mgr. Magenfaltenprotrusion
13		minimaler Aszites, Duodenumwand bis 7,8 mm dick, Kolonwände 2,8 mm dick, mesenteriale Lymphknoten vergrößert, große Milz, deutliche Hyperämie	mgr., fokal fleckige Rötung im Magen und Dünndarm, mgr. - hgr. Faltenprotrusion im Magen, verdickte Mukosa
14	Prostata vergrößert	homogene Prostatahyperplasie 4,5 x 2 cm, Darmschlingen ggr. verdickt (bis zu 3,5 mm)	
15	ggr. Kardiomegalie, Hepatomegalie, gasgefüllte Darmschlingen	Hepatomegalie, ggr. hyperechoisch, Darmschlingen bis zu 4,7 mm dick, Magen mit Luft gefüllt	Magen ggr. gerötet, Duodenum deutlich gerötet
16			Magen- und Darmschleimhaut gerötet und deutlich uneben, Kolonschleimhaut nur bedingt beurteilbar, da noch Kotreste vorhanden
17		Darmwände ggr. verdickt	Magen: im Bereich des Pylorus kleine, gelblich- käsige Auflagerungen, Duodenum: deutlich gerötet, Kolonschleimhaut nicht beurteilbar, da sehr viel Kot im Enddarm

Hund	Röntgenbefund	Ultraschallbefund	Endoskopiebefund
18		Dünndarmschlingen auf 3,2 - 3,9 mm verdickt	Oesophagus generalisiert gerötet, deutliche entzündliche Veränderungen der Schleimhaut vor der Kardie; Magen: flüssigkeitsgefüllt, daher nicht vollständig einsehbar, Schleimhaut ggr. gerötet, Rektum und Kolon nicht leer, daher Schleimhaut nicht überall zu beurteilen
20	vergrößerte Prostata	Prostata hyperplasiert, aber homogen, Leber ragt über den Rippenbogen, Gallenblase deutlich gefüllt, mit viel Sludge, Darmwände bis 4 mm dick	Magen mit viel Flüssigkeit gefüllt, Magenschleimhaut z.T. fleckig mit unregelmäßiger Oberfläche, viel Gras im Magen, Duodenum fleckig gerötet, After geschwollen, ggr. gerötet, mit sehr kleinen perianalen Fisteln, Schleimhaut fleckig verändert
21			Rektum nur z.T. beurteilbar, da Kotreste an der Wand liegen
22	runde Masse dorsocranial der Harnblase im Verbund mit luftgefüllten Darmschlingen, Magen gefüllt mit Futter	sublumbale Struktur (im Röntgen sichtbar) nicht darzustellen	Magen mit massenhaft Gras gefüllt, Pylorus durch die massive Grasfüllung nicht passierbar, Rektum mit massenhaft Sand und Gras gefüllt, Schleimhaut ebenfalls nicht vollständig einsehbar
24		Darmschlingen bis 4 mm	
25	Leber 2 cm über caudalem Rippenbogen, Kotanschoppung Enddarm	Magenwände bis 2,6 mm, Dünndarmwände 4,6 - 4,9 mm, Kolonwände <1,8 mm, mesenteriale Lymphknoten bis 4,7 mm	ggr.- mgr. Oesophagusdilatation, Dünndarm ggr. granuliert, Magen ggr. diffus gerötet, ggr. Magenfaltenprotrusion
26		Duodenumwände bis 5 mm dick, Jejunumwände bis 4,2 mm dick, Kolonwände <2 mm dick	atonischer Magen

Hund	Röntgenbefund	Ultraschallbefund	Endoskopiebefund
27		Dünndarm fokal verdickt, verdickte Darmschlingen und mesenteriale Lymphknoten	Dünndarm mgr. granuliert
28		Hepato- und Splenomegalie, Dünndarmwände < 4 mm, Kolon < 2 mm, Magen wenig tonisch, Magenwände bis 5 mm, Nieren beidseits mit hyperechogenem Randsaum	Magenausgang mit dicken Falten, Kolon mit Kot, Oesophagus- und Antrumperistaltik ggr. erhöht, Magenmukosa mgr. diffus gerötet, Duodenummukosa ggr. - mgr. granuliert, ggr. Antrumfaltenprotrusion
30		Darmwände 3,7 - 4,2 mm, Magenwand auf 5 mm verdickt, Pyloruswand 7 mm, Gallenblasenwand verdickt, Leberränder stumpf	Magenschleimhaut gerötet, Pylorus evtl. mit dilatierten Lymphgefäßen, Rektum mit viel Kot

Tab. 55: CIBDAI der Tiere der Placebogruppe im Studienverlauf

Untersuchungstag	Hund															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
0	8	6	6	8	3	5	7	7	7	2	7	3	7	7	4	6
14	3	3	6	3	2	3	10	2	5	3	4	3	1	1	2	1
30	4	3	6	3	1	2	2	5	1	2	3	1	1	4	3	1
60	5	2	2	1	1	0	1	2	2	2	3	2	3	4	2	3
90	3	2	5	1	1	1	5	4	3	2	1	1	1	2	2	1
Median	4	3	6	3	1	2	5	4	3	2	3	2	1	4	2	1

Tab. 56: CIBDAI der Tiere der Probiotikagruppe im Studienverlauf

Untersuchungstag	Hund															
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
0	9	10	8	15	15	6	14	7	9	10	8	7	5	10	5	2
14	2	3	1	5	2	3	2	3	0	3	5	0	1	2	1	4
30	6	2	1	4	2	3	1	2	1	3	1	1	3	1	2	0
60	2	3	2	4	1	2	1	1	1	2	0	0	4	1	1	0
90	0	3	2	1	8	3	2	6	3	5	1	0	1	0	1	1
Median	2	3	2	4	2	3	2	3	1	3	1	0	3	1	1	1

10 Danksagung

Ich danke...

...Herrn Prof. Zentek dafür, dass ich die Arbeit am Institut für Tierernährung durchführen durfte und für die besondere Unterstützung in der Schlussphase der Arbeit.

...Frau Prof. Kohn und Prof. Brunnberg der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere dafür, dass ich an dieser Einrichtung die Patientenrekrutierung durchführen durfte und Frau Prof. Kohn für die konstruktiven Korrekturvorschläge.

...Dr. Michael Münster der Tierärztlichen Gemeinschaftspraxis in Köln und Dr. Stefan Unterer und Dr. Katrin Strohmeyer an der LMU München für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und die geduldige Beantwortung all meiner Fragen.

...der Firma Eukanuba für die finanzielle und materielle Unterstützung.

...Prof. Bilzer für die histologische Untersuchung meiner Biopsien und die Bereitschaft, trotz immensen Arbeitsaufwandes weitere Untersuchungen durchzuführen.

...meiner Betreuerin Frau Dr. Khol-Parisini, die zunächst am Institut und zum Schluss trotz Erziehungsurlaubs jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, immer ein ermunterndes Wort hatte und nie die Geduld verloren hat. Vielen Dank, Annabella!

...Dr. Claudia Kellermeier, Dr. Christiane Weingart, Dr. Mareike Ottenjann, Dr. Hans Werner, Dr. Christine Fumi, Dr. Ulrike Behrendt und TÄ Susanna Falk für die unermüdliche Unterstützung und die Hilfe bei der Betreuung der Patienten. Ohne diese Menschen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

...Dr. Claudia Röhker, die mich sehr in der Schlussphase unterstützt hat.

...Petra Huck für die Einführung in die Geheimnisse der Lymphozytenisolierung und –phänotypisierung, Dr. Lydia Tedin für die Korrektur des Immunologieteils, Dr. Wilfried Vahjen für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Methoden, der zudem immer gut gelaunt bereit war, mir bei der Lösung von Problemen zu helfen und Marita Eitinger, die jederzeit jegliche Fragen, die im Labor anfielen, beantwortet hat.

...Frau Dr. Arndt und Frau Anja Lüdecke danke ich für die Unterstützung der statistischen Auswertung meiner zugegebenermaßen immensen Datenmengen.

...Stefan Miemietz für die Hilfe bei der Formatierung.

Ganz besonderer Dank geht an unsere Mittagsrunde mit Dr. Susanne Buchheit, Dr. Katrin Kirsch, Beatrice Meyer, Dr. Evelyn Ramelow und Katharina Topp. Mit euch war es leichter!

Dank auch an meine Freundinnen Svenja Ahlborn und Susanne Eiweleit, die immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten und mich zum Durchhalten angespornt haben.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die mich immer und jederzeit unterstützt haben, auch wenn das Kind nach dem langen Studium noch eine Doktorarbeit schreiben wollte. Danke!

11 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.

Birgit Schläfke