

2. Material und Methoden

2.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Kommerziell erhältliche Jungsau- Hybriden Duroc x Deutsche Landrasse (Fa. Hülsenberger Zuchtschweine, Schaumann GmbH) wurden nach Quarantäne und Erreichen der Zuchtreife von den institutseigenen Ebern (Rasse Landrasse x Duroc oder Landrasse x Hampshire) im Natursprung gedeckt.

Die tragenden Sauen wurden, entsprechend ihrer Zugehörigkeit zur Probiotika- bzw. Kontrollgruppe (s. 2.2) räumlich streng getrennt, bis 10d a.p. in Gruppen auf Beton mit Schubstangenentmischung gehalten. Anschließend erfolgte die Umstallung der einzelnen Tiere in Abferkelbuchten mit Stroheinstreu. Hier hatten die Sauen einmal täglich Auslauf im Freien auf befestigtem Boden.

Zur routinemäßigen Gesundheitsprophylaxe gehörte die regelmäßige Impfung gegen das PRRS-Virus sowie eine orale Entwurmung mit Mebendazol. War der Einsatz Antibiotika aus Sicht des Tierschutzes unvermeidlich, wurden die Tiere samt Wurf aus den Versuchsgruppen entfernt. Ebenso fielen Sauen aus der Gruppe, wenn die Wurfgröße 9 lebende Ferkel unterschritt.

Die Ferkel blieben bis zum Alter von 28 Tagen beim Muttertier und wurden dann in Zweier- oder Dreiergruppen in Vollspalten- Flatdeck- Buchten (2 m²) umgestellt.

Das Beleuchtungsprogramm bestand aus 16 Stunden Licht und entsprechend 8 Stunden Dunkelheit. Die Stallungen der Sauen waren auf 21.5°C mit 65% Luftfeuchtigkeit klimatisiert. In den Stallungen der Abgesetzten Ferkel wurde eine Temperatur von 24°C und 70% relative Luftfeuchtigkeit eingestellt.

2.2 Aufteilung der Versuchsgruppen

Der Versuchstierbestand wurde für diese Untersuchungen in insgesamt zwei Gruppen aufgeteilt. Pro Gruppe wurden 10 Sauen in den Versuch aufgenommen, sofern sie eine entsprechende Wurfgröße von mindestens neun lebenden Ferkeln aufwiesen. Aus jeweils der Hälfte der Würfe je Gruppe wurden Tiere für die Tötungen zur Gewinnung der Digesta an den entsprechenden Terminen entnommen (s. 2.5.3).

In der Probiotikagruppe enthielt sowohl Sauenfutter, als auch das Saugferkel- Starterfutter (14. bis 28. Tag ad libitum) und das Alleinfutter für die Absetzferkel (28. bis 70. Tag ad libitum) den probiotischen Keim *Enterococcus faecium* NCIMB 10415, bezogen als Cylactin® über Cerbios-Pharma, Barbengo, Schweiz (Chargen- Nr. AG0551). Die Kontrollgruppe wurde mit Futter gleicher Zusammensetzung (s.u.) ohne Zusatz des Probiotikums gefüttert.

Die Behandlungsvarianten der Versuchsgruppen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2 : Zellzahlen von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 pro kg Futter

	Kontrollgruppe KbE/kg (\pm SD)	Probiotikagruppe KbE/kg (\pm SD)
Tragende Sauen	-	$1.6 (\pm 0.5) \times 10^6$
Laktierende Sauen	-	$1.2 (\pm 0.3) \times 10^6$
Saugferkel	-	$1.7 (\pm 0.8) \times 10^5$
Absetzferkel	-	$2.0 (\pm 0.4) \times 10^5$

2.3 Versuchsdiäten

Tragende Sauen erhielten ab dem 10. Tag vor dem errechneten Geburtstermin, laktierende Sauen bis zum Absetzzeitpunkt (28 Tage p.p.) eine hauptsächlich auf Gerste und Weizen basierende Ration (Futter für tragende Sauen enthielt: ME 10,5 MJ/kg, Rp 124,7g/kg, Lysin 1,5g/kg; Futter für laktierende Sauen enthielt: ME 13,0 MJ/kg, Rp 175g/kg, Lysin 0,8g/kg – Details s. Anhang 6.1, Tab. 12,13).

Das Futter wurde von einem externen Futtermittelhersteller gemischt und bezogen (BKF Belziger Kraftfutter GmbH, Belgig; Zusammensetzung und berechnete Inhaltsstoffe s. Anhang 6.1, Tab. 13,14).

Saugferkeln wurde ab dem 14. Lebenstag eine auf Weizen, Sojaextraktionsschrot und Milchpulver basierende Diät *ad libitum* angeboten. Die abgesetzten Ferkel erhielten eine auf Basis von Weizen und Sojaextraktionsschrot hergestellte Mischung *ad libitum*. Das Futter für Saug- und Absetzferkel wurde am Institut für Tierernährung gemischt.

Je 100 kg Futter wurden 20g *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 - im folgenden auch als Probiotikum bezeichnet - in Form eines mikroverkapselten Granulates (Cylactin® LBC ME10, Chargen- Nr. AG0551, bezogen über Cerbios-Pharma SA, Via Pian Scairolo 6, CH-6917 Barbengo, Schweiz) eingemischt.

Alle Futtermittel wurden entsprechend den Empfehlungen der VDLUFA auf Rohinhaltsstoffe (Trockenmasse, Rohfaser, Rohprotein, Rohfett, Rohasche, Calcium, Phosphor) untersucht (Naumann und Bassler 1993). Die Zusammensetzung und die berechneten Inhaltsstoffe sind aus den Tabellen 13 und 14 in Anhang 6.1 ersichtlich.

2.4 Zootechnische Leistungen

2.4.1 Leistungsdaten der Sauen

Die Zahl lebend- und totgeborener Ferkel, Gewichtsverluste während der Laktation (gemessen jeweils wöchentlich), durchschnittliche tägliche Futteraufnahme (ADFI) sowie Ferkelverluste bis zum Absetzen wurden als Leistungsparameter für die Sauen herangezogen.

2.4.2 Lebendmasse, Futteraufnahme und Futterverwertung der Ferkel

Der durchschnittliche tägliche Lebendmassezuwachs (ADG) wurde bei allen Ferkeln der Versuchsgruppen durch wöchentliche Messungen, geteilt durch 7 Tage, über den gesamten Versuchszeitraum von 8 Wochen berechnet.

Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme (ADFI) wurde durch wöchentliche Futteraufnahme pro Bucht abzüglich der Futterverluste am Automaten geteilt durch die Tierzahl und sieben Tage berechnet.

Das Lebendmassezuwachs : Futteraufnahme – Verhältnis (G:F) wurde als Maß für die Futterverwertung ausgewählt, da im Gegensatz zum Futteraufwand (FCR) unendlich positive wie auch negative Werte bei sistierender Gewichtszunahme oder Gewichtsabnahme, z.B. nach der Geburt, bei Erkrankungen oder während des Absetzens, vermieden werden (fehlende Linearität, starke Verfälschung des MW durch Ausreißerwerte).

Die Futterverwertung G:F wurde wie folgt berechnet:

$$G:F = \text{ADG (g)} / \text{ADFI (kg)}$$

2.4.3 Durchfall / Kotkonsistenz

Die Kotkonsistenz bei Absetzferkeln wurde täglich mittels einer Skala von 1 - 4 beurteilt.

- 1 = fester, trockener Kot
- 2 = weicher, geformter Kot
- 3 = weicher, zerlaufender Kot
- 4 = flüssiger bis wässriger Kot

Als Durchfall/Diarrhöe gewertet wurden flüssiger Kot, der an 2 oder mehr aufeinander folgenden Tagen auftrat (Männer und Spieler 1997). Die Inzidenz von Diarrhöe (in %) im Versuchstierbestand wurde berechnet als der Quotient der neu erkrankten Tiere innerhalb der ersten 4 Wochen nach dem Absetzen zu der Gesamtzahl der abgesetzten Ferkel.

2.5 Probengewinnung

2.5.1 Gewinnung der Futterproben

Die Entnahme der Proben zur Überprüfung der Keimzahlen im Futter erfolgte beim Sauenfutter durch ziehen von je etwa 10g Futter aus den neu angelieferten Futtersäcken. Von dem im Institut angemischtem Ferkelfutter wurde jeweils vom Rand, von der Oberfläche und aus der Tiefe eines Vorratsbehälters je eine etwa 10g schwere Futterprobe entnommen.

Die Stichproben wurden zu je 4g ausgewogen (das pelletierte Sauenfutter wurde vorher gemahlen), dezimal verdünnt und auf den Gehalt an Enterokokken überprüft (s. 2.7.1.1). Dabei wurden beim mit Probiotikum versetztem Futter nur einzelne Platten durch Koloniehybridisierung (s. 2.7.1.2) untersucht, da davon ausgegangen wurde, dass in diesen Verdünnungsstufen natürlicherweise keine Enterokokken im Futter vorkommen würden. Kontrollfutter wurde nach der gleichen Prozedur überprüft.

2.5.2 Gewinnung der Kotproben

Sauenkot wurde 10 Tage vor errechnetem Geburtstermin und 14 Tage p.p. rektal entnommen und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gehalten.

Für die Gewinnung der Ferkelkot-Proben für die *E. coli*- Multiplex- Polymerase-Kettenreaktion wurden Proben im Alter 7, 14, 21, 28, 35 und 70 Tagen vom Boden der Ferkelbuchten aufgesammelt, vereinigt und homogenisiert.

Für die Gewinnung der Ferkelkot-Proben für die DNA- Extraktion und dem Nachweis des Probiotikums wurden am 3., 7., 14., 21., 28., 35., 56. und 70. Tag p.p. je 2 zufällig ausgewählte Ferkel pro Probenzeitpunkt und Wurf bis zum Absetzen einer frischen Kotprobe separiert.

Die Probe wurden ebenfalls bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gehalten.

Nach Abmessen eines Gramms für die Verdünnungsreihen wurde je ein Aliquot der Kotproben für die spätere DNA-Extraktion (2.8.1.2) bei -80°C eingefroren.

2.5.3 Gewinnung der Proben aus dem Verdauungstrakt

Je fünf zufällig ausgewählte Ferkel der Altersgruppen 14, 28, 35 und 56 Tage wurden mit Ketamin (Ursotamin®, Serumwerk Bernburg) / Azaperon (Stresnil®, Janssen, Gent, Belgien) intramuskulär sediert (0,2 ml/0,1 ml pro kg LM) und anschließend mit Pentobarbital (Eutha77 ®, Essex Pharma, München) intraperitoneal narkotisiert (0,8 ml pro kg LM). Nach steriler Abdeckung der Bauchdecke wurde die Bauchhöhle median eröffnet sowie zwei Entlastungsschnitte entlang des Rippenbogens durchgeführt. Zunächst wurde der Magen an der Cardia sowie am Pylorus, das Duodenum am Ende des duodenalen Pancreasschenkels sowie der Übergang vom Jejunum in das Ileum (entsprechend der anatomischen Definition: Beginn der Plica ile-

ocaecalis bis Caecum) unter sterilen Bedingungen mit chirurgischen *Pean*- Klemmen abgeklemmt. Das Tier wurde nun über die zuvor frei präparierte Drosselvene (V.jugularis ext.) mit Pentobarbital (Eutha77 ®, Essex Pharma, München) intravenös euthanasiert. Danach wurde je ein Stück proximales (ca. 1 m distal des Duodenum / Ende der Plica duodenocolica) und distales (ca. 1 m proximal der Plica ileocaecalis) Jejunum (im folgenden als Jejunum 1 und 2 bezeichnet), Ileum und Colon ascendens (ca. 1 m distal des Ostium caecocolicums) abgeklemmt, die abgeklemmten Abschnitte entnommen und auf Eis gelagert. Danach erfolgt eine weitere Aufteilung der entnommenen Abschnitte für die einzelnen Institute der Forschergruppe nach einem vorgegebenen Muster. Für diese Untersuchungen wurde Mageninhalt, Jejunum ab 120 cm distal des Duodenum sowie ab 100 cm proximal des Ileums entnommen (Jejunum 1 und 2). Ferner wurde das Ileum sowie ein Teil des Colon ascendens ebenfalls nach Abklemmen aus dem Tierkörper entfernt und alle Abschnitte sogleich auf Eis gelagert.

Der Inhalt der Darmabschnitte wurde in sterile 50ml Gefäße ausgedrückt. Nach Auswiegen eines Gramms für die mikrobiologischen Untersuchungen wurde der restliche Darminhalt in sterile 2 ml Eppendorf- Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.6 Messung von Stoffwechselprodukten in Digesta

2.6.1 NH_4^+ -Bestimmung in Digesta mittels Ionen- selektiver Elektrode

Das dafür verwendete Messgerät (MA235 pH/Ion- Analyzer, Fa. Mettler Toledo), wurde zuerst kalibriert:

Eine 55 mM NH_4Cl Stamm-Lösung (= 1000 ppm) wurde dezimal verdünnt (100, 10, 1 ppm). Zuerst wurde die Elektrode 5 min in 1 ppm NH_4Cl – Lösung äquilibriert. Anschließend erfolgte die Kalibrierung anhand der Verdünnungsreihe.

Nach erfolgter Kalibrierung wurden die Digestaprobe aufgetaut, 500 mg abgewogen und mit A.bidest 1:10 verdünnt und homogenisiert. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 10.000 x g (4°C) wurden 500 µl des Überstands in Szintillationsröhrchen überführt, 500 µl 1M NaOH, 200 µl ISAB 9112 (AlSO_4 -Lösung) sowie 10 ml A.bidest hinzugefügt, homogenisiert und anschließend gemessen. Der gemessene ppm- Wert multipliziert mit 0,055 ergab die Konzentration (mmol/ l) an NH_4^+ in der Probe.

2.6.2 Enzymatische Bestimmung von Laktat

Die Bestimmung des Gehaltes an D/L-Laktat erfolgte mit dem Laktat Kit der Fa. Boehringer Mannheim gemäß der Anleitung des Herstellers. Grundlage ist die photometrische Messung des Reduktionsproduktes NADH, welches aus der Redoxreak-

tion $D/L\text{-Laktat} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{Pyruvat} + \text{NADH}$, katalysiert durch die D-Laktat-Dehydrogenase, entsteht. Um die Rückreaktion zu minimieren, wird Pyruvat durch Zugabe von Glutamat-Pyruvat-Transaminase laufend der Reaktion entzogen und somit das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung Pyruvat-Bildung verschoben. Das entstandene NADH wurde photometrisch bei 365 nm gemessen und verhielt sich proportional zur Ausgangsmenge an Milchsäure.

2.6.3 Gaschromatographische Messung der flüchtigen Fettsäuren (FFS)

Die Konzentrationsbestimmung kurzkettiger flüchtiger Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat und Valeriat) erfolgte mit einem Gaschromatograph der Firma Agilent Technologies (Modell 6890N) mit einem Flammenionisationsdetektor und der Kapillarsäule Innovax 30m x 530 μm x 0.1 μm . Trägergas war Wasserstoff. Entsprechend der von SCHÄFER (1995) beschriebenen Methode wurden die eingefrorenen Proben aufgetaut, homogenisiert und 300 mg in 500 μl 0,1 mM Oxalsäure suspendiert. Als interner Standard diente Capronsäure (0,5 mmol/l). Nach 1 h Schütteln wurden die Proben bei 4°C für 3 min bei 13592 x g zentrifugiert und der Überstand zur gaschromatographischen Analyse verwendet.

2.6.4 pH- Messung in Mageninhalt

Die pH- Werte im Mageninhalt wurden mit pH- Teststreifen der Fa. Merck, Darmstadt, durchgeführt. Die Teststreifen wurden für ca. 15 sec. in den frisch gewonnenen Mageninhalt getaucht und direkt unter Zuhilfenahme der Farbskala abgelesen.

2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Bestimmung der Zellzahlen von Enterokokken

2.7.1.1 Kultivierung von Enterokokken aus Kot, Digesta und Futter

Zur Herstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe wurde 1 g Kot bzw. Digesta in 9 ml sterilem 1 x PBS-Puffer sowie Zugabe von sterilen 2 mm Glasperlen (Fa. Roth, Karlsruhe) 2 min lang durch Schütteln homogenisiert. Die weiteren Verdünnungsschritte erfolgten in zwei parallelen Verdünnungsreihen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (100 µl Verdünnung auf 900 µl 1 x PBS).

1 x PBS-Puffer

NaCl	8g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
NaH ₂ PO ₄	0,24 g
A.bidest	ad 1000 ml

pH 7,4

20 min bei 121 °C, 1bar Überdruck zu autoklavieren

Bei der Verdünnung der Futterproben wurde prinzipiell wie oben beschrieben vorgefahren. Lediglich die Probengröße und entsprechend die Verdünnungsvolumina der 1:10- und 1:100-Verdünnungen waren anders (4g in 36ml 1x PBS bzw. 1:10-Verdünnung ad 10ml 1x PBS, Schüttelautomat Heidolph Multi Reax, Schwabach). Pelletierte Proben (Sauenfutter) wurde zuerst fein zermahlen (Retsch ZM 100, Haan, D), Ferkelfutterproben wurden direkt bearbeitet. Die nachfolgenden Verdünnungen wurden wieder in 100 µl-Schritten in Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Aliquots der Verdünnungen aus Futter, Kot und Darminhalten wurde auf SB-Agar (s. Anhang 6.2) ausgespatelt und 48h aerob bei 37°C inkubiert. Wachstum von Enterokokken zeigte sich durch die typische rosa bis violette Färbung der Kolonien auf dem Medium (Reduktion von Tetrazoliumchlorid).

2.7.1.2 Nachweis des Probiotikums in Futter, Kot und Digesta

Der Nachweis des probiotischen Bakteriums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 aus Futter, Kot und Digesta erfolgte nach der wie unter 2.7.1.1. beschriebenen Kultivierung auf SB-Agar durch den anschließenden spezifischen Nachweis durch Koloniehybridisierung mittels DIG-markierter DNA-Sonde (s.2.8.2).

Für die Bestimmung der spezifischen Zellzahl in Futter der Probiotikagruppe wurden die KbE auf SB-Agar verwendet, da andere Enterokokken als das Probiotikum in diesen Zellzahlen nicht zu erwarten waren. Diese Zahlen wurden durch stichprobenartige Koloniehybridisierung überprüft.

2.7.2 Zellzahlen von Milchsäurebakterien, Coliformen und Gesamt- Anaerobiern

Die 10fach- Verdünnungen aus Kot und Digesta wurden mit PBS-Puffer wie unter 2.7.1.1 beschrieben durchgeführt.

Für die weiteren Verdünnungen der Darminhalte erfolgte in 2 Parallelen mit Sörensen- Puffer, der bessere Trocknungseigenschaften im Tropf- Verfahren aufwies.

Sörensen- Puffer:

KH ₂ PO ₄	13,5 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	18 g
Thioglycolsäure	2,4 ml
Agarwasser (2,5%; w/v)	80 ml
A.bidest	ad 1000 ml

Die Verdünnungen aus Darminhalten wurden auf MRS- Agar (Fa. Roth, Karlsruhe s. Anhang 6.2) für Milchsäurebakterien, DEV-Endo-Agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK, s. Anhang 6.2) für *E. coli* bzw. Coliforme und Columbia-Schafblut-Agar (Merck, Darmstadt, s. Anhang 6.2) für die Gesamt- Anaerobier in zwei Parallel- Ansätzen aufgetropft (100 µl).

Abweichend davon erfolgte die weitere Verdünnung der Kotproben zur Kultivierung von *E. coli* für die *E. coli*- multiplex-PCR (s. 2.8.3) in 1x PBS-Puffer (s. 2.7.1.1.). Diese Verdünnungen wurden auf DEV-Endo- Agar ausgespatelt, um später einzelne Kolonien leichter abnehmen zu können.

MRS- und Columbia-Schafblut-Medien wurden 24 Std. *anaerob* bei 37°C inkubiert (Anaerocult-A, Merck, Darmstadt), DEV-Endo-Agar 24 Std. *aerob* bei 37°C bebrütet.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Herstellung der Ziel- DNA für die Polymerase- Kettenreaktion

2.8.1.1 Ziel- DNA aus Bakterienkolonien bzw. Kultur

Als Ziel- DNA für die *E. coli*- Multiplex- Polymerase- Kettenreaktion wurde Überstand aufgekochter Zellsuspensionen verwendet. Die vom Agar einzeln abgenommenen Kolonien wurden zuvor in 100 µl 0,9% steriler NaCl- Lösung in Eppendorf-Gefäßen suspendiert und eingefroren gelagert (-30°C). Die Zell- Lyse erfolgte durch einfaches Erhitzen der Zellsuspension auf 96°C für 10 min. in einem Heizblock. Anschließend wurde durch Abzentrifugieren unerwünschtes Zellmaterial abgetrennt und der Überstand als Ziel-DNA verwendet.

DNA einzelner Stämme wurde mit Hilfe eines kommerziellen DNA- Extraktions-Kits (NucleoSpin Tissue Kit, Fa. Machery-Nagel, Düren) entsprechend dem Protokoll des Herstellers aus Kulturmaterial gewonnen. Hierzu wurde Zellmaterial aus der Stammsammlung 24h bei 37°C in Vollmedium (BHI, s. Anhang 6.2) angezüchtet und die Kultur als Ausgangsmaterial verwendet.

2.8.1.2 Extraktion der Gesamt-Nukleinsäuren aus Digesta und Kot

Phenol-Chloroform-Extraktion aus 1g Digesta / Kot.

Zur chemisch-mechanischen Zell- Lyse wurde die Probe mit 3 g steriler, säuregewaschener 0,25 mm Glasperlen (Fa.Roth, Karlsruhe) sowie 10 ml 60°C warmer GITC-Lösung (s. Anhang 6.3) versetzt und bei 60°C für 5 min unter wiederholtem kurzen Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte der mechanische Zellaufschluss durch Schütteln mit einer Frequenz von 2000/min für 2 min in einem Schüttelautomaten (Retsch MM 200, Haan, Deutschland). Der Überstand wurde in 50 ml sterile Oakridge -Zentrifugenröhrchen dekantiert. Die sedimentierten Feststoffe wurden erneut 5 min mit 7 ml GITC-Lösung versetzt und 2 min geschüttelt, um anschließend vollständig in das 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt zu werden.

Zur Extraktion der Nukleinsäuren wurde nun 20 ml Phenol/Chloroform (Fa.Roth, Karlsruhe) auf das Zelllysate gegeben und kurz geschwenkt. Anschließend wurde die Probe bei 18.000 x g (4°C) für 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde nun in neue, sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen (s.o.) übertragen und mit 1 Volumen (max. 20 ml) Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) vorsichtig gemischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 18.000 x g (4°C) für 5 min wurde die wässrige Phase wiederum in neue 50 ml Zentrifugenröhrchen (s.o.) überführt. Nach Zugabe von 1 Volumen + 4 ml eiskaltem Isopropanol wurden die Nukleinsäuren bei -30°C über Nacht ausgefällt.

Die Abtrennung des Rohextrakts erfolgte durch Zentrifugation bei 25.000 x g und 4 °C für 30 min. Das Pellet wurde dann mit 40 ml eiskaltem, 70% Ethanol versetzt

und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes und Ausdampfen der Zentrifugenröhrchen wurde das Pellet in 500 µl T1-Puffer (Fa. Machery-Nagel, Düren, Deutschland) gelöst (im folgenden als Rohextrakt bezeichnet). Anschließend wurde der Nukleinsäuregehalt fluorometrisch bei 460 nm nach Angaben des Herstellers bestimmt (BioRad-VersaFluor Fluorometer, München). Der Rohextrakt wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.8.1.3 DNA-Reinigung der Rohextrakte

Zur DNA-Aufreinigung wurde das NucleoSpin® Tissue Kit der Fa. Machery-Nagel, Düren, verwendet. Hierbei wurden 200 µl des Rohextrakts nach Anleitung des Herstellers mit RNase behandelt und die DNA über die im Kit vorhandene Silica-Matrix gereinigt. Die erhaltenen 150 µl DNA-Extrakt wurden in sterilen Eppendorf-Gefäßen bei -30°C aufbewahrt.

2.8.1.4 Messung des Gesamt-DNA-Gehaltes

Der DNA-Gehalt der Extrakte/der PCR-Produkte wurde fluorometrisch bestimmt (VersaFluor Fluorometer – Fa. BioRad, München).

µl Extrakt wurde in 200 µl TE/Hoechst-Farbstoff-Verdünnung (Fluorescent DNA Quantation Kit, Fa. BioRad, München) gemischt. Die gemessene Fluoreszenz (460nm) war dabei der enthaltenen Gesamt-DNA-Menge proportional und konnte mittels eines aus der Eichkurve resultierenden Faktors (Steigung der Eichgeraden) errechnet werden.

2.8.2 Spezifische Koloniehybridisierung von *E. faecium* NCIMB 10415

2.8.2.1 Herstellung der *E. faecium* NCIMB 10415- spezifischen DNA-Sonde

Als Ziel-DNA für die PCR zur Herstellung der Sonde wurde ein Kulturextrakt von *E. faecium* NCIMB 10415 verwendet (s. 2.8.1.1).

Die Primersequenzen SFB und SFC wurden von der Fa. Cerbios-Pharma SA, Schweiz bereitgestellt (A. Arini, Cerbios-Pharma SA, Via Pian Scairolo 6, CH-6917 Barbengo, Schweiz). Sie codieren für ein 1,2 kb DNA-Fragment auf dem pf9-Plasmid von *E. faecium* NCIMB 10415. Die Spezifität der Sonde wurde anhand von Referenzstämmen mittels PCR überprüft (Macha et al. 2004).

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG, Ebersberg.

Primersequenzen für DIG-DNA-Sonde (1.2 kb):

Forward- Primer SFB : 5'-AACGTGCTTTTCTCGTTC C-3'

Reverse- Primer SFC : 5'-TAGCTTGTCGCCTATCCG-3'

Ein PCR-Ansatz (50 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

Mastermix für die DIG-DNA-Sonde (1.2 kb):

5 µl Primer SF-B (10 pmol)

5 µl Primer SF-C (10 pmol)

5 µl 10x PCR Puffer + MgCl₂ (Roche Diagnostics, Mannheim)

5 µl DIG labelling mix (Roche Diagnostics, Mannheim)

0.4 µl FastStarTaq (Roche Diagnostics, Mannheim)

28.6 µl Wasser für die PCR (Roche Diagnostics, Mannheim)

1 µl Ziel-DNA (Kulturextrakt aus *E. faecium* NCIMB 10415)

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet (cylacpf9)

1x	10 min 95°C
1x	30 sec 94°C
25x	30 sec 94 °C
	50 sec 54 °C
	2 min 72 °C
1x	10 min 72 °C
1x	hold 4°C

Die PCR wurde mit einem T1-Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit Heizdeckel durchgeführt.

2.8.2.2 Kolonietransfer

SB-Agar- Platten mit mindestens zehn, höchstens aber 50 typischen Kolonien wurden ausgewählt und die Kolonien auf Nylon-Membranfilter (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) transferiert.

Dazu wurden die Membranfilter für eine Minute auf den Agar gelegt, abgezogen und 15 min bei 37°C mit der Kolonieseite nach oben auf in Lyselösung getränktem Blotting- Papier (Fa. Schleicher & Schuell) inkubiert. Anschließend wurden der Vorgang in 10 % SDS und in 0,4 n NaOH getränktem frischem Papier für 10 min bzw. 15 min bei Raumtemperatur wiederholt. Nach zweimaligem Waschen in 2x

SSC-Lösung (aus 20x SSC) wurde die aus den Kolonien freigesetzte Nukleinsäure auf den Membranfiltern bei 120°C für 30 min fixiert und anschließend lichtgeschützt und trocken gelagert (Lösungen s. Anhang 6.3.3).

2.8.2.3 DNA-DNA- Hybridisierung

Zur Verwendung kamen ausschließlich Hybridisierungs- und Detektionskits der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim (DIG easyHyb Granules, DIG luminescent detection kit) sowie die *E. faecium* NCIMB 10415 spezifische, DIG-markierte DNA-Sonde (s. 2.8.2.1). Hierzu wurden die Filter in 150 x 35 mm zuvor autoklavierte Hybridisierungsflaschen gegeben und 1 h bei 42°C in 10 ml DIG easyHyb (aus DIG easyHyb Granules) prähybridisiert. Anschließend wurde die DIG easyHyb-Lösung durch Sondenlösung (1,5 µl DIG-markierter DNA-Sonde/ml DIG easyHyb-Lösung) ersetzt und über Nacht bei 42°C hybridisiert. Die Sondenlösung konnte mehrfach verwendet werden (Lagerung bei -30°C).

Nach Hybridisierung wurden die Membrane zweimal mit 2x SSC (0,1% SDS) bei Raumtemperatur sowie zweimal mit 0,5x SSC (0,1% SDS) bei 68°C gewaschen (Lösungen s. Anhang 6.3.3).

2.8.2.4 Detektion Chemolumineszenz- positiver Kolonien

Die Membranfilter wurden bis zur Fertigstellung des Puffers 2 (s. Anhang 6.3.3) in Waschpuffer (s. Anhang 6.3.3) gelagert. Nach 30-minütigen Waschen in Puffer 2 wurden die Filter weitere 30 min in Anti-DIG-AP-Lösung (Anti-Digoxigenin-F_{ab}-fragments, Fa. Roche) inkubiert (0,1 µl/ml Puffer 2).

Die Membranfilter wurden dann zweimalig 15 min lang in Waschpuffer gewaschen und anschließend zur Angleichung des pH- Milieus (pH 9 für die Alkalische Phosphatase / Anti-DIG-AP) für 5 min. in Detektionspuffer (s. Anhang 6.3.3) überführt.

Nach Herstellung der CSPD- Arbeitslösung (20 µl CSPD, Fa. Roche Diagnostics, in 2 ml Detektionspuffer), wurden die Membranfilter auf Petrischalendeckel gelegt, mit 2 ml CSPD- Lösung überschichtet und für 5 Minuten luftdicht mit Plastikfolie abgedeckt. Die Membrane wurde dann leicht getrocknet, in Folie eingeschlagen 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit einer sensitiven CCD Kamera fotografiert (s. 2.8.2.4).

2.8.2.5 Dokumentation der Chemolumineszenzsignale

Die Aufnahme der Chemolumineszenz erfolgte im Dunkelzelt mit einer sensitive charge coupled device (CCD-) Kamera (SensiCam QE 12bit, PCO Computer Optics) unter Verwendung der Software- Version Camware 1.2. Die Bilder wurden im TIF- Format abgespeichert.

2.8.2.6 Darstellung der Daten

Die spezifischen Zellzahlen von *E. faecium* NCIMB 10415 wurden durch Auszählung der chemolumineszierenden Kolonien ermittelt und ins Verhältnis zur Gesamtzahl der auf der jeweiligen Platte gewachsenen roten Kolonien gesetzt. Die ermittelten Keimzahlen wurden logarithmisch dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung der Kolonie- bildende Einheiten (KbE) pro Gramm Feuchtmasse. Fehlende Werte, die sich z.B. durch Unterschreitung des Detektionslimits, Auswahl zu hoher Verdünnungsstufen, Überwucherung der Platten oder Fehler bei der Hybridisierung entstanden sind, wurden nicht in die Berechnungen der Mittelwerte und Standardabweichungen mit einbezogen. Die Anzahl positiver Proben ist deshalb zu jedem Probenzeitpunkt im Verhältnis zur Zahl der untersuchten Proben angegeben.

2.8.3 Untersuchung des Versuchstierbestandes auf das Vorkommen pathogener *E. coli* mittels Multiplex – Polymerase- Kettenreaktion (mPCR)

In Anlehnung an eine bereits etablierte Methode (Göbel 2003) wurden mit Hilfe einer multiplex- Polymerase- Kettenreaktion (mPCR) zufällig ausgewählte *E. coli*- Kolonien aus Sauen- und Ferkelkot (s. 2.7.2) auf neun schweinetypische Pathogenitäts-gene untersucht. Der Primer- Mix (s. 2.8.3.1) wurde zusammen mit einem kommerziell erhältlichen mPCR- Mastermix (s. 2.8.3.2) sowie 1 µl Ziel- DNA (2.8.1.1) vermischt und mit einem touchdown- PCR- Programm gefahren (s. 2.8.3.3). Die PCR- Produkte wurden in einem 2,5% Agarose- Gel (s. 2.8.3.4) aufgetrennt und mit einem Laufweitenstandard, der alle neun Pathogenitätsfaktoren enthielt, abgeglichen. Der Laufweitenstandard enthielt die DNA- Extrakte aus folgenden Stämmen der Stammsammlung des Instituts für Tierernährung:

- *E. coli* 0138:K81, positiv für stx2e, est-Ib, est II, fedA
(Stammsammlung Institut für Tierernährung *E. coli* Nr. 7)
- *E. coli* 0147:K89:K88, positiv für fae, est-II, elt-Ia
(Stammsammlung Institut für Tierernährung *E. coli* Nr. PS79)
- *E. coli* CS2011, positiv für fas, est-Ib, est-II
(Stammsammlung Institut für Tierernährung *E. coli* Nr. PS90)
- *E. coli* 09:K35:K99, positiv für fan, est-Ib, fimf41a
(Stammsammlung Institut für Tierernährung *E. coli* Nr. PS37)

DNA aus *E. coli* DSM 2840 (negativ für alle genannten Pathogenitätsfaktoren) wurde als Negativkontrolle je einmal pro PCR- Ansatz und Gel aufgetragen.

2.8.3.1 Primersequenzen zum Nachweis von *E. coli*- Virulenzfaktoren

Folgende Primerpaare wurden verwendet (Bosworth 1997; Moon et al. 1999):

est-Ib (StaP) - Gen, hitzestabiles Enterotoxin I

Primer:	CAACTGAATCACTTGACTCTT	Produktgröße (bp)	158
	TTAATAACATCCAGCACAGG		

est-II (STb) - Gen, hitzestabiles Enterotoxin II

Primer:	TGCCTATGCATCTACACAAT	Produktgröße (bp)	113
	CTCCAGCAGTACCATCTCTA		

fan (F5/K99) - Gen, Fimbrium fan A & B

Primer:	AATACTTGTTTCAGGGAGAAA	Produktgröße (bp)	230
	AACTTTGTGGTTAACTTCCT		

elt-IA (LT) - Gen, hitzelabiles Enterotoxin A

Primer:	GGCGTACTATCCTCTCTAT	Produktgröße (bp)	272
	TGGTCTCGGTCAGATATGT		

Fed A (F18) - Gen, Fimbrium F107

Primer:	TGGTAACGTATCAGCAACTA	Produktgröße (bp)	313
	ACTTACAGTGCTATTCGACG		

fas (F6/987P) - Gen, Fimbrium (Fas - G Protein)

Primer:	GTAACTCCACCGTTTGTATC	Produktgröße (bp)	409
	AAGTTACTGCCAGTCTATGC		

fae (F4/K88) - Gen, Fimbrium

Primer:	GTTGGTACAGGTCTTAATGG	Produktgröße (bp)	499
	GAATCTGTCCGAGAATATCA		

Fimf41a (F41) - Gen, Adhesin

Primer:	AGTATCTGGTTCAGTGATGG	Produktgröße (bp)	612
	CCACTATAAGAGGTTGAAGC		

stx2e (SLT) - Gen, SLT IIe Toxin

Primer:	AATAGTATACGGACAGCGAT	Produktgröße (bp)	733
	TCTGACATTCTGGTTGACTC		

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG, Ebersberg. Die Primer wurde als äquimolaren Mix (2 pmol/ μ l) in den Mastermix eingebracht.

2.8.3.2 *E. coli*- mPCR- Mastermix

Verwendet wurde das Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland).
50 Reaktionsansätze PCR-Mastermix enthielten:

HotStarTaq® DNA-Polymerase, Multiplex PCR-Buffer (6 mM MgCl₂) und dNTP-Mix.

Mastermix (30 µl Ansatz)
15 µl 2 x Qiagen Multiplex PCR Master Mix
+ 3 µl Primer Mix 1 (2 pM)
+ 3 µl Primer Mix 2 (2 pM)
+ 9 µl Wasser
+ 1 µl Ziel-DNA (Kulturüberstand, s. 2.8.1)

2.8.3.3 PCR Programm für *E. coli*- mPCR

touchdown PCR, Name: QM-EC1
1x 900sec 95 °C
10x 30 sec 94°C
90 sec 60 °C (- 0,5 °C je Zyklus)
90 sec 72 °C
30x 30 sec 94°C
90 sec 55 °C
90 sec 72 °C
1x 600sec 72 °C
1x hold (0) 4 °C

2.8.3.4 Agarose- Gelelektrophorese für die mPCR

Zur Herstellung des Agarosegels wurde Agarose (Agarose GTQ, Fa. Roth, mit ca. 50 - 1500 bp Auflösung) in 1 x TAE-Puffer (s. Anhang 6.3.2) durch Erhitzen gelöst. Der Lösung wurde anschließend Sybr®green I nucleic acid gel stain (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME) in einer Konzentration von 10 µl/100 ml zugesetzt. Die Lösung wurde in eine 20 x 20cm-Gelkammer (Agarosegel- Elektrophorese Agagel Maxi, Biometra, Göttingen) gegossen, zwei Kämme eingesetzt und erkalten gelassen. Das erstarrte Gel wurde nun mit 1x TAE-Puffer (s. Anhang 6.3.2) umflutet und die Geltaschen mit den Proben beschickt. Der DNA-Auftragspuffer (Roti®Load DNA, Fa. Roth, Karlsruhe) wurde im Verhältnis 1:4 mit PCR- Produkt gemischt. Aufgetragen wurden 5 µl Produkt. Als DNA- Standard diente eine 100bp-DNA-Leiter (Fa. Roth, Karlsruhe s. Anhang 6.3.2). Die Laufleistung betrug max. 8 Watt.

Für die *E. coli* multiplex-PCR wurden 2,5% - Gele verwendet und als Laufzeit ca. 3 Stunden bei 100 mV angesetzt. Durch Kontrolle der Auftrennung auf einem UV-Tisch (312nm) wurde das Ende des Laufs bestimmt. Die Dokumentation erfolgte auf dem UV- Durchlicht- Tisch (312nm) über eine CCD- Kamera (SensiCam QE 12bit, PCO Computer Optics, Kehlheim, D) mit einem daran gekoppelten UV-Filter.

2.8.4 Untersuchungen zur fäkalen mikrobiellen Diversität mit Hilfe der denaturierenden Gradienten- Gel- Elektrophorese (DGGE)

Verwendet wurde das D-code System DGGE- Gerät der Fa. BioRad®, München, sowie als Spannungsquelle das BioRad® Power Pac 300.

In Anlehnung an die Arbeiten von MUYZER *et al.* (1993) wurde aus DNA-Extrakten die V6-V8- Region der bakteriellen 16s rDNA mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert (s. 2.8.4.1). Hierzu wurde ein Primerpaar verwendet, dessen Forward- Primer eine GC- Klemme enthielt (Nübel 1996). Die PCR- Produkte wurden dann aufgrund ihres unterschiedlichen GC- Gehaltes in der Harnstoffgradienten- Polyacrylamid- Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.8.4.2) und die Bandenmuster durch Silberfärbung sichtbar gemacht (s. 2.8.4.3). Als Laufweitenstandard wurde ein DNA- Extrakt aus Digesta verwendet, der ein reproduzierbares, relativ einfaches Bandenmuster zeigte.

Die Auswertung erfolgte mit der Phoretix™ 1D Software Version 2003.01 (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, UK).

2.8.4.1 PCR für die DGGE

Die PCR zur Amplifikation der 16s-rDNA- Fragmente wurde in einem T1- Thermocycler mit Heizdeckel (Biometra, Göttingen) nach folgendem Programm durchgeführt.

PCR-Programm DGGE 72° (touchdown)

1 x	15 min	95°C
21 x	30 sec	94°C
	90 sec	66°C - 0,3 °C je Zyklus
	90 sec	72°C
14 x	30 sec	94°C
	90 sec	59°C
	90 sec	72°C
1 x	10 min	72°C
	hold	4°C

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG, Ebersberg. Folgende Primerpaare wurden verwendet (Nübel 1996):

Forward- Primer (mit GC-Klemme) 986GC-FW:

5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG

Reverse- Primer 1401-RW:

5'- GGG TGT GTA CAA GAC CC-3'

Ein PCR- Ansatz enthielt:

(ca. 42 µl Ansatz)

20µl 2x Qiagen Multiplex PCR Mastermix (Qiagen Multiplex PCR, Hilden)

1µl Primer 986GC-FW (4 pmol/µl)

1µl Primer 1401-RW (4 pmol/µl)

20µl Wasser für die PCR (Qiagen Multiplex PCR, Hilden)

ca. 400ng Ziel-DNA (entsprechende Menge Extrakt)

2.8.4.2 Polyacrylamid- Gradienten-Gel für die DGGE

Verwendet wurde das D-code System DGGE- Gerät mit Gradientenmischer der Fa. BioRad, München.

In die Gelkammer wurde ein transparenter, lichtempfindlicher Gelbond- Film an der Innenwand fixiert (Gelbond PAG Film, Fa. Biozym, Hess. Oldendorf), um das Gel nach der Silberfärbung lagerstabil zu halten.

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 37% : 52 % Harnstoffgradient (100 % denaturierendes Polyacrylamid enthielt 7 mol/l Harnstoff und 40% deionisiertes Formamid, s. Anhang 6.3.2) in einem 8% Polyacrylamid- Gel durch den systemeigenen Gradientenmischer erzeugt.

12 µl PCR- Produkt + 2 µl Ladepuffer (s. Anhang 6.3.2) wurden pro Spur aufgetragen und die Elektrophorese bei 60°C in 1x TAE, (s. Anhang 6.3.2) durchgeführt. Dabei wurde zunächst für 10 min eine Spannung von 200 mV angelegt. Anschließend erfolgte der Gellauf bei 85 mV mit ca. 40 mA über 16 Stunden.

Die verwendeten Chemikalien sind in Anhang 6.3.2 aufgelistet.

2.8.4.3 Gelfärbung

Nach Abschalten der Stromzufuhr wurde das auf dem Gelbond fixierter Gel aus dem Puffertank entnommen und für 3 min in 1x Cairns- Fixierungslösung (s. Anhang 6.3.2) geschwenkt. Anschließend wurde das Gel für 10 min in Silberfärbelösung (s. Anhang 6.3.2) verbracht. Es folgten zweimaliges Waschen in A.bidest und nachfolgendes Entwickeln in Entwicklerlösung (s. Anhang 6.3.2), bis die Banden ausreichend deutlich sichtbar waren. Nach erneutem Waschen in 1x Cairns- Fixierungslösung für 5 min wurde wiederum für 2 min mit A.bidest gespült und das Gel nun für 7 min in Cairns- Aufbewahrungslösung (s. Anhang 6.3.2) überführt.

Das Gel wurde dann auf eine Glasplatte gelegt, mit einer Zellophan- Folie (Fa. Roth, Karlsruhe) unter Vermeidung von Luftblasen abgedeckt, mit Klemmen auf der Platte fixiert und über Nacht bei 60°C getrocknet.

2.8.4.4 Auswertung der Bandenmuster

Nach dem Trocknen wurde das Gel zur Orientierung beschriftet und mit einem handelsüblichen Scanner (Lexmark X 75 Scanner/Printer) mit 300 dpi gescannt und im TIF- Format gespeichert.

Die Auswertung erfolgte mit der Phoretix™ 1D Software Version 2003.01 (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, UK).

Die Ähnlichkeit der fäkalen Bakteriengemeinschaft (im Sinne von gemeinsamen und unterschiedlichen Banden) der einzelnen Tiere wurde mithilfe des Sörensen- Koeffizienten zueinander verglichen. Der Sörensen- Koeffizient (auch als Dice-

Koeffizient bezeichnet) wird angewandt, um die Spezies- Zusammensetzungen verschiedener Ökosysteme zur vergleichen. Er wird allgemein nach folgender Gleichung berechnet:

$$S = 2a / (2a + b + c)$$

a: Anzahl gemeinsamer Banden

b: Anzahl individueller Banden Tier A

c: Anzahl individueller Banden Tier B

Zwei komplett gleiche DGGE- Bandenmuster ergeben somit einen Wert von 1, wohingegen völlig verschiedene Bandenmuster den Wert 0 aufweisen. Das Programm errechnete nach manuellem Abgleich der Bandenmuster mit dem Laufweitenstandard die Werte automatisch. Anschließend konnten die durchschnittlichen Ähnlichkeiten innerhalb und zwischen den Versuchsgruppen berechnet werden (McCracken 2001).

Mit dem Phoretix™- Programm wurde zudem aus den Sörensen- Werten UPGMA- Dendogramme zur graphischen Darstellung möglicher Verwandtschafts- ähnlicher Beziehungen der Bandenmuster bzw. Kotproben durchgeführt.

Zur Untersuchung der bakteriellen Diversität im Kot wurde der Shannon- Weaver- Index als geeignetes Maß ausgewählt. Der Shannon- Weaver- Diversitätsindex steigt mit der Anzahl der Spezies/Banden (richness) in einer Probe, er ist höher, je gleichmäßiger die Banden/Spezies verteilt sind. Die Gleichmäßigkeit (evenness) ist unabhängig von der Anzahl der Spezies, sie ist klein wenn eine geringe Zahl an Spezies dominieren und dagegen hoch, wenn die Vorkommenshäufigkeit (relative abundance) aller Banden gleich ist.

Der Shannon- Index wird nach folgender Formel berechnet:

$$H = -\sum_{i=1}^S p_i \times \ln p_i$$

H: Shannons Diversitätsindex

S: Anzahl der Spezies im Ökosystem (richness), hier Anzahl der Banden

P_i: Verhältnis der i-ten Spezies zu S

Die erforderlichen Daten wurden durch das Phoretix® - Programm bereitgestellt und der Shannon- Index mit Hilfe der oben genannten Formel für jedes Bandenmuster bzw. Tier pro Probenzeitpunkt berechnet.

2.9 Statistische Untersuchungen

Alle statistischen Analysen erfolgten unter Verwendung des Programms SPSS (SPSS V.12.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Bei den Leistungsdaten der Sauen sowie Körpergewicht, Kotkonsistenz, Durchfall, Darmmetabolite, bakterielle Zellzahlen und DGGE- Ergebnisse aus Ferkeldigesta und – Kot entsprach das individuelle Tier einer experimentellen Einheit.

Die Berechnungen zur durchschnittlichen Lebendmasse- Zunahme, durchschnittlichen Futteraufnahme sowie Futteraufwand sind auf die Ferkelbucht als experimentelle Einheit bezogen.

Das Vorkommen von *E. coli*- Isolaten mit einzelnen oder Kombinationen aus Pathogenitätsgenen war zu gering, um eine aussagefähige Statistik durchzuführen.

Die Prüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mit dem nicht- parametrischen Kolmogorov-Smirnov- Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors. Bei normalverteilte Daten wurde die Statistik mit dem T- Test durchgeführt, hier wurden die Daten mit Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die graphische Darstellung erfolgte ggf. mit Balkendiagrammen, bei denen die Obergrenze des Balkens den Mittelwert und die dünne horizontale Linie die Standardabweichung bezeichnete. Der Chi-Quadrat-Test wurde beim Vergleich der Inzidenz von Diarrhöe und der Häufigkeit flüssigen Kotes zwischen den Gruppen angewandt.

Bei nicht normalverteilte Daten wurde der Mann- Whitney- U- Test angewendet. Die Ergebnisse wurden dann mit Median, Minimum und Maximum aufgelistet. Als statistisch signifikant wurde ein P-Wert $\leq 0,05$ festgelegt, als tendenziell wurde ein P-Wert $\leq 0,1$ bezeichnet. Die graphische Darstellung erfolgte dann ggf. in Boxplots. Bei der Darstellung in Boxplots wird die hellgraue Box durch die 25 %- bzw. 75%- Perzentile begrenzt, die darin enthaltene schwarze Linie stellt den Median (50%- Perzentil) dar. Die dünnen Querstriche ober- und unterhalb der Box geben den größten bzw. kleinsten Wert aus der jeweiligen Stichprobe an, der noch keinen Ausreißer- oder Extremwerte darstellt. Ausreißerwerte (○) sind Werte, die mehr als das 1,5fache der Höhe der grauen Box über oder unterhalb der Box liegen, Extremwerte (✖) entsprechend mehr als das 3fache.

Die einzelnen statistischen Prozeduren sind bei der Besprechung der Ergebnisse ggf. nochmals erwähnt.