

IV. Diskussion

Um als Futterzusatzstoffe zugelassen zu werden, sollten Probiotika unter anderem über die Fähigkeit verfügen, das Immunsystem zu stimulieren (DUNNE *et al.*, 1999; SIMON *et al.*, 2001; GALDEANO und PERDIGON, 2004). In zahlreichen Studien werden immunstimulierende Effekte beschrieben. Z. B. wiesen FUKUSHIMA *et al.* (1998) nach Applikation von Milchsäurebakterien eine Erhöhung der sIgA-Konzentration in humanem Faeces nach. PERDIGON *et al.* (1986) zeigten signifikante Unterschiede der systemischen und mucosa-assoziierten Immunantwort nach Gabe von Milchsäurebakterien an Ratten. Andere Autoren konnten dagegen keine Effekte auf die Immunglobulin-Konzentration belegen (z. B. FANG *et al.*, 2000).

Innerhalb einer von der DFG geförderten interdisziplinären Studie (FOR 438) sollten daher mit der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zum Immunstatus durchgeführt werden. Nach Fütterung der probiotischen Futterzusätze *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (Cylactin[®]) oder *Bacillus cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 (Toyocerin[®]) an tragenden und laktierenden Sauen wurden diese auch an deren Ferkeln verabreicht und quantitativ Immunglobuline untersucht. Insbesondere wurde IgG im Serum als wichtigster Parameter der systemischen Immunantwort und sekretorisches IgA in den Faeces und in der Molke als wichtigste Parameter der lokalen Immunantwort des Darmes bzw. der Milchdrüse gemessen. Zur Schaffung einheitlicher Versuchsbedingungen wurden jeweils zwei räumlich voneinander getrennte Gruppen zufällig ausgewählt bei ansonsten gleichen Haltung- und Fütterungsbedingungen. Von den Sauengruppen wurden Serum und Faeces am 91. Tag *a. p.* gewonnen zur Erstellung von IgG- bzw. sIgA-Basalwerten. Ab dem 90. Tag *a. p.* wurde die Probiotikagruppe im 1. Versuchsdurchgang mit *E. faecium* (Cylactin[®]) bzw. im 2. Versuchsdurchgang mit *B. cereus* var. Toyoi (Toyocerin[®]) supplementiert. Den Ferkeln der Probiotikasauen wurde ab dem 14. LT Beifutter mit der jeweils gleichen probiotischen Kultur angeboten. Ab dem 28. LT, an welchem die Ferkel auch abgesetzt wurden, erhielten die Versuchsgruppen supplementiertes Ferkelaufzuchtfutter bis einschließlich dem 56. LT. Die Menge der verabreichten Kulturen entsprach den gesetzlichen Vorschriften (siehe Kap. III, Punkt 3.1. und 4.1.) und wurde nachweislich überprüft (MACHA *et al.*, 2004).

1. Untersuchungen zum Einfluss der probiotischen Futterzusatzstoffe *E. faecium* und *B. cereus* var. Toyoi auf den Immunstatus tragender und laktierender Sauen

Das darmassoziierte Immunsystem (gut associated lymphoid tissue, GALT) erfüllt wichtige immunologische Aufgaben. Es schützt eine Schleimhautbarriere von etwa 400 m² Oberfläche (Mensch) und den Bereich des Körpers mit der stärksten mikrobiellen Besiedlung. In der Darmschleimhaut sind 70 bis 80 % aller Immunglobulin produzierenden Zellen lokalisiert (BRANTZAEGER *et al.*, 1989). Etwa 70 bis 90 % dieser Lymphozyten produzieren Immunglobuline des Isotyps A. MORGAN und BOURNE (1980) zeigten in ihren Versuchen mit radioaktiv-markierten Immunglobulinen sogar, dass 97 % der IgA-Produktion vor Ort stattfinden und nicht aus dem Serum stammen. Das über die Darmepithelzellen ins Lumen sezernierte sekretorische IgA hat die Aufgabe der Antigen-Exklusion und -Neutralisation (BRANDTZAEG, 1998) bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere (TIZARD, 2000). Neben der Produktion von sekretorischem IgA ist das gastrointestinale Immunsystem in der Lage, nach oraler Aufnahme von Proteinantigenen eine spezifische immunologische Antwortlosigkeit bei erneutem Antigenkontakt zu induzieren, die auch als orale Toleranz bezeichnet wird (MOWAT, 1994). Nachfolgend kommt es zur Unterdrückung der systemischen humoralen und zellvermittelten Immunantwort (ABBAS *et al.*, 1996).

Im vorliegenden Versuch sollte das sekretorische Gesamt-IgA in den Faeces und in der Molke bestimmt werden, um Aussagen darüber machen zu können, ob die probiotischen Kulturen *E. faecium* und *B. cereus* var. Toyoi die lokale Immunantwort beeinflussen können.

1.1. Einfluss auf Gesamt-IgA in den Faeces der Sauen

Methodenkritik

Die Aufarbeitung der Faecesproben erfolgte entsprechend Kap. III, Punkt 3.2.2..

Trotz Gewinnung der Kotproben direkt aus dem Rektum der Sauen befanden sich makroskopisch sichtbare Futterbestandteile bzw. unverdaute grobe Futterpartikel unterschiedlicher Menge in den Proben. Bei der Überführung einer jeweils ca. erbsengroßen Menge je Originalprobe in ein Eppendorf-Gefäß zur anschließenden Trocknung war es nicht in jedem Fall möglich, diese groben Futterpartikel aus der zu untersuchenden Faecesprobe zu entfernen. Da entsprechend dem Gewicht der getrockneten Probe die weitere

Aufbereitung erfolgte, war dies eine der möglichen Fehlerquellen. Des Weiteren erfolgte die Trocknung der Proben für 4 h ohne Wärmezufuhr in der Vakuumzentrifuge. Einige wenige Proben konnten in dieser Zeit nicht ausreichend getrocknet werden, so dass sie zusätzlich eine Stunde lang zentrifugiert werden mussten. Dies betraf insbesondere Ferkelproben. Offenbar spielte die Konsistenz der Kotproben eine wesentliche Rolle beim Trocknungsprozess.

Da keine Referenzlösung zur Verfügung stand (diese gibt es nicht für sekretorisches IgA), wurden 30 verschiedene Tierproben a 100 µl vermischt und als Referenzlösung auf jede MTP mitgeführt (siehe Kap. III, Punkt 3.3.). Jede Probe inklusive des „eigenen Standards“ wurde als Dreifachansatz auf die MTP aufgetragen. Dadurch konnten Vergleiche zwischen den Gruppen der Versuche erfolgen, die Messwerte konnten jedoch nicht mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden.

94 Probiotikaproben und 77 Kontrollproben Sauen-Faeces wurden im 1. Versuch (*E. faecium*) zu 7 verschiedenen Zeitpunkten der Gravidität bzw. der Laktation gewonnen und durch einen Sandwich-ELISA untersucht.

Obwohl die Basalwerte vom 91. Tag *a. p.* bei den probiotischen Tieren etwas unter denen der Kontrolle lagen, war dieser Effekt im weiteren Messverlauf nicht zu beobachten. Ob dieser nicht signifikante niedrigere Ausgangswert durch *E. faecium* in der Probiotikagruppe nachfolgend ausgeglichen wurde, d. h. durch einen immunstimulierenden Effekt des Probiotikums die sIgA-Produktion im Darm angeregt wurde, kann nicht belegt werden. Durch die Dauerapplikation bis zum 28. d *p. p.* hätte ein solcher Effekt deutlicher und anhaltender ausgeprägt sein müssen.

Im 2. Versuch (*B. cereus* var. *Toyoi*) wurden 56 Probiotikaproben und 44 Kontrollproben zu vier Messzeitpunkten auf Gesamt-IgA in den Faeces untersucht. Die Versuchsgruppe wies zu allen Messzeitpunkten höhere Messwerte auf im Vergleich zur Kontrolle. Am 14. Tag *p. p.* war dieser Unterschied signifikant ($p \leq 0,05$), d. h. die Probiotikagruppe zeigte am 14. Tag nach der Geburt signifikant höhere Messwerte als die Kontrollgruppe hinsichtlich seiner quantitativen sIgA-Menge in den Faeces. Dies könnte ein Hinweis für einen Antigenstimulus durch *B. cereus* var. *Toyoi* sein.

Die Analyse der Faeces-Messwerte aus beiden Versuchen bei den Sauen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden probiotischen Gruppen ($p \leq 0,05$). Die Messwerte der mit *B. cereus* var. *Toyoi* supplementierten Sauen waren signifikant höher als die der Sauen aus dem 1. Versuch (*E. faecium*). Dies könnte ein Hinweis auf die unterschiedli-

chen Wirkungsabläufe am Darm durch die beiden probiotischen Kulturen sein. Offenbar vermag *B. cereus* var. Toyoi, die sIgA-Produktion des Darmes bei gesunden, laktierenden Sauen zu steigern. Allein der Aufbau der beiden probiotischen Kulturen lässt eine Vermutung unterschiedlicher Mechanismen betreffs des darmassoziierten Immunsystems zu. *E. faecium* gehört zur Gruppe der LAB (*lactic acid bacteria*) und muss, um vor dem vorzeitigen Abbau durch Speichel, Pepsin u. a. geschützt zu sein, mikroverkapselt oral appliziert werden. *B. cereus* var. Toyoi hingegen ist durch seine Versporung unempfindlicher auch gegen extreme pH-Wert-Schwankungen und übersteht die Magenpassage besser als die MO, die ausschließlich vegetative Stadien ausbilden. Über die genauen Wirkmechanismen an der Dünndarmschleimhaut existieren noch wenige Erkenntnisse. BREVES *et al.* (1997 und 2000) zeigten, dass bei Schweinen, die drei Wochen lang mit *B. cereus* var. Toyoi behandelt wurden, es zu einer Beeinflussung der Schleimhautpermeabilität und der zellulären Transportprozesse kommt. GÖRKE (2000) fand nach Gabe von *B. cereus* var. Toyoi eine veränderte Schleimhautmorphologie mit einer Zunahme der Zottenlänge im *Jejunum*. VAN BRIEHL (2002) zeigte in ihren Untersuchungen bei Schweinen, die drei Wochen lang *B. cereus* var. Toyoi als Futterbeigabe erhielten, einen erhöhten Anteil an IgA-Plasmazellen im Dünndarm, dagegen einen herabgesetzten Anteil im Dickdarm.

Ähnliche Untersuchungen gibt es jedoch auch für *E. faecium*. So zeigten PERDIGON und ALVAREZ (1992), dass die orale Gabe von Milchsäurebakterien an Ratten signifikant auf die systemische und mucosa-assoziierte Immunantwort wirkt. Dieser Effekt durch die Milchsäurebakterien war jedoch dosisabhängig und führte nach Langzeitgabe zu umgekehrten Effekten. JIN *et al.* (2000) untersuchten das Adhäsionsverhalten eines *E. faecium*-Stammes 18 C 23 und zeigten durch die Kolonisierung des *E. faecium* eine verminderte Bindungsfähigkeit von enterotoxischen *E. coli*-Stämmen. Über den gezielten Einfluss von *E. faecium* auf das sIgA bei Schweinen gibt es kaum Literaturhinweise. DUNCKER (2005) untersuchte nach Gabe eines *E. coli* Nissle 1917 den Einfluss auf IgA-produzierende Plasmazellen in der Darmmukosa gesunder Schweine. Ihre Ergebnisse zeigten keinen Einfluss auf die IgA-Produktion.

Die eigenen Untersuchungen zeigten keinen Einfluss auf die sIgA-Produktion nach Applikation eines *E. faecium* bei gesunden, tragenden und laktierenden Sauen. Dagegen wurde ein immunstimulierender Effekt durch *B. cereus* var. Toyoi im Sinne einer Erhöhung des sIgA in den Faeces der Sauen ermittelt.

1.2. Einfluss auf Gesamt-IgA in der Molke der Sauen

KLOBASA und BUTLER (1987) untersuchten das Verhältnis der Immunglobuline am ersten Tag der Laktation und am Ende der Laktation. Sie fanden am 1. d *p. p.* (im Kolostrum) ein Verhältnis IgG : IgM : IgA – 76 : 7 : 17 und am Ende der Laktation (in der Milch) IgG : IgM : IgA – 7 : 15 : 78.

Das Kolostrum der eigenen Untersuchungen wurde innerhalb der ersten 12 Stunden *p. p.* gewonnen. Methodenkritisch muss angemerkt werden, dass diese Zeitspanne durch den starken Abfall der Antikörper-Titer zu groß gewählt war, um evtl. bestehende Unterschiede zwischen den Probiotika-supplementierten und den Kontrolltieren besser zu erfassen. Des Weiteren konnten insbesondere im *E. faecium*-Versuch nur geringe Milch-Mengen gewonnen werden, die mitunter für die nachfolgende Aufbereitung der Proben nicht ausreichte. Es konnten daher im 1. Versuch (*E. faecium*) nur insgesamt 25 Milchproben von 14 Sauen untersucht werden. Davon waren 11 Proben Kolostralmilch. Obwohl die arithmetischen Mittelwerte bei den Kontrolltieren höher ausfielen, bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Allerdings erniedrigten sich die Titer des Tages 0 *p. p.* der Probiotikagruppe zu den nachfolgenden Messzeitpunkten nicht wesentlich, während in der Kontrollgruppe die Messwerte am 7. und 14. Tag deutlich unter denen des Tages 0 oder 3 *p. p.* lagen. Durch die geringe Probenanzahl konnten jedoch keine statistisch relevanten Unterschiede ermittelt werden.

Im 2. Versuch (*B. cereus* var. *Toyoi*) konnten mit Hilfe von Oxytocin-Injektionen bei den Sauen 64 Proben zu drei verschiedenen Zeitpunkten gewonnen werden. In beiden Gruppen wurden die höchsten IgA-Titer am Tag 0 *p. p.* gemessen. Anschließend sanken in beiden Gruppen die Messwerte. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und den Messzeitpunkten ermittelt.

STOKES und BOURNE (1989) zeigten in Untersuchungen mit Jod-markierten Immunglobulinen, dass im Kolostrum ca. 60 % des IgA der lokalen Synthese entstammen, während in der Milch 90 % des IgA lokal synthetisiert werden. Dagegen wiesen die Autoren im Kolostrum keine lokale Synthese des IgG nach (dieses entstammt zu 100 % aus dem Plasma), in der Milch hingegen 70 %. Da in den eigenen Untersuchungen nur das sekretorische IgA in der Molke gemessen wurde, würde sich zu ebendiesen Zeitpunkten eine Messung des IgA und IgG im Plasma für bessere Vergleichsuntersuchungen empfehlen. Der unterschiedlichen Herkunft des sIgA bzw. IgG im Kolostrum bzw. in der Milch sollte in nachfolgenden Untersuchungen Rechnung getragen werden, um vergleichbare Erkenntnisse

gewinnen zu können, die möglicherweise in Zusammenhang mit einer Probiotikasupplementierung stehen.

In den eigenen Untersuchungen wurde durch die probiotischen Futterzusatzstoffe *E. faecium* und *B. cereus* var. Toyoi kein Einfluss auf die sIgA-Produktion in der Molke gesunder, laktierender Sauen ermittelt.

1.3. Einfluss auf Gesamt-IgG im Serum der Sauen

Mit der Untersuchung des Gesamt-IgG im Serum sollten Aussagen darüber gewonnen werden, ob durch den Einsatz der probiotischen Kulturen *E. faecium* oder *B. cereus* var. Toyoi die systemische Immunantwort tragender und laktierender Sauen verändert ist. Insbesondere die Hochträchtigkeit und die anschließende Laktation verlangen den Sauen enorme Stoffwechsel-Leistungen ab. In der Literatur gibt es wenige Vergleichsuntersuchungen über Verlaufskurven bezüglich der Immunglobuline während der Gravidität bzw. der Laktation. KLOBASA *et al.* (1985) untersuchten die Immunglobulin-Konzentrationen im Serum von Sauen während dieser Zeit und stellten erhöhte IgG-Werte im Serum bis zur 13. Trächtigungswoche fest. Anschließend sanken die IgG-Titer bis etwa zur Geburt, um nachfolgend wieder anzusteigen. In den eigenen Untersuchungen wurden diese Ergebnisse weitgehend bestätigt.

Um eventuell bestehende Unterschiede im zeitlichen Verlauf des Gesamt-IgG besser darstellen zu können, wurden vor der Probiotika-Supplementierung von allen Tieren am 91. Tag *a. p.* Basalwerte gewonnen. Ab dem 90. Tag *a. p.* erhielten die Probiotikatiere den Futterzusatzstoff *E. faecium* bzw. *B. cereus* var. Toyoi bei ansonsten gleichem Futter wie die Kontrolltiere.

In beiden Versuchen wurden die höchsten Gesamt-IgG-Werte in der ersten Messung, also am Tag 91. *a. p.*; und am 14. Tag nach der Geburt ermittelt. In allen Gruppen sanken die Messwerte bis zur Hochträchtigkeit, d. h. die niedrigsten Werte wurden am 10. Tag *a. p.* bzw. am 3. Tag *a. p.* gemessen. Probiotika- und Kontrollgruppen zeigten zu allen Zeitpunkten weitgehend vergleichbare Ergebnisse. Interessanterweise wurde durch die Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied zwischen dem 1. und 2. Versuchsdurchgang ermittelt ($p \leq 0,05$). Die Messwerte waren im *E. faecium*-Versuch (beide Gruppen) signifikant höher als im *B. cereus* var. Toyoi -Versuch. Eine Erklärung könnte einerseits an veränderte Laborbedingungen liegen. Z. B. wurde für den 2. Versuch eine andere Charge

Mikrotiterplatten verwendet. Des Weiteren wurden die Proben des 2. Versuches (*B. cereus* var. Toyoi) mit einem neu erworbenen ELISA-Platten-Washer gewaschen. Sämtliche für den 2. Versuch bezogenen Reagenzien / Chemikalien / Lösungen wurden zwar bei den gleichen Herstellern bezogen (siehe Kap. III, 2.3.), dennoch sind auch hier nicht vermeidbare Mess-Unterschiede in einem so empfindlichen Testformat wie den ELISA zu erwarten. Weiterhin sind Messwertunterschiede auch ohne veränderte Laborbedingungen möglich. Einflüsse unterschiedlicher Haltungsbedingungen wurden u. a. durch HESSING *et al.* (1994 und 1995) oder BLECHA und KELLEY (1981) beschrieben. Die Autoren untersuchten Zusammenhänge bezüglich der Eigensynthese der Immunglobuline und den Einfluss verschiedener Stressfaktoren. Sie konnten z. B. durch Absenken der Stalltemperatur auf 0 °C eine Steigerung der Antikörper-Produktion nachweisen. Neben veränderten Fütterungs- und Haltungsbedingungen sind in der Literatur auch genetische Einflüsse hinsichtlich der Immunität beschrieben. HERRMANN (1984) fand beim Schwein signifikante Rasseunterschiede hinsichtlich der IgG-Serumkonzentration und ein unterschiedliches Antikörper-Bildungs-Vermögen gegen Tetanustoxoide. Dabei entwickelten die Kreuzungstiere gegenüber den reinrassigen Tieren deutlich höhere Titer.

Die beiden Versuche fanden im zeitlichen Abstand von ca. einem Jahr statt. Da beide Versuche unter Praxisbedingungen durchgeführt wurden, sind auch Einflussfaktoren wie der Gesundheitsstatus der Tiere oder klimatisch veränderte Bedingungen in Betracht zu ziehen. Um diese Einflüsse zu vernachlässigen, wurden ausschließlich nur klinisch gesunde Tiere für die Versuche verwendet. Kranke oder krank gewordene Tiere wurden aus dem Versuch entfernt. Die Versuchs- und Kontrollgruppen wurden zeitgleich untersucht. Es erscheint daher sinnvoll, das Augenmerk der Analysen auf die Gruppenunterschiede zu beschränken.

In den eigenen Untersuchungen wurde durch die probiotischen Futterzusatzstoffe *E. faecium* und *B. cereus* var. Toyoi kein Einfluss auf die IgG-Produktion tragender oder laktierender Sauen ermittelt.

2. Untersuchungen zum Einfluss der probiotischen Futterzusatzstoffe *E. faecium* und *B. cereus* var. Toyoi auf den Immunstatus von Ferkeln

2.1. Einfluss auf Gesamt-IgA in den Faeces der Ferkel

Seit Januar 2006 ist der Einsatz antibiotischer Leistungsförderer in der Europäischen Union verboten. Die ökonomischen Zwänge der Ferkelerzeuger- und Mastbetriebe bei artgerechter Haltung der Tiere auf der einen Seite und die Belieferung der Verbraucher mit Qualitätsfleisch auf der anderen Seite fordern von der Futtermittelindustrie hochwertige Produkte und Alternativen, um den Gesundheitsstatus der Ferkel und Masttiere aufrecht zu erhalten und zu verbessern.

In den eigenen Untersuchungen sollten durch Messungen des sekretorischen Faeces-IgA Aussagen darüber gewonnen werden, inwieweit die probiotischen Kulturen *E. faecium* bzw. *B. cereus* var. Toyoi die lokale Immunantwort des Darmes bei Saugferkeln und Läufern beeinflussen können. Insbesondere interessierte der Zeitraum der so genannten „immunologischen Lücke“. Dies stellt die Zeitspanne dar, in dem die maternalen Antikörper weitgehend abgebaut sind und die Eigensynthese der Immunglobuline bei den Ferkeln noch nicht ausreichend gewährleistet ist. In diesen Zeitraum fällt auch der Absetzzeitpunkt, der nach der EU-Richtlinie 2001/93/EG ab dem 28. Lebenstag gestattet ist. Zahlreiche Stressoren (Absetzen von der Mutter, neue Tiergruppen, neue Stallungen und damit veränderter Keimdruck, Rangkämpfe, Futterumstellung u. a.) wirken auf die jungen Tiere ohne ausreichenden Immunschutz ein, wodurch Krankheitsdispositionen geschaffen werden. Die Folge sind z. B. Indigestionen mit Durchfällen, daraus resultierenden Minderzunahmen, ein erhöhter Medikamenteneinsatz und demzufolge wirtschaftliche Einbußen.

Im ersten Versuch (*E. faecium*) wurden 123 Proben Faeces der Probiotikagruppe und 130 Proben der Kontrollgruppe zu 8 Zeitpunkten im wöchentlichen Abstand, beginnend am 7. Lebenstag, gemessen. Die Messwerte der Probiotikagruppe im *E. faecium*-Versuch waren am 7. Lebenstag signifikant höher als die Messwerte der Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$). Dies könnte auf eine verbesserte maternale Versorgung der Probiotikatiere über das Kolostrum hinweisen.

Nach der histologischen Einteilung besitzt das Schwein eine *Placenta epitheliochorialis*. Daher spielt die Aufnahme von Immunglobulinen durch die Ferkel in den ersten Lebensstunden über das Kolostrum eine wesentliche Rolle. Innerhalb der ersten 24 Stunden *p. p.* fallen die Immunglobuline um ca. 85 % im Kolostrum ab (KLOBASA und BUTLER,

1987). Da in beiden Versuchen nur klinisch gesunde Tiere (Sauen und Ferkel) untersucht wurden, kann nicht von einer zwischen den Gruppen bestehenden veränderten maternalen Immunglobulin-Versorgung der Ferkel ausgegangen werden. Fehlerquellen wie z. B. eine zeitlich verzögerte Aufnahme von Kolostrum bestanden für alle Tiere gleichermaßen und können daher unberücksichtigt bleiben.

Im weiteren 1. Versuchsverlauf (*E. faecium*) sanken die Messwerte in beiden Gruppen. Während die niedrigsten sIgA-Titer in der Probiotikagruppe am 35. Lebenstag, also eine Woche nach dem Absetzen, gemessen wurde, wurden diese in der Kontrollgruppe am 49. Lebenstag gemessen. Am 35. und 56. Lebenstag waren die Messwerte in der Probiotikagruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$). Zum einen zeigt dies, dass trotz signifikant höherem Antikörper-Titer am 7. Lebenstag, also trotz einer wahrscheinlich verbesserten maternalen Immunglobulinversorgung der Probiotikatiere, nicht mittelbare Rückschlüsse auf den weiteren Antikörper-Verlauf gezogen werden können. Die IgA-Titer am 7. Lebenstag entsprechen direkt der passiven Immunisierung über das Kolostrum. Durch diesen erhöhten Antikörper-Schutz könnte die Probiotikagruppe möglicherweise gegenüber Antigen-Expositionen besser geschützt sein. Die Halbwertszeit für IgA beträgt etwa 6 Tage (DRÖBLER *et al.*, 2000; KIEFEL *et al.*, 2005). Die Resorption der Immunglobuline aus dem Kolostrum wird mit abnehmender Tendenz und für maximal 36 Stunden beschrieben (WICHERN, 1993). Aus diesem Grunde kann man auch noch am 7. Lebenstag davon ausgehen, dass die Antikörper-Titer weitgehend der Aufnahme der Immunglobuline über das Kolostrum entsprechen. Nach Schluss der Darmbarriere beim Neugeborenen erfolgt die Aufnahme von Makromolekülen (schwerer als 60 Kilo Dalton) unter physiologischen Bedingungen vorrangig im Bereich der schleimhautassoziierten Lymphfollikel (PABST und ROTHKÖTTER, 1999). Die Aufnahme erfolgt über spezialisierte Epithelzellen, den M-Zellen. Sie nehmen Antigene aus dem Darmlumen auf, transportieren sie durch die Zelle und geben sie weitgehend unverändert an der basolateralen Seite in den Interzellularraum wieder ab (OWEN, 1977). In den Lymphfollikeln wird durch die Interaktionen von Antigenen mit B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und folliculären dendritischen Zellen die Proliferation und Selektion antigenspezifischer B-Zellen, sowie der Wechsel von IgM zu IgA (*class switch*) ausgelöst. KLOBASA und WERHAHN (1991) wiesen bei Schweinen ab dem 12. Lebenstag die Eigensynthese von IgA nach.

Ab dem 14. Lebenstag wurde den Probiotikatieren Beifutter mit *E. faecium* bzw. *B. cereus* var. Toyoi angeboten. Im *E. faecium*-Versuch zeigte die Probiotikagruppe am 21. und 28. Lebenstag durchschnittlich höhere Messwerte als die Kontrollgruppe, die aber nicht signi-

fikant waren. Zu diesen Zeitpunkten sind die Ferkel in der Lage, selbst geringe Mengen IgA zu synthetisieren. Möglicherweise wurde durch die Gabe von *E. faecium* ein Stimulus für die Bildung von sIgA induziert. Nachfolgend sanken jedoch die Messwerte in der Probiotikagruppe abrupt, und am 35. und 56. Lebenstag wies die Versuchsgruppe (=Probiotikagruppe) signifikant niedrigere Messwerte auf als die Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$). Der Bildung von Antikörpern gehen in jedem Fall, wie zuvor beschrieben, Antigen-Expositionen voraus. Zum einen können die gemessenen Unterschiede möglicherweise durch den Aufbau einer oralen Toleranz begründet sein. Viel wahrscheinlicher ist es jedoch, gerade durch fehlende Antigen-Stimuli erniedrigte Antikörper-Titer zu begründen, zumal innerhalb der Forschungsgruppe bei gleichen Tieren z. B. eine deutliche verminderte Durchfallhäufigkeit signifikant nachgewiesen wurde (SIMON *et al.*, 2005). Die Forschungsgruppe zeigte in ihren Untersuchungen, dass durch eine sehr frühe Applikation der Ferkel nach der Geburt mit probiotischen Kulturen, und eine Applikation an den Sauen zuvor während der Trächtigkeit und Laktation, die Durchfallinzidenz bei den Saugferkeln deutlich reduziert war. Diese Effekte wurden auch im zweiten Versuchsdurchgang beschrieben. Offenbar vermag also das Probiotikum durch andere, nicht immunologische Mechanismen, pathogene Keime zurückzudrängen.

Im 2. Versuch (*B. cereus* var. Toyoi) wurden 132 Faecesproben der Probiotikagruppe und 122 Proben der Kontrollgruppe untersucht, ebenso im wöchentlichen Abstand vom 7. bis 56. Lebenstag. Im Gegensatz zum *E. faecium*-Versuch waren hier am 7. Lebenstag zwischen den Gruppen keine Unterschiede zu verzeichnen. Auch in diesem Versuch wurde der Probiotikagruppe ab dem 14. Lebenstag Beifutter mit *B. cereus* var. Toyoi angeboten und ab dem 28. Lebenstag mit *B. cereus* var. Toyoi supplementiertes Ferkelaufzuchtfutter. In diesem Versuch fiel auf, dass die durchschnittlichen Messwerte in der Kontrollgruppe kontinuierlich bis zum 35. Lebenstag sanken, während in der Versuchsgruppe etwa gleich hohe Messwerte vom 7. bis 21. Lebenstag ermittelt wurden. Möglicherweise sind diese Ergebnisse durch *B. cereus* var. Toyoi induziert worden. Am 28. Lebenstag wies die Probiotikagruppe signifikant höhere Messwerte auf als die Kontrolle ($p \leq 0,05$).

Ab dem 35. Lebenstag zeigten die Probiotikatiere und die Kontrolltiere ähnlich hohe Messwerte. Tendenziell lag die Probiotikagruppe jedoch unter der Kontrolle. Auch hier kann man sehen, dass die positiven Ergebnisse der anderen Forschungsgruppen, die Durchfallhäufigkeit der Probiotikagruppe betreffend, mit den eigenen Ergebnissen korrelieren. SIMON *et al.* (2005) zeigten auch für *B. cereus* var. Toyoi eine signifikant reduzierte Durchfallinzidenz bei früher Applikation an den Sauen und Ferkeln. In einem Versuch der

Forschungsgruppe mit Verabreichung der probiotischen Kulturen nach dem Absetzen, also nach dem 28. Lebenstag, konnten diese Effekte nicht erzielt werden.

In den eigenen Untersuchungen wurden durch die probiotischen Futterzusatzstoffe *E. faecium* und *B. cereus* var. Toyoi Einflüsse auf die sIgA-Produktion bei Saug- und Absetzferkeln ermittelt.

2.2. Einfluss auf Gesamt-IgG im Serum der Ferkel

In der Literatur sind zahlreiche Effekte durch Probiotika beschrieben, die das lokale Immunsystem betreffen. Ob die positiven Effekte auch die systemische Immunantwort beeinflussen können, sollte durch die Messung des Gesamt-IgG bei Ferkeln, die mit *E. faecium* oder *B. cereus* var. Toyoi supplementiert wurden, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe gezeigt werden. Bei den gleichen Ferkeln aus 2.1. wurde im wöchentlichen Abstand ab dem 7. LT Serum gewonnen und Gesamt-IgG durch einen Sandwich-ELISA bestimmt.

Im *E. faecium*-Versuch wurden Serumproben von 78 Tieren der Probiotikagruppe und 70 Kontrollproben untersucht im wöchentlichen Abstand vom 7. bis 56. LT.

Im *B. cereus* var. Toyoi -Versuch wurden 60 Probiotikaproben und 64 Kontrollproben Serum ebenso im gleichen wöchentlichen Abstand gemessen.

Der Kurvenverlauf zeigt in allen Gruppen deutlich die passive Immunisierung über das Kolostrum und nachfolgend den physiologischen Abbau der mütterlichen Immunglobuline. Der Plazentatyp des Schweines (*Placenta epitheliochorialis*) mit seinen verschiedenen Gewebeschichten zwischen maternaler und fetaler Blutzirkulation verhindert einen diaplazentaren Übergang von Immunglobulinen (TIZARD, 1992). Aus diesem Grunde sind die Ferkel vollständig auf einen passiven, kolostralen Immunschutz angewiesen. Die Ergebnisse aus beiden Versuchen zeigen, dass die Tiere aus beiden Gruppen mit IgG via Kolostrum ähnlich versorgt wurden. In beiden Versuchen lagen jedoch die arithmetischen Mittelwerte der Probiotikagruppen über denen der mitgeführten Kontrollgruppen. Obwohl diese Ergebnisse nicht signifikant waren, besteht möglicherweise auch hierin ein Zusammenhang mit den signifikant erhöhten IgA-Titern in den Faeces der Ferkel aus Versuch 1 (*E. faecium*) und einer verbesserten maternalen Immunglobulin-Versorgung.

Anschließend sanken die Antikörper-Titer erwartungsgemäß in beiden Gruppen. Die Halbwertszeit von IgG ist in der Literatur unterschiedlich angegeben. Insbesondere schei-

nen tierartlich sehr große Unterschiede zu bestehen. Während KIEFEL und GREINACHER (2005) bei den Menschen eine durchschnittliche Halbwertszeit von 23 Tagen angeben, untersuchten CURTIS und BOURNE (1973) die Halbwertszeit von porcinem IgG und geben diese mit 7 – 14 Tagen an. Bei der Ratte wird die Halbwertszeit von IgG sogar mit nur 5 Tagen angegeben (SCHLIESSER, 1990). MILLER *et al.* veröffentlichten 1961 IgG-Konzentrationen bei Schweinen von der Geburt bis zum Zeitpunkt von zwei Jahren. Nach 3 Wochen wurden die niedrigsten IgG-Konzentrationen gemessen, die auch in der 6. Lebenswoche fast unverändert niedrig waren. Der starke Abfall der Immunglobulin-Titer im Serum wird bei LANG (2004) einerseits mit dem Abbau der maternalen Antikörper, andererseits aber auch mit einem Verdünnungseffekt durch die wachstumsbedingte Zunahme des Blutvolumens begründet. In den eigenen Untersuchungen wurden die niedrigsten Konzentrationen in beiden Versuchen bei beiden Gruppen zwischen dem 28. und 35. Lebenstag gemessen. Diese Ergebnisse entsprechen denen von MILLER *et al.* (1961). Augenscheinlich war jedoch in beiden Versuchen, dass nach dem Absetzen, also nach dem 28. Lebenstag, in beiden probiotischen Gruppen (*E. faecium* und *B. cereus* var. Toyoi) die Titer zu allen weiteren Messzeitpunkten (35., 42., 49. und 56. Lebenstag) immer unter den Messwerten der Kontrolltiere lagen. Während die Ergebnisse im *E. faecium*-Versuch nicht signifikant waren, wurden im *B. cereus* var. Toyoi-Versuch am 56. Lebenstag bei der Probiotikagruppe signifikant niedrigere Messwerte ermittelt ($p \leq 0,05$). Diese Ergebnisse bzw. Tendenzen der IgG-Entwicklung korrelieren mit den ermittelten IgA-Titern. Der durch humorale Antikörper zustande kommende Schutzeffekt ist immer eine Antwort auf antigene Stimulationen. Sofern dieser Antigenkontakt fehlt, können die Effektorfunktionen des Immunsystems nicht initialisiert werden. Die Ergebnisse der anderen Forschungsgruppen mit einbeziehend, könnten die verminderten IgG-Titer in den Versuchsgruppen nach dem 28. LT möglicherweise mit dem verbesserten Gesundheitsstatus der Tiere und den daraus resultierenden fehlenden Antigen-Stimuli zusammenhängen.

In den eigenen Untersuchungen wurden durch die probiotischen Futterzusatzstoffe *E. faecium* und *B. cereus* var. Toyoi Einflüsse auf die IgG-Produktion bei Saug- und Absetzferkeln ermittelt.

3. Untersuchungen zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen die Shiga-Toxin-Variante 2e (Stx2e) bei *E. coli* (STEC) der Serogruppen O138:K81 und O141:K85ac im Serum ausgewählter Tiere aus Versuch 1

77 Ferkelproben von 10 Kontrolltieren und 4 Probiotikatieren sowie 6 Proben einer Probiotika-Sau wurden in diesem Versuch mit einem spezifischen ELISA auf den Nachweis spezifischer Antikörper gegen die Shiga-Toxin-Variante 2e bei *E. coli* der Serogruppen O138:K81 und O141:K85ac getestet. Das Versuchsdesign inklusive der Materialien, Reagenzien, Antikörper und sonstiger Lösungen wurden mit freundlicher Unterstützung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen entwickelt bzw. genutzt und dort auch durchgeführt. Es wurden nur solche Tiere ausgewählt, bei denen zuvor parallel im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen Virulenzfaktoren gegen die oben beschriebene Shigatoxin-Variante gefunden wurden.

Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC) der Serogruppen O138:K81 und O141:K85ab und ac verursachen bei Absetzferkeln im Alter von 4-6 Wochen die Ödemkrankheit. Hauptvirulenzfaktor und verantwortlich für die typischen Krankheitssymptome ist die von den Erregern produzierte Shigatoxin-Variante 2e (Stx2e). Durch dieses Toxin wird die Bildung von Ödemen in der Unterhaut von Augenlidern, auf dem Nasenrücken, im Gekröse, in der Magenwand und im Gehirn ausgelöst (MACLEOD *et al.*, 1991).

Alle Tiere zeigten während des Untersuchungszeitraumes keinerlei Klinik.

Von den 10 Kontrollferkeln zeigten 5 Tiere und von den 4 Probiotikaferkeln ein Tier niedrige Antikörper-Titer in den ersten Lebenstagen und Wochen, die sie offenbar *via* Kolostrum von der Mutter erhalten hatten, da sich diese Messwerte mit der Zeit verringerten. Ein Kontrolltier entwickelte nach dem 35. LT spezifische Antikörper-Titer, die am 42. Lebenstag mit „1+“ und am 49. und 56. Lebenstag mit „2+“ bewertet wurden. In parallelen Versuchen innerhalb dieses Projektes wiesen SCHAREK *et al.* (2005) nach Verabreichung von *E. faecium* NCIMB 10415 eine Halbierung der Nachweishäufigkeit β -hämolytischer *E. coli* sowie der *E. coli* Serovare O139, O141 und O147 gegenüber den Kontrolltieren nach (siehe Kap. II, Punkt 2.5.4.). AUDISIO *et al.* (1999, 2000), COLLINS und GIBSON (1999) beschrieben eine Senkung des pH-Wertes im Darmchymus durch die Produktion von Laktat und anderen organischen Säuren, welche der Vermehrung und Toxinbildung pathogener Keime wie *E. coli* entgegenwirken können. MÄNNER *et al.* (2002) wiesen ebenso signifikant höhere Laktatgehalte im Dünndarmchymus von Puten nach Einsatz von *E. faecium* nach. GEDEK *et al.* (1993) vermuteten, das hierdurch der Wirtsorganismus von toxischen Metaboliten wie Ammoniak und biogenen Aminen entlastet werden kann. JIN *et al.* (2000) stellten fest, dass ein *E. faecium*-Stamm 18 C 23 in dosisabhängiger Weise die Anheftung von *E. coli* K88 und K8MB an die Darmmukosa effizient verhindern kann. Dieser Effekt trat bis zu 90 % auf, wenn mindestens 10^9 KfE pro ml zusammen mit *E. coli*

verabreicht wurden. VIERA *et al.* (1999) untersuchten die Anzahl von Laktobazillen bei Ferkeln, gemessen in der *Ileum*Wand und im *Ileum*-Inhalt nach Gabe von Laktobazillen. Die Auswertung ergab in der Laktobazillus-Gruppe weniger *E.coli*-Tiere und -Gehalte als in der Kontrollgruppe.

Die eigenen Untersuchungen bekräftigen diese Thesen, zumal im eigenen Versuch mehr als doppelt so viele Kontrollferkel wie Probiotikaferkel untersucht wurden. Das einzig gefundene seropositive Tier, welches offenbar nicht schon mit der Kolostralmilch Antikörper aufgenommen hatte und erst nach dem Absetzen durch Eigensynthese (ca. ab dem 35. Lebenstag) spezifische Antikörper-Titer gegen die Shiga-Toxin-Variante 2e entwickelte, war ein Tier aus der Kontrollgruppe! Ebenso wurden wesentlich mehr Tiere aus der Kontrollgruppe ermittelt, welche passiv von der Mutter mit den spezifischen Antikörpern versorgt wurden und diese antitoxischen Titer bis zum Absetzalter aufwiesen (5 Tiere von 10 Kontrolltieren; 1 Tier von 4 Probiotikatieren). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen von SCHAREK *et al.* (2005) und untermauern einen deutlichen Effekt für Probiotika.

Die einzige untersuchte Sau war ein Tier aus der Probiotikagruppe. Hier wurden spezifische Antikörper-Titer gemessen, die mit „1+“ oder „2+“ bewertet wurden. Auch dieses Tier zeigte schon aufgrund seines Alters keine Klinik für eine Ödemkrankheit. In den Versuchen von FRANKE *et al.* (1999) wurden in Problembetrieben mit Ödemkrankheit bis zu 100 % seropositive Tiere nachgewiesen. Die Autoren zeigten, dass fast alle Sauen über antitoxische Antikörper-Titer verfügen. Die Ferkel der untersuchten Muttertiere wiesen ebenso Antitoxine im Blutserum auf, welche im Laufe von vier Wochen abfielen. Ab der fünften Lebenswoche stiegen die spezifischen Antikörper-Gehalte durch die Eigensynthese langsam wieder an. Diese Befunde wurden durch die eigenen Untersuchungen bestätigt.

Kritisch muss angemerkt werden, dass eine weitere Verlaufskontrolle des spezifischen Antikörper-Gehaltes bzw. das Beobachten des positiven Tieres hinsichtlich einer Klinik interessant wäre. Ebenso wären gleiche Untersuchungen zum Antitoxin-Gehalt im Serum des Muttertieres sinnvoll. Aus logistischen Gründen erfolgten hier keine weiteren Untersuchungen.

In den eigenen Untersuchungen zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen die Shiga-Toxin-Variante 2e (Stx2e) bei *E. coli* (STEC) der Serogruppen O138:K81 und O141:K85ac im Serum ausgewählter Tiere aus Versuch 1 wurde deutlich ein positiver Effekt durch die Supplementierung mit *E. faecium* ermittelt.

4. Schlussfolgerungen

- 1) *E. faecium* NCIMB 10415 hat keinen Einfluss auf die sekretorische IgA-Produktion im Darm von gesunden, tragenden und laktierenden Sauen.
- 2) *B. cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 beeinflusst die sekretorische IgA-Produktion in den Faeces tragender und laktierender Sauen im Sinne einer Steigerung.
- 3) *E. faecium* NCIMB 10415 und *B. cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 haben möglicherweise einen Einfluss auf die sekretorische IgA-Produktion in der Molke von gesunden, tragenden und laktierenden Sauen. Auf Grund der geringen Probenanzahl konnte kein gezielter Effekt gezeigt werden.
- 4) *E. faecium* NCIMB 10415 und *B. cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 haben keinen Einfluss auf die systemische Immunreaktion - gemessen am Gesamt-IgG im Serum - bei gesunden, tragenden und laktierenden Sauen.
- 5) *E. faecium* NCIMB 10415 hat einen Einfluss auf das darmassoziierte Immunsystem der Ferkel im Sinne einer erhöhten maternalen Gesamt-IgA-Versorgung, gemessen in den Faeces der Ferkel am 7. Lebenstag. ($p \leq 0,05$).
- 6) *E. faecium* NCIMB 10415 hat einen Einfluss auf das darmassoziierte Immunsystem der Ferkel nach dem Absetzen (28. Lebenstag) im Sinne eines verringerten Gesamt-IgA-Gehaltes in den Faeces. Die Ursachen sind möglicherweise auf eine verbesserte Darmgesundheit der Tiere (Ergebnis der anderen Forschungsgruppen) zurückzuführen und damit verbundenen fehlenden Antigenstimuli. Die Entwicklung einer oralen Toleranz muss ebenso in Betracht gezogen werden.
- 7) *B. cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 hat einen Einfluss auf das darmassoziierte Immunsystem der Ferkel bis zum Absetzalter im Sinne einer verbesserten Gesamt-IgA-Versorgung (schnellerer Antikörper-Abfall bei den Kontrolltieren vom 7. bis zum 28. Lebenstag; 28. Lebenstag - $p \leq 0,05$).
- 8) *E. faecium* NCIMB 10415 und *B. cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 haben einen Einfluss auf das systemische Immunsystem der Ferkel im Sinne einer tendenziell verbesserten IgG-Versorgung *via* Kolostrum (erhöhte arithmetische Mittelwerte bis zum 28. Lebenstag – ohne nachgewiesene Signifikanz)
- 9) *B. cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 hat einen Einfluss auf das systemische Immunsystem der Ferkel nach dem Absetzen im Sinne eines verringerten Gesamt-IgG-Gehaltes im Serum (35. und 56. Lebenstag, $p \leq 0,05$). Dieser Einfluss ist mögli-

cherweise ebenso auf einen verbesserten Gesundheitsstatus der Tiere zurückzuführen (Ergebnis der anderen Forschungsgruppen).

- 10) *E. faecium* NCIMB 10415 hat einen Einfluss auf die spezifische Antikörper-Produktion gegen die Shiga-Toxin-Variante 2e (Stx2e) bei *E. coli* (STEC) der Serogruppen O138:K81 und O141:K85ac. In der Probiotikagruppe wurden bei weniger als halb so vielen Ferkeln wie in der Kontrollgruppe zuvor in parallelen Versuchen spezifische Virulenzfaktoren gefunden. Die eigenen Untersuchungen zeigten ebenso, dass von den Kontrolltieren die Hälfte der Tiere über spezifische Antikörper verfügt, während dies in der Versuchsgruppe nur ein Viertel der Tiere waren. Ein seropositives Tier mit Beurteilung „2+“ stammte aus der Kontrollgruppe.

5. Ausblick

Fasst man die vorgenannten Ergebnisse der beiden probiotischen Kulturen *E. faecium* NCIMB 10415 und *B. cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 zusammen, muss von einer deutlichen Immunmodulation ausgegangen werden. Die erzielten Effekte waren besonders bei jungen und sehr jungen Tieren ausgeprägt, bei denen sich die Eigensynthese der Immunglobuline erst entwickelt. Da die Versuche 1 und 2 nur mit klinisch gesunden Tieren durchgeführt wurden, kann man vermuten, dass die zuvor beschriebenen Effekte nach Probiotikasupplementierung wesentlich deutlicher in Problembeständen bzw. bei klinisch kranken Tieren zutage treten würden.

Die Analyse der gemessenen erniedrigten sIgA- und IgG-Titer bei den Probiotika-Ferkeln gegenüber den Kontrolltieren nach dem Absetzen – die vermutlich auf einen verbesserten Gesundheitsstatus basieren - zeigen, dass es nach wie vor in der Praxis gilt, zu allererst die Haltungsbedingungen zu optimieren. Wenn eine optimale Darmgesundheit im Sinne einer Eubiose erreicht wurde, können probiotische Futterzusätze wie *E. faecium* NCIMB 10415 oder *B. cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 helfen, diese Balance aufrecht zu erhalten. Wenn das Fließgleichgewicht jedoch gestört ist, zeigen die Ergebnisse z.B. aus Versuch 3, dass der Einsatz von probiotischen Kulturen gezielt Krankheitsdispositionen reduzieren und ggf. das Auftreten klinischer Krankheitserscheinungen verhindern kann.