

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Untersuchungen zum protektiven Einfluss verschiedener  
Futterzusatzstoffe auf die gastrointestinale und systemische  
Besiedlung mit *Salmonella enterica* nach experimenteller  
Infektion bei Broilern**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von  
**Nina Tippkemper**  
Warendorf

Hannover 2010

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. G. Breves

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Breves
2. Gutachter: Prof. Dr. S. Rautenschlein PhD

Tag der mündlichen Prüfung: 18.5.2010

Diese Arbeit wurde unterstützt durch Lohmann Animal Health und das Land  
Niedersachsen

für Jens und meine Eltern



## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Rechtliche Grundlagen	1
1.2	Die aviäre Darmflora	2
1.3	Salmonellen – Epidemiologie, Klinik und Bekämpfung	4
1.4	Probiotika – Definition und Anwendung	7
1.5	Ziel dieser Studie	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1	Versuchsaufbau	14
2.1.1	Gruppeneinteilung .....	14
2.1.2	Versuchsablauf.....	17
2.2	Versuchstiere	18
2.2.1	Herkunft, Haltung und Fütterung .....	18
2.2.2	Temperatur- und Lichtregime .....	19
2.2.3	Kennzeichnung.....	19
2.2.4	Töten der Tiere .....	19
2.3	Infektion	20
2.3.1	Herstellung der Challenge-Kultur.....	20
2.3.2	Verabreichung der Challenge-Kultur.....	21
2.3.3	Impfung.....	21
2.4	Bakteriologische Untersuchung	22
2.4.1	Qualitative bakteriologische Untersuchungen.....	22
2.4.2	Quantitative bakteriologische Untersuchung .....	22

2.5	Epithel-physiologische Untersuchungen	25
2.5.1	Aufbau der Ussing-Kammer .....	25
2.5.2	Pufferlösungen .....	27
2.5.3	Gewinnung der Proben.....	28
2.5.4	Präparation und Einspannen der Darmabschnitte.....	28
2.5.5	Eich- und Messperiode.....	30
2.5.6	Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten.....	32
2.5.7	Auswertung elektrophysiologischer Parameter.....	33
2.6	Histologische Untersuchung	34
2.6.1	Probenentnahme .....	34
2.6.2	Präparation der Darmabschnitte.....	34
2.6.3	Anfertigung der Schnitte .....	34
2.6.4	Entparaffinierung .....	34
2.6.5	HE-Färbung .....	35
2.6.6	Statistische Auswertung .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	Gewichtsentwicklung	36
3.2	Bakteriologische Untersuchung	40
3.2.1	Quantitative bakteriologische Untersuchung .....	40
3.2.2	Tupferproben .....	47
3.3	Epithel-physiologische Versuche	51
3.3.1	Kurzschlussstrom $I_{sc}$ und Gewebeleitfähigkeit $G_t$ .....	51
3.3.2	Unidirektionale Fluxraten .....	67
3.4	Histologie	68
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>69</b>
4.1	Die aviäre Darmflora	69
4.2	Probiotika	71
4.3	Salmonellen	72
4.4	Infektionsmodell	72
4.5	Gewichtsentwicklung	73

4.6	Prinzip der Ussing-Kammer-Technik	74
4.7	Untersuchung der parazellulären Permeabilität	75
4.8	Bakteriologische Untersuchungen	76
4.9	Histologische Untersuchungen	77
4.10	Versuchsreihe 1	77
4.10.1	Versuchsaufbau und eingesetzte Futterzusatzstoffe .....	77
4.10.2	Epithel-physiologische Versuche .....	78
4.10.3	Bakteriologische Untersuchungen .....	79
4.11	Versuchsreihe 2	79
4.11.1	Versuchsaufbau und eingesetzte Futterzusatzstoffe .....	79
4.11.2	Epithel-physiologische Versuche .....	81
4.11.3	Bakteriologische Untersuchungen .....	82
4.12	Versuchsreihe 3	82
4.12.1	Versuchsaufbau und eingesetzte Futterzusatzstoffe .....	82
4.12.2	Epithel-physiologische Versuche .....	86
4.12.3	Bakteriologische Untersuchungen .....	86
4.13	Versuchsreihe 4	87
4.13.1	Versuchsaufbau und eingesetzte Futterzusatzstoffe .....	87
4.13.2	Epithel-physiologische Versuche .....	87
4.13.3	Bakteriologische Untersuchungen .....	88
4.14	Versuchsreihe 5	88
4.14.1	Versuchsaufbau und eingesetzte Futterzusatzstoffe .....	88
4.14.2	Epithel-physiologische Versuche .....	89
4.14.3	Bakteriologische Untersuchungen .....	90
4.15	Schlussfolgerungen	90
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>

**8 Danksagung ..... 112**



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Versuchsablauf	13
Abb. 2 Bakteriologische Untersuchung Caecuminhalt	23
Abb. 3 Bakteriologische Untersuchung Leber	24
Abb. 4 Schematischer Aufbau der Versuchsapparatur	25
Abb. 5 Einteilung der Blinddarmabschnitte	28
Abb. 6 Aufspannen des Darmgewebes	29
Abb. 7 Strukturformel des Diterpentans Forskolin	31
Abb. 8 Gewichtsentwicklung 1. VR	36
Abb. 9 Gewichtsentwicklung 2. VR	37
Abb. 10 Gewichtsentwicklung 3. VR	37
Abb. 11 Gewichtsentwicklung 4. VR	38
Abb. 12 Gewichtsentwicklung 5. VR	38
Abb. 13 Bakteriologische Untersuchung Caecum 1. VR	40
Abb. 14 Bakteriologische Untersuchung Leber 1. VR	41
Abb. 15 Bakteriologische Untersuchung Caecum 2. VR	41
Abb. 16 Bakteriologische Untersuchung Leber 2. VR	42
Abb. 17 Bakteriologische Untersuchung Caecum 3. VR	43
Abb. 18 Bakteriologische Untersuchung Leber 3. VR	43
Abb. 19 Bakteriologische Untersuchung Caecum 4. VR	44
Abb. 20 Bakteriologische Untersuchung Leber 4. VR	45
Abb. 21 Bakteriologische Untersuchung Caecum 5. VR	45
Abb. 22 Bakteriologische Untersuchung Leber 5. VR	46
Abb. 23 Tupferproben 1. VR	47
Abb. 24 Tupferproben 2. VR	48
Abb. 25 Tupferproben 3. VR	48
Abb. 26 Tupferproben 4. VR	49
Abb. 27 Tupferproben 5. VR	50
Abb. 28 Sekretorischer Response	51
Abb. 29 Epithel-physiologische Versuche Kurzschlussstrom 1. VR	52
Abb. 30 Epithel-physiologische Versuche Gewebeleitfähigkeit 1. VR	53

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 31 Gewebeleitfähigkeit im Gruppenvergleich 1. VR	53
Abb. 32 Gewebeleitfähigkeit; Vergleich der Gruppen über die Zeit 1. VR	54
Abb. 33 Epithel-physiologische Versuche Kurzschlussstrom 2. VR	55
Abb. 34 Epithel-physiologische Versuche Gewebeleitfähigkeit 2. VR	56
Abb. 35 Gewebeleitfähigkeit im Gruppenvergleich 2. VR	57
Abb. 36 Gewebeleitfähigkeit; Vergleich der Gruppen über die Zeit 2. VR	57
Abb. 37 Epithel-physiologische Versuche Kurzschlussstrom 3. VR	58
Abb. 38 Epithel-physiologische Versuche Gewebeleitfähigkeit 3. VR	59
Abb. 39 Gewebeleitfähigkeit im Gruppenvergleich 3. VR	59
Abb. 40 Gewebeleitfähigkeit; Vergleich der Gruppen über die Zeit 3. VR	60
Abb. 41 Epithel-physiologische Versuche Kurzschlussstrom 4. VR	61
Abb. 42 Epithel-physiologische Versuche Gewebeleitfähigkeit 4. VR	62
Abb. 43 Gewebeleitfähigkeit im Gruppenvergleich 4. VR	63
Abb. 44 Gewebeleitfähigkeit; Vergleich der Gruppen über die Zeit 4. VR	63
Abb. 45 Epithel-physiologische Versuche Kurzschlussstrom 5. VR	64
Abb. 46 Epithel-physiologische Versuche Gewebeleitfähigkeit 5. VR	65
Abb. 47 Gewebeleitfähigkeit im Gruppenvergleich 5. VR	65
Abb. 48 Gewebeleitfähigkeit; Vergleich der Gruppen über die Zeit 5. VR	66

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BPLS	Brillantgrün Phenolrot Lactose Saccharose
Bq	Bequerel
BS	Buttersäure
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CE	Competitive Exclusion
Ci	Curie
cm	Zentimeter
d	Tag
dpi	Tage nach der Infektion (days post infection)
E.	Escherichia
EcA	E. coli Abbotstown
EcN	E. coli strain Nissle
et al.	et alii
EU	Europäische Union
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
GIT	Gastro-Intestinal-Trakt
G <sub>t</sub>	Gewebeleitfähigkeit
h	Stunde
IfSG	Infektionsschutz-Gesetz
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom
Kap.	Kapitel
KbE	Koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm

## Abkürzungsverzeichnis

---

l	Liter
LAB	lactic acid bacteria-based culture
Lact.	Lactobacillus
LT	Lebenstag
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mosmol	Milliosmol
mS	Millisiemens
ms	mukosal $\pm$ serosal
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
n.s.	nicht signifikant
NA	Nalidixin(säure)
P	Probiotikum
PBS	phosphate buffered saline
ppm	parts per million
S.	Salmonella
Sac.	Saccharomyces
SCFA	short chain fatty acids
SD	Standardabweichung
SE	<i>Salmonella Enteritidis</i>
SEM	Standardfehler
sm	serosal $\pm$ mukosal
sog.	so genannte
SPF	spezifisch pathogenfrei
spp	Spezies
ST	<i>Salmonella Typhimurium</i>
Tab.	Tabelle
VO	Verordnung
VR	Versuchsreihe

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Gruppeneinteilung	14
Tab. 2 Verwendete Futterzusätze	16
Tab. 3 Futterrezeptur [g/kg]	19
Tab. 4 Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung für die Agarbrücken	26
Tab. 5 Pufferzusammensetzung Ussing-Kammer-Versuche	27
Tab. 6 Unidirektionale Fluxraten von $^3\text{H}$ -Mannit [ $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	67



# 1 Einleitung

Infektionen mit Salmonellen sind eine der häufigsten Ursachen für Durchfallerkrankungen beim Menschen. Im Jahr 2008 wurden gemäß Meldepflicht nach Infektionsschutz-Gesetz (IfSG) insgesamt 45.401 Infektionen gemeldet, davon 42.902 Erkrankungen (2009). Davon entfallen rund 70% auf *Salmonella Enteritidis*, 25% auf *Salmonella Typhimurium* und ca. 1% auf *Salmonella Infantis* (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2006). Das weltweit dominierende Serovar ist *Salmonella Enteritidis* (GANTOIS et al. 2008).

Im Folgenden wird die vereinfachte Schreibweise mit der international verwendeten Abkürzung *Salmonella* für *Salmonella enterica* *Subspezies enterica* und der nachfolgenden Bezeichnung für das Serovar verwendet. Zum Beispiel wird statt der korrekten Schreibweise *Salmonella enterica* *Subspezies enterica* *Serovar Enteritidis* nur *Salmonella Enteritidis* ausgeschrieben.

## 1.1 Rechtliche Grundlagen

In der Hühner-Salmonellen-Verordnung (2009) werden Salmonellen in zwei Kategorien eingeteilt. Zur Kategorie 1 gehören *Salmonella Enteritidis* und *Salmonella Typhimurium* (jeweils ausgenommen Impfstämme) und zur Kategorie 2 *Salmonella Hadar*, *Salmonella Virchow* und *Salmonella Infantis* (ebenfalls ausgenommen Impfstämme). Der Verdacht auf eine Infektion mit Salmonellen dieser beiden Kategorien oder mit *Salmonella Gallinarum Pullorum* ist vom Besitzer eines Zuchtbetriebes oder einer Brüterei unverzüglich der zuständigen Behörde mitzuteilen. Besitzer eines Aufzucht-, Legehennen- oder Masthähnchenbetriebes sind verpflichtet, den Verdacht auf eine Infektion mit Salmonellen der Kategorie 1 oder mit *Salmonella Gallinarum Pullorum* unverzüglich mitzuteilen (§4). Die Impfung gegen Salmonellen der Kategorien 1 und 2 kann von der zuständigen Behörde für Betriebe angeordnet werden, in denen weniger als 250 Hühner zu Zucht- und Vermehrungszwecken, weniger als 350 Junghennen oder weniger als 350 Hühner zum Zwecke der Konsumeierproduktion gehalten werden (§3).

Die Verordnung 2160/2003 sieht vor, dass Bekämpfungsmaßnahmen die gesamte Lebensmittelkette vom Erzeuger bis zum Verbraucher umfassen sollen. Bei Geflügelfleisch sei anzustreben, dass nur solches vermarktet wird, bei dem mit ausreichender Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass es frei von den betreffenden Salmonellen (*Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Hadar*, *Salmonella Virchow* und *Salmonella Infantis*) ist. Auch Bekämpfungsmaßnahmen und Handelsbedingungen sowie Übergangsregelungen sind in dieser Verordnung festgelegt.

### 1.2 Die aviäre Darmflora

Neben der Leber ist die Darmflora das aktivste Stoffwechselkompartiment im ganzen Organismus. Fakultative Anaerobier sind dabei für die Entstehung und Aufrechterhaltung des anaeroben Milieus im Dickdarm essentiell. Zudem wirkt die intestinale Flora als Barriere gegen pathogene Keime, sorgt für die Energieversorgung der Mukosa und reguliert die Darmperistaltik sowie die Entwicklung und Funktion des intestinalen Immunsystems (SHANAHAN 2002; GUARNER u. MALAGELADA 2003). Die ausgewogene mikrobielle Flora gesunder Individuen kann nicht detailliert definiert werden, da die Komposition variabel und von vielen Faktoren abhängig ist (HOLST u. BREVES 2005). Zwei wichtige Faktoren, die die mikrobielle Flora beeinflussen, sind die Ernährung und das Alter der Vögel (BARNES 1972). Die natürliche Darmflora schützt die Tiere in hohem Maße, wie es ein Experiment von COLLINS und CARTER (1978) verdeutlicht. Während keimfreie Mäuse bereits durch  $10^5$  KbE von *Salmonella Enteritidis* getötet wurden, betrug die letale Dosis bei konventionellen Mäusen  $10^6$  KbE. Die im Darm etablierte Flora ist sehr stabil, kann jedoch durch diätetische und umweltbedingte Faktoren beeinflusst werden. Die drei wichtigsten Faktoren sind exzessive Hygiene, Antibiotika-Therapie und Stress. Wird die Komposition der Flora durch diese Faktoren verändert, führt das zu einer erhöhten Anfälligkeit des Tieres für Infektionskrankheiten (FULLER 1989).

Die Entwicklung der Darmflora wird bei Küken durch den oft fehlenden Kontakt zu den Elterntieren und die Haltung in gereinigten und desinfizierten Ställen verzögert



(METHNER 2000). Der Hauptanteil der Entwicklung der Bakterienflora im Darm von Küken findet in den ersten 24 Stunden nach der Futteraufnahme statt. In diesem Zeitfenster sollten die Tiere im Idealfall mit der Mehrzahl der Keime in Kontakt kommen, mit denen sie auch weiterhin konfrontiert werden (LEV und BRIGGS 1956). Die weitere Etablierung der Darmflora variiert in Abhängigkeit von den Haltungs- und Fütterungsbedingungen. Sie erstreckt sich im Dünndarm über einen Zeitraum von circa zwei Wochen und im Caecum über bis zu sechs Wochen (BARNES et al. 1972; 1980).

Die Darmmukosa ist nicht nur eine physikalische Barriere sondern auch der Initiator einer angeborenen Immunantwort auf die Salmonelleninfektion. BERNDT et al. (2007) untersuchten das Potential von vier *Salmonella enterica*-Serovaren, in die Darmmukosa einzudringen und eine Immunantwort auszulösen. Während für *Salmonella Typhimurium* und *Salmonella Hadar* eine moderate und für *Salmonella Infantis* fast keine Invasivität nachgewiesen werden konnte, zeigte sich *Salmonella Enteritidis* sehr invasiv. Diese Beobachtungen gehen mit den Daten über die zelluläre Immunantwort und Interleukin mRNA- Expression im Caecum einher. Die Invasivität in die Lamina propria korrelierte mit erhöhten Zahlen von Granulozyten, CD8<sup>+</sup>-Zellen und TCR1<sup>+</sup>-Zellen und erhöhten mRNA-Expressionsraten für Interleukin 12 und 18 sowie TNF $\alpha$  und iNOS (inducible nitric oxide synthase) im Caecum. Veränderungen bei TCR2<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellen wie auch bei der IL2 mRNA-Expression zeigten sich dagegen eher von einer Infektion der Epithelzellen abhängig. Diese Studie zeigte neben einer schnellen und signifikanten mRNA-Expression von Cytokinen als Reaktion auf eine Salmonelleninfektion auch den Zusammenhang zwischen der Invasivität der Serovare und dem Level der Cytokin-Produktion.

Zur Erzielung einer effektiven Elimination wirkt ein hoch spezialisiertes lymphoides Gewebe im Darm: GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue). Eine Eigenschaft des GALTs ist die Formung eines charakteristischen Epithels, welches das lymphoide Gewebe abdeckt und M-Zellen enthält. Diese M-Zellen können bestimmte Antigene aus dem Darmlumen aufnehmen. Im Gegensatz zum hoch organisierten GALT beim Säugetier ist das der Vögel weniger gut entwickelt. Das meiste aviäre Darmgewebe ist vom Lumen durch einfaches Epithel abgetrennt. Einige spezialisierte Gewebe wie

die Caecaltonsillen, Peyer'sche Platten und das Meckel'sche Divertikel (BEFUS et al. 1980; BURNS u. MAXWELL 1986) komplettieren das Immunsystem beim Vogel.

Der Einsatz von Probiotika ist ein möglicher Ansatz zur Verminderung des Übertrittes von Salmonellen in die Lebensmittelkette. Es gibt zahlreiche Studien, die eine gesundheitsfördernde Wirkung von mit Mikroorganismen versetzten Lebensmitteln vermuten lassen (SULLIVAN u. NORD 2002a; b). LEV und BRIGGS (1956) zeigten, dass sich bei Hühnern nach der Fütterung mit einer *Lactobacillus*-Kultur eine ausbalancierte Milchsäure-Mikroflora in Duodenum, Ileum und Caecum innerhalb von 24 Stunden etablierte.

### 1.3 Salmonellen – Epidemiologie, Klinik und Bekämpfung

Aufgrund der Pathogenese und Infektionsbiologie kann *Salmonella enterica Subsp. enterica* beim Geflügel in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste beinhaltet die wirtsadaptierten Serovare *Gallinarum Gallinarum* und *Gallinarum Pullorum*, die die Pullorum-Krankheit bzw. Hühner-Typhus verursachen (CLARKE u. GYLES 1993). Die andere Gruppe besteht aus nicht wirtsadaptierten Serovaren, die Paratyphus-Infektionen verursachen. Dies sind vor allem *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Hadar*, *Salmonella Virchow* und *Salmonella Infantis*. Die Übertragung von Salmonellen von Haus- (vor allem Geflügel, Schweine und Rinder) und Wildtieren auf den Menschen erfolgt vorwiegend über den Verzehr kontaminierter Lebensmittel tierischen Ursprungs. Bei den infizierten Tieren ruft diese Spezies jedoch oftmals keine Krankheitsanzeichen hervor (KELLER et al. 1995; METHNER et al. 1995), wodurch eine Einschätzung des Risikos einer möglichen Kontamination erschwert wird. Klinische Symptome sind von der Verlaufsform der Salmonellose abhängig. Latente Infektionen zeigen oft keine klinischen Merkmale, wohingegen in akuten septikämischen Fällen Somnolenz, starker Durst, Appetitlosigkeit, Mattigkeit, Gefiedersträuben, vermehrtes Wärmebedürfnis, Flügelhängen und profuser Durchfall auftreten können. Klinisch auffällige Tiere erholen sich in der Regel rasch. Die Inkubationszeit beträgt zwei bis sechs Tage (HEIDER u. MONREAL 1992). In den meisten europäischen Geflügelbeständen treten asymptomatische Paratyphus-Infektionen auf (GAST 2003).

Wie auch bei Hühnern verläuft die Salmonellose mit Serovaren der Paratyphus-Gruppe bei Enten überwiegend ohne das Auftreten klinischer Krankheitsanzeichen. Laut HENRY (2000) wird vermutet, dass eine genetisch bedingte Toleranz der Grund hierfür ist. Die Hauptsymptome einer Salmonellose (Apathie, Diarrhoe, Kachexie, Dehydration) treten lediglich bei sehr jungen Entenküken auf. Durch *Salmonella Typhimurium* verursachte septikämische Infektionen, die sich bei älteren Mastenten seltener äußern, führen bei Entenküken in den ersten Lebenswochen zu Lungenödemem, Leber- und Lungenstauungen und einer Vergrößerung der Milz. Infektionen mit *Salmonella Enteritidis* führen nach einer Septikämie in der ersten Lebenswoche zu einer Absiedlung des Erregers auf seröse Häute und innere Organe, evt. gefolgt fibrinöser Perikarditis und Polyserositis sowie Nekrosen.

Bei Puten führen Infektionen mit Salmonellen unter den bakteriellen Infektionen zu den höchsten wirtschaftlichen Verlusten (HAFEZ u. JODAS 2000). Die Mortalität beträgt bei Puten bis zu 20% und in schweren Fällen bis zu 80% (BIERER 1960). Während die Mehrzahl der klinischen Symptome sich mit denen anderer Geflügelspezies deckt, tritt Diarrhoe bei Puten oft nicht auf. Lahmheiten als Folge von Arthritiden sind nicht ungewöhnlich (HAFEZ u. JODAS 2000).

Die Empfänglichkeit von Küken für eine Infektion mit Salmonellen, die nicht wirtsadaptiert sind, wie z. B. *Salmonella Enteritidis* und *Salmonella Typhimurium* (ROLLE u. MAYR 2002), nimmt mit steigendem Alter ab (METHNER 2000). Salmonellen sind hauptsächlich in den Blinddärmen lokalisiert (BARROW et al. 1988). Während *Salmonella Enteritidis* eher systemische Infektionen auslöst (NAKAMURA et al. 2002), siedelt sich *Salmonella Typhimurium* lokal vor allem im Kropf, den Caeca sowie der Kloake an und weniger in anderen Teilen des Intestinaltraktes. In Abwesenheit der üblichen mikrobiellen Flora scheinen Salmonellen sich durch die entstandenen verfügbaren Nischen an jedem Punkt des Verdauungstraktes ansiedeln zu können (SOERJADI et al. 1982). Um eine Enteritis auszulösen, müssen Salmonellen in der Lage sein, im sauren Milieu des Magens zu überleben und gegenüber Gallensalzen zu bestehen. Sie müssen zudem Kontakt zu den basolateralen Seiten der Epithelzellen haben, um eine inflammatorische Antwort

auszulösen, da ein wichtiger Rezeptor für bakterielles Flagellin, der Toll-like Rezeptor 5, nur basolateral lokalisiert ist (GEWIRTZ et al. 2001). In Makrophagen kann *Salmonella Typhimurium* in die Leber und Milz transportiert werden. Die Bakterien, die extrazellulär bleiben, können oben genannte Organe über die Lymphe im Ductus thoracicus und das Blut erreichen. Salmonellen vermehren sich dort mit einer Rate von 0,5-1,5 log/Tag (COTTER u. DIRITA 2000).

Eine wirkungsvolle Bekämpfung der Salmonellose sollte die gesamte Lebensmittelkette wie auch die Geflügelbestände betreffen (METHNER et al. 1995). Sie wird durch die Fähigkeit der Bakterien, im gesunden Tier zu persistieren, und die Entstehung unüberschaubarer Infektketten erschwert (SELBITZ et al. 2006). Eine Bekämpfung ist bei Salmonellen im Sinne der Hühnersalmonellen-Verordnung (2009) (*Salmonella Enteritidis* und *Salmonella Typhimurium*, ausgenommen Impfstämme) vorgeschrieben. Neben Hygienemaßnahmen in den Beständen ist vor allem die Impfung in Zuchtbeständen ab einer bestimmten Betriebsgröße als Maßnahme zur Minderung des Salmonellen-Vorkommens bei Hühnern vorgesehen. Die Impfung gegen Salmonellen zielt nicht nur auf eine Verbesserung der Gesundheit der Tiere oder eine höhere Produktivität, sondern vor allem auf den Schutz des Menschen vor dieser Zoonose (BARROW 2003). Sie soll Ausmaß und Dauer der Ausscheidung durch infizierte Tiere vermindern, die Zahl symptomloser Trägertiere reduzieren und die Immunität stimulieren. Da Salmonellen fakultativ intrazellulär sind, werden vor allem Lebendimpfstoffe eingesetzt. Anforderungen an Lebendimpfstoffe sind im Anhang I der Richtlinie 2001/82 der EU zur Schaffung eines Gemeinschaftskodes für Tierarzneimittel im Titel II unter „Besondere Anforderungen an lebende Vakzinen“ beschrieben (VO\_2001/82/EG). Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz von Lebendimpfstoffen ist die Unterscheidbarkeit des Impfstoffes von „wilde(n) Salmonellastämmen“ (VO\_1091/2005; SELBITZ et al. 2006). Lebendimpfstoffe bewirken im Gegensatz zu inaktivierten Vakzinen eine humorale und zellvermittelte Immunität (BARROW 2005). Die beim Huhn angewandten Lebendimpfstoffe werden oral verabreicht und nehmen so den natürlichen Weg der Infektion. So wird den Lymphozyten des darmassoziierten Lymphgewebes das Antigen direkt präsentiert

und die Produktion sekretorischen IgAs induziert (CLARKE u. GYLES 1993). In einer Studie von BARROW et al. (1993) wurden nach der Verabreichung von Lebendimpfstoffen weniger Salmonellen nachgewiesen als bei ungeimpften Tieren. Zudem war die Zeitspanne, in der Salmonellen detektiert werden konnten, kürzer.

### 1.4 Probiotika – Definition und Anwendung

Fermentierte Milchprodukte werden schon seit Jahrtausenden medizinisch eingesetzt. Jedoch erst in den letzten Jahrzehnten wurde die Wirksamkeit von Probiotika intensiv erforscht.

Der Begriff „Probiotikum“, der aus dem Griechischen stammt und „für das Leben“ bedeutet („pro bios“), wurde von LILLY und STILWELL (1965) eingeführt. Sie verstanden darunter von Mikroorganismen gebildete Substanzen, die andere Mikroorganismen beeinflussen können. Die Bezeichnung „Probiotikum“ basiert darauf, dass die von ihnen untersuchten Mikroorganismen (Ciliaten) sich gegensätzlich zu Antibiotika verhielten. Es wurde allerdings lediglich eine Wachstumsförderung der Ciliaten beschrieben, der Einfluss auf Gesundheitsaspekte blieb gänzlich unbehandelt (HOLST u. BREVES 2005). Die Definition von LILLY und STILWELL wurde von PARKER (1974) eingegrenzt. Er beschrieb Probiotika als Substanzen und Organismen, die zum Gleichgewicht der Darmflora beitragen. Die noch heute anerkannte Definition von FULLER (1989) besagt, dass Probiotika lebende Futterzusätze sind, die sich begünstigend auf das Gleichgewicht der intestinalen Mikroflora auswirken. Diese Definition verdeutlicht die Wichtigkeit lebender Zellen als essentielle Komponente eines effektiven Probiotikums. OUWEHAND et al. (1999) definierten eine Reihe von Soll-Eigenschaften, die ein Probiotikum erfüllen muss, um als solches zu gelten. Dazu zählt vor allem die Resistenz gegen Säuren, Gallenflüssigkeit und Enzyme des Darmtraktes. Ohne diese Resistenz könnte während der Darmpassage die biologische Aktivität und Adhäsionsfähigkeit des Probiotikums nicht aufrechterhalten werden. Ein weiterer Punkt ist die Anwendungssicherheit, worunter eine Vermeidung der Schädigung des Darmepithels und eine eindeutige Identifizierung des probiotischen Stammes zu

verstehen sind. Zusätzliche, nicht essentielle Eigenschaften können das Probiotikum für einen speziellen Einsatz besonders auszeichnen. Darunter fallen laut DUNNE et al. (1999) die Produktion antimikrobieller Substanzen sowie die Beeinflussung metabolischer Aktivitäten und des Immunsystems.

Der Begriff „Probiotikum“ steht heute für das fertige Produkt, wobei es sich bei den enthaltenen Mikroorganismen, die lebend oder lebensfähig sein müssen, um Bakterien oder Hefen handeln kann (HOLST u. BREVES 2005). Zur Herstellung von Probiotika für den Einsatz bei Mensch und Tier werden oft Stämme der Genera *Aspergillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Saccharomyces* und *Streptococcus* verwendet (SIMMERING u. BLAUT 2001). Eine große Rolle spielen hier Laktatproduzierende Laktobazillen und Bifidobakterien (FULLER 1989; SAUTER et al. 2006). Wenn sich nach der Geburt die Darmflora entwickelt, nehmen Laktobazillenpopulationen zu, während die Populationen anderer Mikroorganismen abnehmen (SMITH 1965). Darin ist der häufige Einsatz von Laktobazillen begründet. Ihre positiven Effekte werden seit Jahrzehnten diskutiert. Laktobazillen und Bifidobakterien sind resistent gegen Magensäure, Gallensalze und Pankreas-Enzyme, können sich an die intestinale Mucosa anheften und den Gastrointestinaltrakt besiedeln (ROLFE 2000). Sie gehören zur normalen Mikroflora. Mehrere Stämme produzieren neben Laktat auch andere antimikrobielle Substanzen wie Hydrogenperoxide und Bakteriocine (ALVAREZ-OLMOS u. OBERHELMAN 2001). Laktobazillen konnten nachweislich die Ansiedlung von Salmonellen im Kropf von Hühnern vermindern (FULLER 1977), nicht jedoch in den Blinddärmen (ADLER u. DAMASSA 1980; WATKINS u. MILLER 1983).

Ein probiotisches Präparat kann einen oder mehrere Stämme von Mikroorganismen enthalten (FULLER 1989). Während einige Autoren keinen positiven Einfluss von Probiotika auf die Darmflora und die Futtermittelverwertung (NETHERWOOD et al. 1999; PALLIYAGURU et al. 2004) oder die Verhinderung einer klinischen Infektion mit Salmonellen (PRIYANKARAGE et al. 2004) feststellen konnten, beobachtete die Mehrzahl jedoch eine protektive Wirkung der eingesetzten Probiotika. Die potenzielle

Wirkung dieser Stämme beinhaltet die Stimulierung des Immunsystems (ISOLAURI et al. 1995; HOLZAPFEL et al. 1998; KASPER 1998; OUWEHAND et al. 1999; ROLFE 2000; YOUNG u. HUFFMAN 2003; OTTE u. PODOLSKY 2004), die Produktion antibakterieller Substanzen (CUMMINGS 1981; OUWEHAND et al. 1999; EHRMANN et al. 2002), die Konkurrenz um Rezeptoren und Nährstoffe (GUPTA et al. 2000; ROLFE 2000; YOUNG u. HUFFMAN 2003), die Verminderung der Entstehung von Tumoren (MATSUZAKI et al. 1998; BRADY et al. 2000; ROLFE 2000), die Regulation intestinaler Enzymaktivitäten (GOLDIN et al. 1992; LING et al. 1994; PEDROSA et al. 1995; SPANHAAK et al. 1998) und die Synthese von Vitaminen (HOLZAPFEL et al. 1998). Die genauen Mechanismen sind allerdings nicht hinreichend bekannt, es wird jedoch angenommen, dass die direkte Konkurrenz um intestinale Bindungsstellen bzw. das Blockieren derselben für Salmonellen der wahrscheinlich wichtigste Mechanismus der Wirkung dieser Präparate darstellt (METHNER 2000). Laut SOERJADI et al. (1982) bildet die verabreichte Mikroflora eine mechanische Schutzschicht, die den Kontakt der Salmonellen mit der Darmwand unterbindet.

Ein häufiges Problem im Einsatz probiotischer Futterzusatzstoffe ist die oft nur transiente Kolonisation der Probiotika im Darm des Wirtes (JOHANNSON et al. 1993; LINK-AMSTER et al. 1994; SPANHAAK et al. 1998). In neueren Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass auch nach Absetzen des Probiotikums einige Stämme noch mehrere Wochen im Darm des Wirtes persistieren können. BARTH et al. (2009) wiesen noch 38 Tage nach Beendigung der Verabreichung des Probiotikums Mutaflor® (EcN) an Ferkel den Stamm in den Faeces der Tiere nach. Post mortem konnten in Jejunum, Ileum, Caecum und Colon der meisten Ferkel EcN nachgewiesen werden. In einer Studie von VAHJEN et al. (2007) besiedelten die Probiotika *Ent. Faecium* NCIMB10415 und *Bacillus cereus* var. *toyoi* CNCM I-1012 den Darm konventioneller Ferkel 56 Tage lang.

Der Einsatz von Probiotika kann sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch sein. Während beim Nutztier oft leistungssteigernde Effekte (Verbesserung der

Futterverwertung oder der Gewichtszunahme) im Vordergrund stehen, geht es beim Menschen und Kleintier eher um eine Verbesserung der Gesundheit.

Nach Meinung der Befürworter des Probiotikaeinsatzes könnten diese Präparate die jahrelang eingesetzten Antibiotika ablösen. Diese wurden auch wegen ihrer wachstumsfördernden Wirkung appliziert. Aufgrund des vermehrten Auftretens multipler Resistenzen (WRAY u. DAVIES 2000) und unerwünschter Antibiotika-Rückstände in tierischen Produkten (JIN et al. 1997) wurde 2006 der Einsatz von Antibiotika als Wachstumsförderer verboten (VO\_1831/2003).

Hintergrund der durchgeführten Untersuchungen sind Studien des Physiologischen Institutes der Tierärztlichen Hochschule Hannover, die Interaktionen zwischen Probiotika und der Darmmukosa von Schweinen aufzeigten. In einer Studie von SCHRÖDER et al. (2004) wurden die Effekte von *Saccharomyces boulardii* auf den Natrium- und Chlorid-Transport im Schweine-Jejunum unter basalen und stimulierten (sekretorischen) Bedingungen untersucht. Dazu wurde die konventionelle Ussing-Kammer-Methode verwendet, um elektrische Parameter (Kurzschlussstrom  $I_{sc}$ , Gewebeleitfähigkeit  $G_t$ ) und den Elektrolyttransport des isolierten intakten Jejunumepithels in Ab- und Anwesenheit von Theophyllin zu bestimmen. *Saccharomyces boulardii* zeigte spezifische zeitabhängige Effekte auf den sekretorischen Response der Schweine-Jejunum-Mukosa, die sich während der acht-tägigen Behandlung entwickelten, aber unter weiterer Applikation verschwanden. Die Induktion der Sekretion durch Theophyllin erzielte nennenswerte Anstiege des basalen  $J_{ms}$  von  $Na^+$  während der acht-tägigen Behandlung, wohingegen die Fluxraten in die andere Richtung gleich blieben. Theophyllin hemmt den Abbau von cAMP und cGMP. Oral verabreichter *Saccharomyces boulardii* beeinflusst relevante Funktionen der Mucosa des Schweine-Jejunums wie die Verminderung des sekretorischen Responses auf Theophyllin oder die Stimulation des Natrium-Glucose-Kotransportes. Diese Studie unterstützt das Konzept, dass Probiotika positive Effekte auf den Gastrointestinaltrakt haben. Zudem etablierten SCHRÖDER et al. (2006) ein Schweinemodell, in dem eine Vorbehandlung mit dem probiotischen Stamm *E. coli strain Nissle 1917* (EcN) im Hinblick auf eine



Verhinderung der akuten sekretorischen Diarrhoe bewertet wurde. In diesem Modell wurden  $10^{10}$  KbE des porcinen enterotoxischen *E. coli* Abbotstown (EcA) oral an Absatzferkel (d 21 post natum) verabreicht. 48 Stunden nach der Infektion wurden elektrophysiologische Parameter des isolierten intakten jejunalen Epithels in der Ussing-Kammer charakterisiert. In Einklang mit den klinischen Zeichen der Diarrhoe zeigten die Gewebe der infizierten Tiere einen Overshoot des sekretorischen Response nach Stimulation des cAMP-vermittelten second-messenger-Weges durch Forskolin, was eine höhere Erregbarkeit des Chlorid-Sekretions-Systems unter Infektionsbedingungen zeigte. Eine EcN-Vorbehandlung verhinderte vollständig das Auftreten von klinischen Symptomen sekretorischer Diarrhoe bei behandelten und infizierten Tieren. Zudem zeigten die Epithelien im Jejunum dieser Tiere keinen Overshoot des sekretorischen Response nach Stimulation mit Forskolin. Diese Studien zeigten zum ersten Mal die Effizienz von prophylaktischer EcN-Behandlung gegen den Effekt enterotoxischer EcA. Diese und andere Studien (WINCKLER et al. 1998; BREVES et al. 2000) konnten zeigen, dass elektrophysiologische Gewebeeigenschaften wie der Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) oder die Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$ ) durch die eingesetzten Probiotika (*Saccharomyces boulardii* und *Bacillus cereus* var. *toyoï*) unbeeinflusst blieben, wohingegen der sekretorische Response nach Theophyllin-Zugabe nach *Saccharomyces boulardii*-Gabe signifikant reduziert war. Auch die parazelluläre Permeabilität war reduziert, repräsentiert durch niedrigere unidirektionale Mannit-Fluxraten.

### 1.5 Ziel dieser Studie

Ziel dieser Studie war die Etablierung eines Versuchsmodells zum Nachweis der Wirkung probiotischer Futterzusätze gegen eine experimentelle Infektion mit *Salmonella enterica* bei Broilern.

Dazu wurde erstmals ein Ansatz gewählt, bei dem alle im Tierversuch eingesetzten Probiotika zuvor *in vitro* auf ihre Hemmwirkung getestet wurden. So konnten in einem aufwendigen Screening-Verfahren die Stämme ausgewählt werden, die die stärkste Hemmwirkung gegen Salmonellen zeigten. Zudem wurden auch die

Verarbeitungseigenschaften (pH-Stabilität, Temperaturempfindlichkeit u.a.) der probiotischen Stämme beachtet. Die auf diesem Wege vorselektierten probiotischen Stämme konnten folgend hinsichtlich ihres Einflusses auf die Integrität und Funktionalität des Darms bei mit *Salmonella enterica* infizierten Broilern geprüft werden.

Methodisch wurde zum einen der Einfluss der Probiotika auf bakteriologische Parameter untersucht. So sollte durch qualitative und quantitative bakteriologische Untersuchungen eine eventuelle Reduktion des Auftretens der Salmonellen bei den Broilern festgestellt werden.

Der andere wesentliche Teil dieser Studie beschäftigt sich mit elektro- und transportphysiologischen Untersuchungen. Neben der Gewebeleitfähigkeit und dem Kurzschlussstrom bzw. dem Anstieg desselben nach Zugabe von Forskolin (= sekretorischer Response) wurden unidirektionale Mannit-Fluxraten ermittelt.

Die Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  [ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] zeigt in ihrem Verlauf während der Versuchsphase den Widerstand des Gewebes auf und weist so auf die Integrität desselben hin.

Der sekretorische Response gibt in seiner Ausprägung Hinweise auf die Stärke der Aktivierung des Chlorid-Sekretions-Systems, das maßgeblich an der Entstehung von Durchfallerkrankungen beteiligt ist.

Unidirektionale Fluxraten wurden mittels  $^3\text{H}$ -markiertem Mannit ermittelt, das aufgrund seiner Molekülgröße parazellulär transportiert wird. Die so gewonnenen Werte geben wertvolle Hinweise auf eine Beteiligung des parazellulären Transportweges bei Salmonelleninfektionen und eventuelle Änderungen nach Fütterung von probiotischen Futterzusatzstoffen.

Die Kombination dieser Methoden trug zur Entwicklung eines geeigneten Modells zur Untersuchung des Einflusses probiotischer Futterzusatzstoffe auf Infektionen mit *Salmonella enterica* bei.

Diese Arbeit basiert auf der Hypothese, dass Salmonelleninfektionen, auch wenn sie keine Krankheitsanzeichen auslösen, die oben genannten Parameter verändern und so den Organismus beeinflussen. Der Einsatz von Probiotika soll die Küken vor einer Infektion mit Salmonellen schützen, indem die natürliche Darmbarriere gestärkt wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsaufbau

#### 2.1.1 Gruppeneinteilung

Zur Etablierung der Methoden und des Versuchsablaufes wurden die ersten beiden der insgesamt fünf Versuchsreihen ohne den Einsatz probiotischer Futterzusätze durchgeführt. Die Küken wurden am Einstelltag willkürlich in die Gruppen aufgeteilt. In der ersten Versuchsreihe wurde ein Drittel der Tiere mit *Salmonella Enteritidis* infiziert, ein Drittel zusätzlich mit der TAD *Salmonella vac E*-Vakzine geimpft und ein Drittel diente als Kontrolle. Der eingesetzte Impfstoff wird bereits in der Praxis erfolgreich verwendet und so war der Einsatz dieser drei Gruppen zur Etablierung gut geeignet. In der zweiten Versuchsreihe wurde Buttersäure-Glycerid einer der drei Gruppen über das Futter verabreicht, die zusätzlich mit *Salmonella Enteritidis* infiziert wurde. Eine weitere Gruppe wurde lediglich infiziert und Gruppe drei diente als Kontrolle. Sie erhielt weder den Infektions- noch den Impfstamm.

**Tab. 1 Gruppeneinteilung**

VR	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
1	Infektion	Impfung + Infektion	Kontrolle	
2	Buttersäure-Glycerid + Infektion	Infektion	Kontrolle	
3	Kontrolle	Infektion	P1 + Infektion	P2 + Infektion
4	P3 + Infektion	P4 + Infektion	Infektion	
5	P3 + Infektion	P5 + Infektion	Infektion	

P1-P5: Probiotikum 1-5

In der dritten Versuchsreihe wurden erstmals Probiotika eingesetzt (P1 in Gruppe 3 und P2 in Gruppe 4). Die jeweiligen Gruppen wurden zusätzlich mit *Salmonella*

*Enteritidis* infiziert. Gruppe 2 wurde lediglich infiziert, Gruppe 1 diente als Kontrolle. In dieser Versuchsreihe wurden vier verschiedene Gruppen eingesetzt, da Ergebnisse innerhalb einer Versuchsreihe sich besser vergleichen lassen als zwischen einzelnen Versuchsreihen.

Da die Kontrollgruppen in den ersten drei Versuchsreihen konstante Ergebnisse erzielten, wurden in den letzten beiden Versuchsreihen keine Kontrollgruppen eingesetzt. So konnte die Tierzahl erhöht werden und gleichzeitig war es möglich, zwei Probiotika in derselben Versuchsreihe zu untersuchen.

In der dritten Versuchsreihe wurden die Probiotika P3 und P4 sowie eine Infektions-Gruppe untersucht, nachdem alle Tiere mit *Salmonella Enteritidis* infiziert worden waren. Das Probiotikum P3 wurde auch in der fünften Versuchsreihe getestet, allerdings wurden die Tiere dieser Versuchsreihe mit *Salmonella Infantis*, und nicht wie in den anderen Versuchsreihen mit *Salmonella Enteritidis*, infiziert.

Bei allen in den Versuchsreihen 3-5 eingesetzten Probiotika handelt es sich um Laktobazillen bzw. bei P5 um *Bacillus cereus var. toyoi*.

Die Probiotika wurden in Konzentrationen zwischen 0,1 und 2,0 g pro kg Futter verabreicht (siehe Tabelle 2). Bei dem in der zweiten Versuchsreihe eingesetzten Buttersäure-Glycerid handelt es sich um ein Gemisch aus Mono-, Di- und Triglyceriden (65% Buttersäure, 35% Silica). Die Probiotika wurden in unterschiedlichen Konzentrationen im Futter eingesetzt, um die Dosisabhängigkeit einer möglichen „protektiven“ Wirkung des probiotischen Stammes zu prüfen.

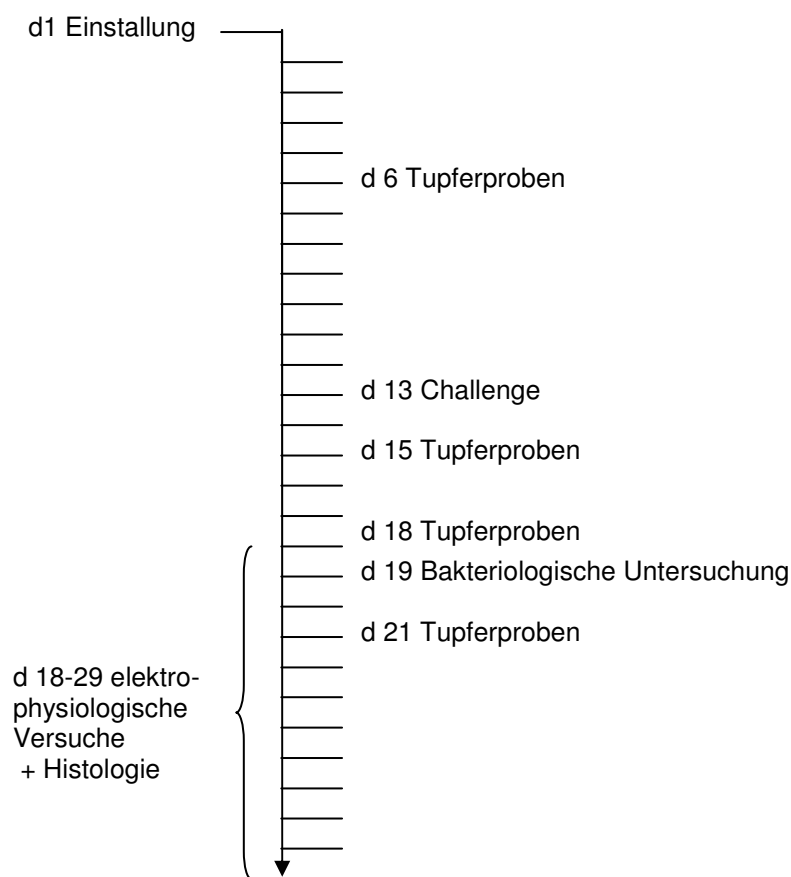
**Tab. 2 Verwendete Futterzusätze**

<b>VR</b>	<b>Probiotikum</b>	<b>Stamm</b>	<b>Konzentration im Futter [g·kg<sup>-1</sup>]</b>
1	-	-	-
2		Buttersäure-Glycerid	1,5
3	<b>P1</b>	Lactobacillus delbrueckii spp. indicus	2,0
	<b>P2</b>	Lactobacillus delbrueckii spp. indicus	0,5
4	<b>P3</b>	Lactobacillus delbrueckii spp. indicus	0,5
	<b>P4</b>	Lactobacillus sp.	0,5
5	<b>P3</b>	Lactobacillus delbrueckii spp. indicus	0,5
	<b>P5</b>	Bacillus cereus var. toyoi	0,1

VR = Versuchsreihe

### 2.1.2 Versuchsablauf

Die Dauer der Versuchsreihen betrug jeweils 29 Tage, wobei die Küken am 1. Lebenstag willkürlich in die Gruppen eingeteilt und eingestallt wurden.



**Abb. 1: Versuchsablauf**  
d=Tag

Am ersten Lebenstag wurde eine Sammelkotprobe entnommen (siehe Kapitel 2.4.1.1).

Bis auf die Kontrollgruppen wurden alle Gruppen am 13. Lebenstag mit Salmonellen infiziert (= Challenge) (siehe Kapitel 2.3).

Kloakale Tupferproben wurden vor und zwei, fünf und acht Tage nach der Infektion von je 10 Tieren pro Gruppe entnommen (siehe Kapitel 2.4.1.2).

Am 19. Lebenstag fand eine quantitative bakteriologische Untersuchung von je 15 Tieren pro Gruppe statt (siehe Kapitel 2.4.2).

Für die Histologie und zum Einspannen in die Ussingkammern wurden an den Lebenstagen 18, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28 und 29 Proben von je einem Tier pro Gruppe entnommen (siehe Kapitel 2.5 und 2.6).

Von jedem Tier wurde bei Einstellung und vor dem Töten das Gewicht ermittelt. In der ersten, zweiten und vierten Versuchsreihe wurden die Futterzusätze ab dem ersten Lebenstag gefüttert, in der dritten und fünften Versuchsreihe ab dem 7. Lebenstag.

## **2.2 Versuchstiere**

### **2.2.1 Herkunft, Haltung und Fütterung**

Die Ross-Mastküken aller Versuchsreihen stammten aus der BWE-Brütereierie Weser-Ems und wurden am ersten Lebenstag eingestallt. Sie stammten von geimpften Elterntieren, die gemäß EG (VO\_2160/2003) und EG (VO\_1003/2005) auf Salmonellen überwacht wurden. Zum Schlupfzeitpunkt waren die Ergebnisse der Eigenkontrollen der Brütereierie und der amtlichen Untersuchungen negativ.

Die Tiere wurden auf perforierten Gummimatten mit einer Besatzdichte von durchschnittlich  $12 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  gehalten. Sie erhielten Futter und Wasser ad libitum.

Die Küken wurden in Gruppen von 25–35 Tieren gehalten. Eine Einzelhaltung wurde aus Platz- und tierschutzrechtlichen Gründen nicht gewählt. Die Besatzdichte betrug bei einer Stallgröße von  $0,85\text{--}1,7 \text{ m}^2$  zu keiner Zeit mehr als  $15 \text{ kg}$  Lebendmasse pro  $\text{m}^2$ .

Bei konventionell gehaltenen Broilern handelt es sich sowohl um männliche als auch um weibliche Tiere. Daher wurden in diesen Versuchsreihen die Tiere vor der Einstellung nicht nach Geschlecht getrennt, sondern willkürlich in die Gruppen eingeteilt, um der Praxis der Mastgeflügelhaltung so nahe wie möglich zu kommen.

Der Tierversuch wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt.



Die Zusammensetzung des Grundfutters ist in Tabelle 3 aufgeführt. Sie war in allen Versuchsreihen gleich.

**Tab. 3 Futterrezeptur [g/kg]**

Mais	382
Weizen	220
Sojaex	220
Hamlet Protein (Sojakonz.)	80
Sojaöl	60
Futterkalk ks.	5
Futterkalk ps.	18
Viehsalz	1
Lysin HCl	0,7
DL-Methionin	2,8
L-Threonin	0,5
Vormischung	10

### **2.2.2 Temperatur- und Lichtregime**

Die Tiere wurden bei einer Lichtperiode von 14 Stunden und einer Dunkelphase von zehn Stunden gehalten. Die Temperatur wurde von anfänglichen 34 °C schrittweise alle zwei Tage um circa 1 °C erniedrigt und in den letzten Tagen bei 21 °C gehalten.

### **2.2.3 Kennzeichnung**

Am ersten Lebenstag wurden alle Küken mit nummerierten Flügelmarken (Brutmaschinen Janeschitz GmbH, Hammelbrug) gekennzeichnet, die in die Flügelspannhaut des linken Flügels eingezogen wurden.

### **2.2.4 Töten der Tiere**

Die Broiler wurden nach Betäubung durch Blutentzug getötet.

## 2.3 Infektion

### 2.3.1 Herstellung der Challenge-Kultur

Zur Herstellung der Vorkultur wurden 2 BPLS-Platten (BPLS-Agar (mod.) + NA-Säure (100mg/l), Firma Oxoid, Wesel) mit dem Salmonella-Stamm SE 285/93 (Versuchsreihen 1-4), bzw. SI 5295/04 (Versuchsreihe 5) beimpft und bei 37°C 24 Stunden bebrütet.

Danach wurden von einer der Platten 5-6 Kolonien in 2 Reagenzgläser mit je 10ml Tryptosephosphat-Puffer überführt und 6 Stunden bei 37°C zur Herstellung der Hauptkultur bebrütet.

Der Inhalt jedes Reagenzglases wurde daraufhin in einen Kolben mit 100 ml Tryptosephosphat-Puffer gegeben und auf einem Horizontalschüttler bei 60 rpm und 37°C 24 Stunden bebrütet.

Für die nachfolgende Keimzahlbestimmung wurde eine dekadische Verdünnungsreihe bis  $10^{-9}$  aus einem Kolben der Hauptkultur angefertigt. Um die Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  zu erhalten, wurden von der Hauptkultur 1ml entnommen und zu 9ml PBS (*phosphate buffered saline*) gegeben und mittels eines Reagenzglasschüttlers (Vortex Genie 2, Scientific Industries) gemischt. Dementsprechend wurden auch die weiteren Verdünnungsstufen hergestellt. Die Verdünnungsstufen  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  wurden daraufhin ausgespatelt und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Zur Berechnung des gewogenen arithmetischen Mittelwertes wurde die Formel nach PICHARDT (1998) angewandt:

$$\bar{X}_{\text{gew}} = \frac{\sum x}{n_1 w_1 + n_2 w_2 + \dots} \cdot d$$

$\bar{X}_{\text{gew}}$ : gewogenes arithmetisches Mittel

Summe x: Summe aller KbE aller Platten

n1: Plattenanzahl der niedrigsten Konzentration

n2: Plattenanzahl der nächsthöheren Konzentration

w1: Gewicht der niedrigsten Verdünnung

w2: Gewicht der nächsthöheren Verdünnung

d: Faktor der niedrigsten Verdünnung

Je nach Konzentration erhielten die Tiere je  $10^9$  KbE in 1-2 ml Suspension.

Mit dem in der fünften Versuchsreihe eingesetzten *Salmonella Infantis*-Stamm (SI 5295/04) wurde in gleicher Weise verfahren.

### 2.3.2 Verabreichung der Challenge-Kultur

Die zu infizierenden Tiere erhielten die Challenge-Kultur über eine gebogene Knopfkanüle mit aufgesetzter steriler 1ml-Spritze direkt in den Kropf.

In den Kontrollgruppen erhielt jedes Tier 1ml des unbeimpften Kulturmediums (Tryptosephosphat-Puffer).

### 2.3.3 Impfung

Die Tiere der Impfgruppe wurden am ersten Lebenstag mit der TAD Salmonella vac E- Vakzine geimpft. Sie erhielten eine Impfdosis von  $10^8$  KbE mittels Kropfinstillation.

## **2.4 Bakteriologische Untersuchung**

### **2.4.1 Qualitative bakteriologische Untersuchungen**

#### 2.4.1.1 Sammelkotprobe

Jeweils am 1. Lebenstag wurde in jeder Versuchsreihe beim Einstellen eine Sammelkotprobe aus den Kisten der Brüterei entnommen. Das Material wurde in Tetrathionat-Lösung (Oxoid, Wesel) 24 Stunden bei 37°C bebrütet und folgend auf BPLS-Nährböden (BPLS-Agar (mod.) + NA-Säure (100mg·l<sup>-1</sup>), Firma Oxoid, Wesel) ausgestrichen, die wiederum 24 Stunden bei 37°C bebrütet wurden. So konnte eine qualitative Auswertung erfolgen, die mittels Agglutinationstest mit O9-Antiserum (Sifin Enteroclon Anti-Salmonella O9, SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin) abgesichert wurde.

#### 2.4.1.2 Tupferproben

Die kloakalen Tupferproben wurden von zehn willkürlich ausgewählten Tieren je Gruppe an vier verschiedenen Zeitpunkten genommen. Die erste Probennahme fand sechs Tage vor der Infektion, die weiteren drei Probennahmen am zweiten, fünften und achten Tag nach der Infektion statt (siehe Abbildung 1).

Die Tupfer wurden direkt in Tetrathionat-Lösung (Oxoid, Wesel) 24 Stunden bei 37°C bebrütet und folgend auf BPLS-Agar (BPLS-Agar (mod.) + NA-Säure (100mg/l), Oxoid, Wesel) weitere 24 Stunden bei der gleichen Temperatur inkubiert.

Zur Absicherung der qualitativen Ergebnisse fand ein Agglutinationstest mit O9-Antiserum (Sifin Enteroclon Anti-Salmonella O9, SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin) statt.

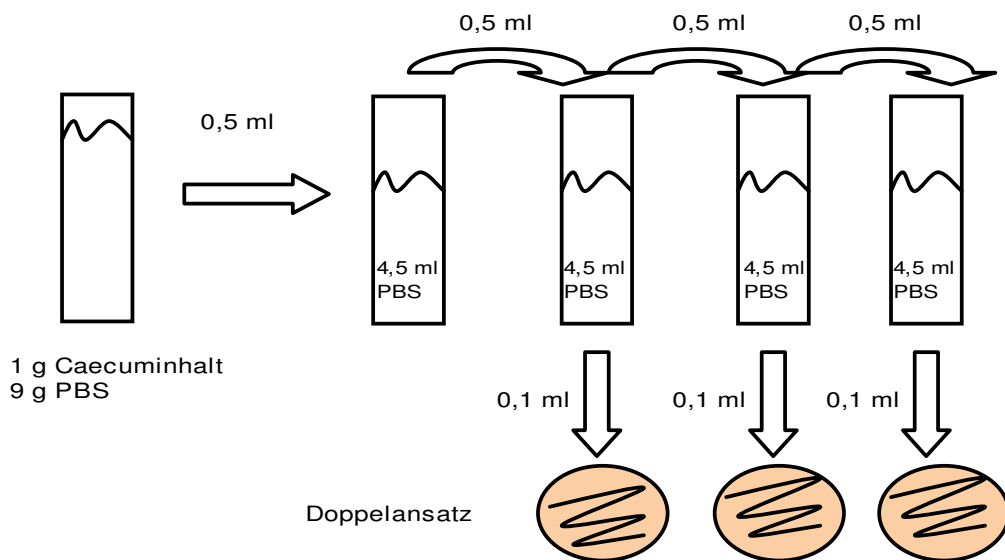
### **2.4.2 Quantitative bakteriologische Untersuchung**

Zum Zweck einer quantitativen bakteriologischen Untersuchung wurden am sechsten Tag nach der Infektion Lebern und Caeca von 7 - 15 Tieren pro Gruppe entnommen.

In den Versuchsreihen 4 und 5 konnten aufgrund der höheren Tierzahl pro Gruppe 15 Tiere zur quantitativen bakteriologischen Untersuchung herangezogen werden, in den Versuchsreihen 1-3 wurden 7-10 Tiere pro Gruppe untersucht.

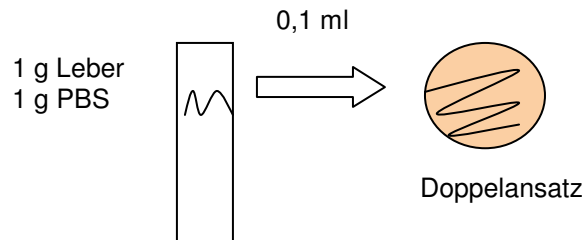
Nach der Organentnahme wurden 1g Lebergewebe und eine ebenso große Caecuminhaltprobe genommen. Hierzu wurde die Blinddarmingesta in ein steriles 12ml-PS-Röhrchen (greiner bio-one, Frickenhausen) eingewogen und 1:10 mit PBS (*phosphate buffered saline*, OMNICHEM, Bremen) verdünnt.

Diese Probe des Caecuminhaltes wurde nach gründlichem Durchmischen (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) weitere vier Male 1:10 verdünnt und durch das Aufbringen von je 0,1 ml auf zwei BPLS-Platten (BPLS-Agar (mod.) + NA-Säure ( $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), Oxoid, Wesel) entstanden die Verdünnungsstufen  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$ . Diese wurden bei  $37^\circ\text{C}$  24 Stunden bebrütet.



**Abb. 2 Bakteriologische Untersuchung Caecuminhalt**  
Schematische Darstellung des Untersuchungsganges

Je 0,1 ml der 1:2 mit PBS verdünnten und im Ultra-Turrax (IKA® - Werke GmbH & Co.KG, Staufen) homogenisierten Leberprobe wurden auf zwei BPLS-Platten ausgestrichen und bei 37 °C 24 Stunden bebrütet.



**Abb. 3 Bakteriologische Untersuchung Leber**  
Schematische Darstellung des Untersuchungsganges

Folgend konnte aus den gezählten Kolonien auf den Nährböden die Zahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) pro ml errechnet werden. Auch hier wurde wie bei der Herstellung der Challenge-Kultur die Formel zur Berechnung des gewogenen arithmetischen Mittelwertes nach PICHARDT (1998) angewandt.

## 2.5 Epithel-physiologische Untersuchungen

### 2.5.1 Aufbau der Ussing-Kammer

Die Versuche in der Ussing-Kammer wurden in Anlehnung an das von Hans Ussing (1949) entwickelte Prinzip durchgeführt. Dabei wurden die 12 einzelnen Kammern über Agarbrücken und Ag/AgCl-Bezugselektroden (Mettler Toledo Prozessanalytik GmbH, Gießen) mit zwei mikrocomputergesteuerten Voltage/Current Clamps (Wissenschaftliche Geräte, Dipl.-Ing. Mußler, Aachen; [www.Kmsci.de](http://www.Kmsci.de)) verbunden (siehe Abb. 4).

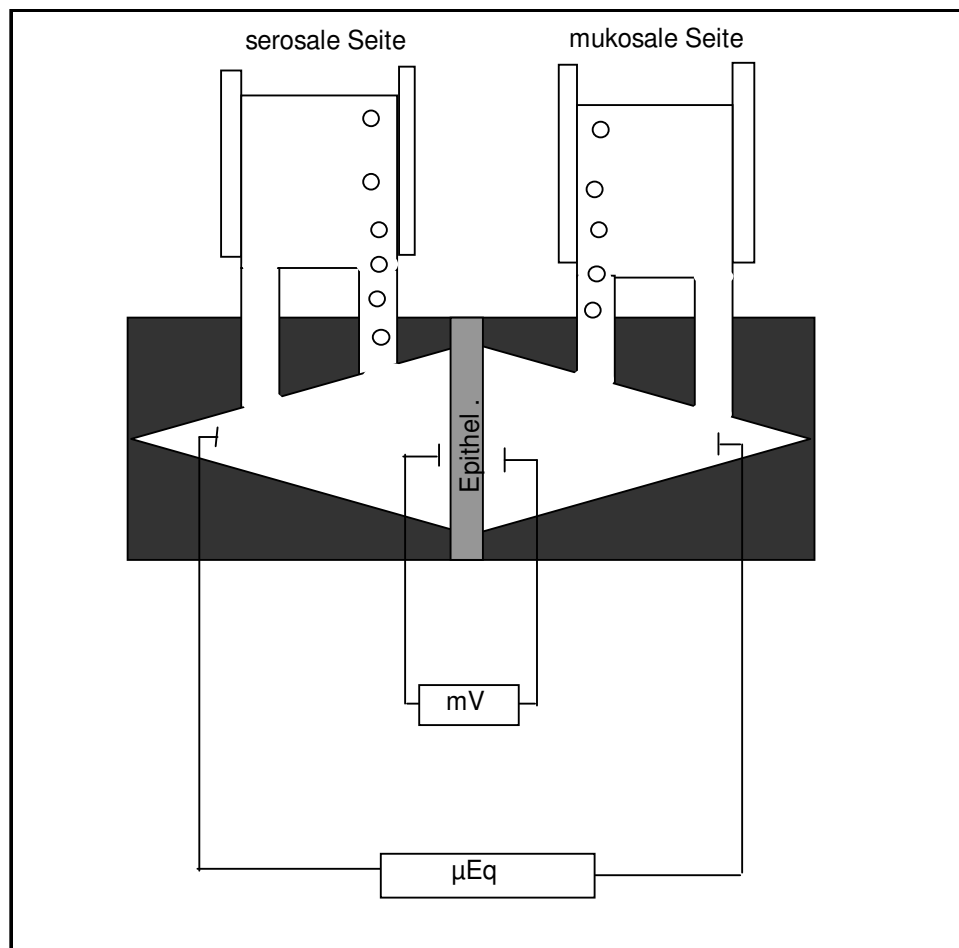


Abb. 4 Schematischer Aufbau der Versuchsapparatur

Die Agarbrücken zur Registrierung der Potentialdifferenz wurden hergestellt, indem Agar in einer Krebs-Henseleit-Lösung (Tab. 3) ohne Zusatz von Glucose und Mannit (Osmolarität: 270 mosm/l) aufgekocht und mit einer Spritze mit stumpfer Kanüle in Kunststoffschläuche gefüllt wurde.

**Tab. 4 Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung für die Agarbrücken**

NaCl	6,638 g
KCl	0,403 g
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,176 g
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,244 g
HCl (1 mol/l)	0,2 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0,083 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,427 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,764 g
Aqua dest.	ad 1000 ml



### 2.5.2 Pufferlösungen

Die Zusammensetzung der Pufferlösungen ist in Tabelle 5 dargestellt. Die serosale unterscheidet sich von der mukosalen Pufferlösung insofern als sie zusätzlich 10 mmol/l Glucose (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) und 6 mmol/l Na-gluconat (Fa. Merck KGaA, Darmstadt), dafür aber nur 7 mmol/l Hepes (Fa. Serva GmbH, Heidelberg) (im Gegensatz zu 20 mmol/l mukosal) und kein NaOH enthält.

Den Pufferlösungen wurde  $10^{-5}$  mol/l Indomethacin zugesetzt, um die endogene Prostaglandinsynthese zu hemmen und die spontane Chloridsekretion zu minimieren.

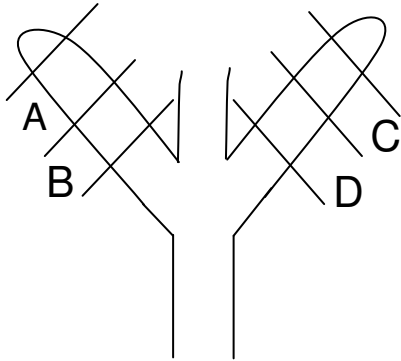
**Tab. 5 Pufferzusammensetzung Ussing-Kammer-Versuche**

	<b>mukosal</b> [mmol/l]	<b>serosal</b> [mmol/l]
NaCl	113,6	113,6
KCl	5,4	5,4
1n HCl	0,2	0,2
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,2	1,2
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,2	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	21,0	21,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,5	1,5
Glucose (wasserfrei)	-	10,0
Mannit	2,0	2,0
Hepes	20,0	7,0
Na-gluconat	-	6,0
1n NaOH	6,0	-

(Fa. Merck KGaA, Darmstadt)

### 2.5.3 Gewinnung der Proben

Unmittelbar nach dem Töten der Tiere durch Blutentzug wurden die Caeca entnommen und in eisgekühlter, zuvor mit Carbogen begaster serosaler Pufferlösung bis zum Einspannen kurze Zeit aufbewahrt.



**Abb. 5 Einteilung der Blinddarmabschnitte**

A: Kammer 1, B: Kammer 2, C: Kammer 3, D: Kammer 4

Pro Tier wurden 4 Caecumabschnitte eingespannt (Kammer 1-4, bzw. 5-8 und 9-12).

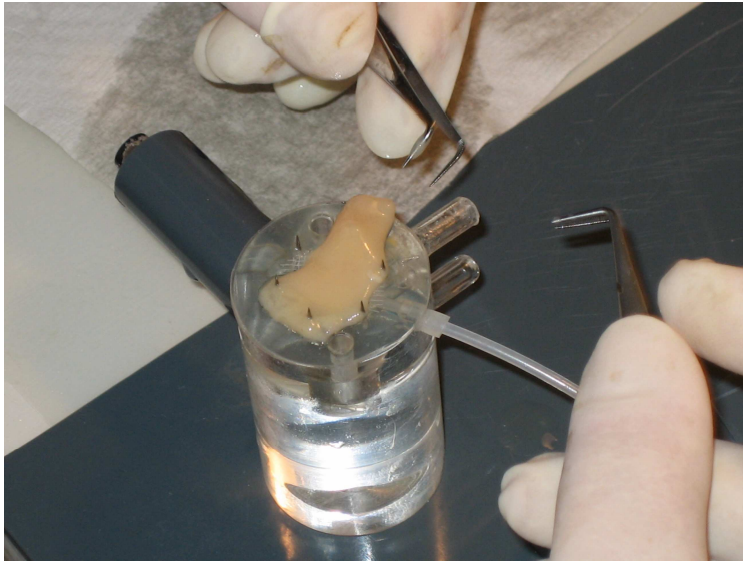
Um während des gesamten Vorgangs und während des Einspannens eine einwandfreie Zuordnung der Darmabschnitte zu gewährleisten, waren sowohl alle Gefäße als auch die verwendeten Klemmen mit beschriftetem Klebeband gekennzeichnet.

Aus dem restlichen Probenmaterial wurden die Proben für die histologischen Untersuchungen entnommen (siehe Kapitel 2.6).

### 2.5.4 Präparation und Einspannen der Darmabschnitte

Für die Messungen wurden ungefähr 2 cm lange Darmsegmente aus den Caeca der Hühner mesenterial aufgeschnitten und unter ständiger Befeuchtung mit serosalem Inkubationspuffer eingespannt, indem zwischen die beiden Hälften der aus Plexiglas gefertigten Kammern die präparierten Darmepithelien eingesetzt wurden. So bildete die linke Hälfte die serosale Seite (Blutseite), die rechte Hälfte die mukosale Seite (Darmlumenseite). Es wurden Kammern mit einer offenen Fläche von 1,13 cm<sup>2</sup>

verwendet. Die Kammern wurden mit je 2 Silikon-Dichtringen versehen, die zusätzlich zur Vermeidung von Randdruckstellen dienen.



**Abb. 6 Aufspannen des Darmgewebes**  
auf die serosale Hälfte der Ussing-Kammer

In den in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen wurde Caecumgewebe von Hühnern in die Ussing-Kammern eingespannt. Im Allgemeinen wird Darmwandgewebe vor dem Einspannen „gestrippt“. Darunter versteht man das Ablösen der Tunica mucosa (=Mucosa) von den übrigen Gewebeschichten. Dies geschieht, indem das Darmstück mit der Tunica serosa nach unten auf ein mit eisgekühltem serosalem Puffer befeuchtetes PVC-Brett gelegt wird und die Tunica mucosa mit Hilfe eines 0,2 mm starken, etwa 5 cm breiten Blechs eingeritzt und von der Tela submucosa abgeschoben wird. Nach Sichtkontrolle auf beschädigte Bereiche wird dann die Mucosa eingespannt. In dieser Studie war es nicht möglich, die Mucosa abzutrennen, ohne massive Gewebeschäden zu verursachen. Dadurch wären die Ermittlung der elektrophysiologischen Parameter sowie der Mannit-Fluxraten nicht möglich gewesen. Die Caecumwand der Broiler, die zu diesem Zeitpunkt zwischen zwei und drei Wochen alt waren, war zu dünn und instabil, um „gestrippt“ zu werden und daher wurde die gesamte Darmwand eingespannt. Dies mag durch den größeren Widerstand zu einer etwas geringeren Gewebeleitfähigkeit geführt haben, als sie bei gestripptem Material aufgetreten wäre. Da aber alle Gewebeprobe „ungestrippt“ eingespannt wurden, sind eventuell auftretende

Unterschiede nicht auf diese Abweichung in der konventionellen Methode zurückzuführen. An Mageneithelien von Ratten haben BAJKA et al. (2003) gezeigt, dass das „Strippen“ keinen signifikanten Einfluss auf die Gewebeleitfähigkeit und die Permeabilität des Epithels hat.

Die 12 Kammern waren an ein aus zwei doppelwandigen Glassäulen bestehendes Gasliftsystem angeschlossen. Durch ein 37°C warmes Wasserbad wurde der äußere Kreislauf auf einer konstanten Temperatur gehalten. Im inneren Kreislauf wurden durch eine ständige Carbogen-Begasung (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) die Sauerstoffversorgung des Gewebes sowie ein konstanter pH-Wert und eine gleichmäßige Umwälzung der jeweils 10 ml Inkubationslösung gewährleistet.

Der pH-Wert der Inkubationspuffer stellte sich nach 20minütiger Carbogenbegasung bei 37°C auf pH 7,4 ein. Die Osmolarität lag bei 300 mosmol/l.

### **2.5.5 Eich- und Messperiode**

In der Eichperiode wurden Lösungsmittelwiderstand und Potentialdifferenz ermittelt, ohne dass ein Epithel eingespannt war.

Nach Einspannen des Epithels wurden die Ussing-Kammern mit der voltage clamp-Steuereinheit verbunden. Damit konnten die elektrophysiologischen Gewebeparameter (Elektrische Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  und Kurzschlussstrom  $I_{sc}$ ) kontinuierlich registriert werden.

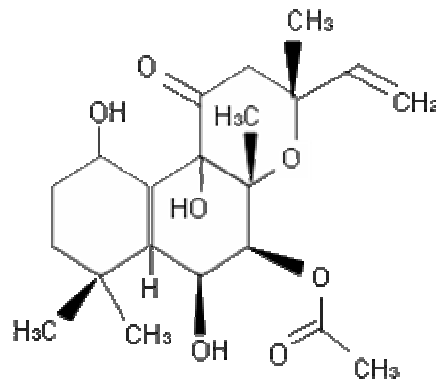
Der Kurzschlussstrom wird in Ionenäquivalent als Ladungstransfer pro Zeit und Gewebefläche [ $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] angegeben. Er gilt als Parameter für den elektrogenen Nettoladungstransport über das Epithel, die Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  [ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] als Parameter für die Ionendurchlässigkeit desselben.

Die Potentialdifferenz  $PD_t$  zwischen der mukosalen und serosalen Gewebeseite wurde über zwei gewebe-nahe KCl-Agar-Gel-Brücken (Polyethylen-Schlauch, Agar 3%ig in mukosalem Inkubationspuffer) im Kammerlumen und über Ag-AgCl-Elektroden gemessen. Zwei weitere Ag-AgCl-Elektroden speisten über gewebefern

angebrachte NaCl-Agar-Brücken im 60-Sekunden-Intervall einen kurzen bipolaren Strompuls von  $100\mu\text{A}$  ein. Mittels Ohm'schem Gesetz konnte aus der gemessenen Potentialdifferenz der Gewebewiderstand ermittelt werden, dessen reziproker Wert der Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  [ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] entspricht.

Der große Durchmesser der Agarbrücken gewährleistete eine gleichmäßige Stromapplikation, durch die die Potentialdifferenz mittels des „Klemmstromes“ ( $I_{sc}$ ) auf  $0\text{mV}$  „geklemmt“ werden konnte. Der elektrische Gradient über dem Epithel, bestehend aus elektrogenen Ionenbewegungen, wurde durch diesen Strom kompensiert. Durch den Fluss eines positiven Ionenstroms von der mukosalen zur serosalen Seite erhält der Kurzschlussstrom ein positives Vorzeichen, was einer Kationenresorption und/oder Anionensekretion entspricht.

Nach 95 Minuten Versuchsdauer wurde serosal in alle Kammern  $10^{-5}$  mol/l Forskolin gelöst in  $2\mu\text{l}$  Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) hinzugegeben. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass DMSO allein zu keinerlei Änderungen des Kurzschlussstroms führt.



**Abb. 7 Strukturformel des Diterpentens Forskolin**

Forskolin stimuliert als Aktivator der Adenylatzyklase (SEAMON et al. 1981) die cAMP-vermittelte Chloridsekretion, wodurch es bei vitalem Gewebe zu einem Anstieg des Kurzschlussstroms kommt (BROWN et al. 1990; HEMPE 2007). Der durch Forskolin verursachte Anstieg des Kurzschlussstroms gibt demnach Hinweise auf die

Stärke der Aktivierung des Chloridionensystems. Die Erfassung dieses Parameters konnte zur Untersuchung des Einflusses von Salmonellen auf transportphysiologische Parameter genutzt werden.

### **2.5.6 Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten**

Als radioaktive Markersubstanz zur Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten über das in die Ussing-Kammern eingepannte Gewebe wurde  $1,85 \times 10^5$  Bq (5 $\mu$ Ci) Tritium-Mannit eingesetzt. Mannit wird unter anderem aufgrund seiner Molekülgröße rein parazellulär transportiert (FAVUS u. ANGEID-BACKMAN 1984).

In die zwölf Kammern wurden „ungestrippte“ Darmwandstücke von drei Tieren eingespannt, wobei jeweils zwei Kammern pro Tier zur Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten von serosal nach mukosal ( $J_{sm}$ ) und zwei Kammern zur Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten von mukosal nach serosal ( $J_{ms}$ ) eingesetzt wurden. In Anlehnung daran erfolgte die Zugabe der Markersubstanz bei den ms-Kammern in die mukosale und bei den sm-Kammern in die serosale Kammerhälfte. Im Abstand von 10 Minuten wurden insgesamt 11 Proben von der jeweils nicht radioaktiv markierten Seite entnommen. Anschließend wurden alle Proben mit 4,5 ml Szintillisationsflüssigkeit (Luma Safe Plus, Canberra Packard GmbH, Dreieich) gemischt. Daraufhin konnten im Flüssigkeitsszintillisationszähler (Tri-Carb 2500, Canberra Packard GmbH, Dreieich) die Zerfälle pro Minute (dpm) gezählt werden. Jede Probe wurde 10 Minuten lang gemessen.

Die Berechnung der unidirektionalen Fluxraten  $J_{ms}$  und  $J_{sm}$  erfolgte in Anlehnung an die Formel von SCHULTZ et al. (1964):

$$J = (dpm_n - \frac{V_s - V_p}{V_s} \times dpm_{n-1}) \times \left( \frac{V_s \times M_i}{dpm_H \times t \times A} \right)$$

$J$  = Fluxrate [ $\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ]

$dpm_n$  = Zerfälle pro Minute in der Probe n [dpm]

$dpm_{n-1}$  = Zerfälle pro Minute in der Probe n-1 [dpm]

$V_s$  = Volumen der Pufferlösung in der Säule [ml]

$V_p$  = Volumen der entnommenen Probenlösung („kalte Seite“) [ml]

$M_i$  = Konzentration des unmarkierten Mannits in der Pufferlösung [mmol/l]

$dpm_H$  = Zerfälle pro Minute extrapoliert auf 0,5 ml Aliquot von der „heißen Seite“ (Mittelwert aus den heißen Proben 1 und 2) [dpm]

$t$  = Zeitintervall zwischen Probe n-1 und Probe n [h]

$A$  = serosale Fläche des transportierenden Epithels [ $\text{cm}^2$ ]

### 2.5.7 Auswertung elektrophysiologischer Parameter

Aus den erhobenen Daten (6-Sekunden-Werte) wurden pro Tier (4 Kammern) arithmetische Mittelwerte errechnet, aus denen arithmetische Gruppenmittelwerte bestimmt werden konnten. Durch das Übereinanderlegen der Kurven konnten für jeden erfassten Messpunkt ein Mittelwert aus allen Kammern bzw. allen Tieren errechnet werden.

Alle Ergebnisse sind folglich, wenn nicht anders vermerkt, als arithmetischer Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben, wobei die Grundgesamtheit n der Zahl der Tiere entspricht.

Als gemeinsame Zeitachse der übereinander gelagerten Kurven wurde die Zeitachse einer zufällig ausgewählten Kammer benutzt.

## **2.6 Histologische Untersuchung**

### **2.6.1 Probenentnahme**

Während der Präparation der Darmabschnitte zum Einspannen in die Ussing-Kammern wurden pro Tier zwei 1 cm lange Caecumabschnitte in Formalin (4 %ig) eingelegt.

### **2.6.2 Präparation der Darmabschnitte**

Die in Formalin fixierten Darmabschnitte wurden in Paraffin eingebettet und zu Blöcken verarbeitet. In jedem Block befanden sich 2 aufrechtstehende, ca 0,4 cm breite Ringe, so dass das Darmgewebe quer geschnitten wurde.

### **2.6.3 Anfertigung der Schnitte**

Mit einem Rotationsmikrotom wurden 2 µm dicke Schnitte des Darmes angefertigt.

### **2.6.4 Entparaffinierung**

Zur Entparaffinierung wurde eine absteigende Alkoholreihe angewendet:

1. 5 min Xylol
2. 5 min Xylol/Ethanol 96% (50:50)
3. 2 min 96%iges Ethanol
4. 2 min 90%iges Ethanol
5. 2 min 80%iges Ethanol
6. 2 min 70%iges Ethanol
7. 2 min 40%iges Ethanol
8. Spülen mit Aqua dest.

Direkt anschließend folgte die Hämalaun-Eosin (HE) Färbung.



### **2.6.5 HE-Färbung**

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte mit der Hämalaun-Eosin-Färbung gefärbt:

1. 4 min Hämalaun
2. 10 min Bläuen in Leitungswasser
3. 30 sec 1%ige Eosinlösung
4. 10 sec 50%iges Ethanol
5. 10 sec 70%iges Ethanol
6. 10 sec 96%iges Ethanol
7. 10 sec 100%iges Ethanol
8. 10 sec 100%iges Isopropanol
9. 10 min 100%iges Xylol
10. 10 min 100%iges Xylol

Nach dem Färben konnten die Schnitte eingedeckt und mikroskopiert werden.

### **2.6.6 Statistische Auswertung**

Alle Tests erfolgte mit Hilfe des Statistik-Programms GraphPad Prism 4 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Die statistische Analyse beinhaltete die Evaluation von arithmetischen Mittelwerten (MW) und Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler (SEM). Beim Vergleich der Gruppen wurde der ANOVA-Test (one-way analysis of variance) mit dem Bonferroni's Multiple Comparison Post-Test verwendet. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als signifikant angenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Gewichtsentwicklung

Die Gewichtsentwicklung der Tiere in den einzelnen Versuchsreihen ist in den Abbildungen 8-12 dokumentiert.

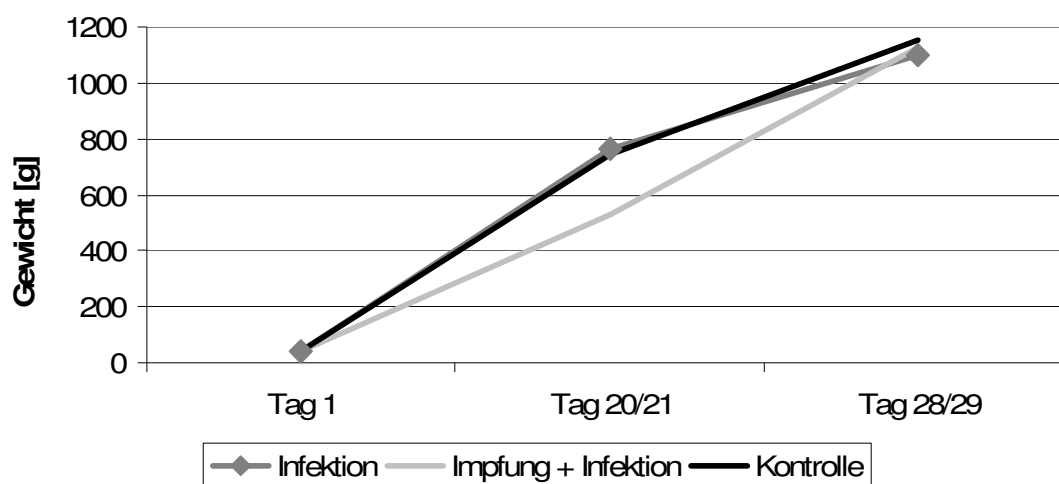
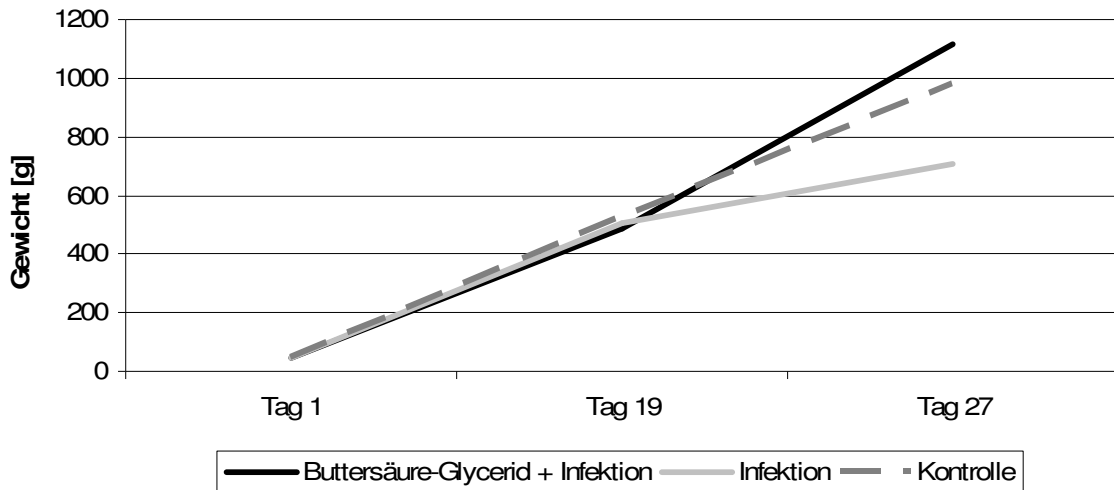


Abb. 8 Gewichtsentwicklung 1. VR

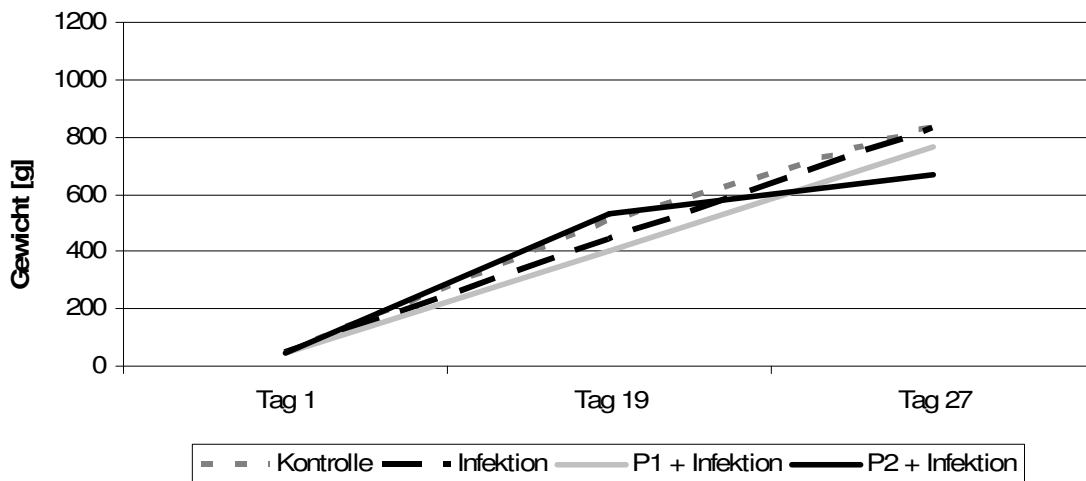
In der ersten Versuchsreihe wogen die Küken bei der Einstellung am ersten Lebenstag in allen Gruppen ca. 41g und erreichten bis zur 4. Lebenswoche (Tag 28/29) eine Lebensmasse von ca. 1100g.

## Ergebnisse



**Abb. 9 Gewichtsentwicklung 2. VR**

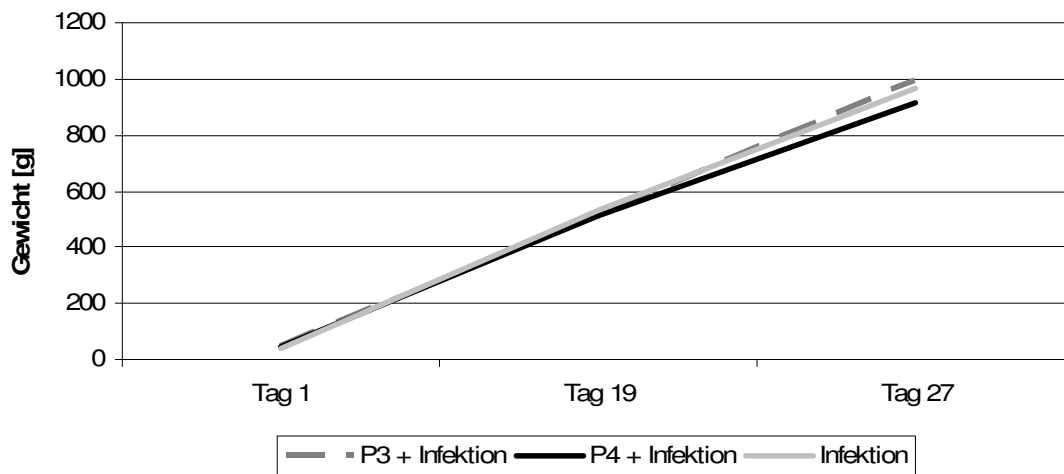
In der zweiten Versuchsreihe starteten die Tiere mit ca. 44g. Die Gruppe „Buttersäure-Glycerid + Infektion“ lag an Tag 19 bei 484g und an Tag 27 bei 1114g. Die Gruppe „Infektion“ lag an Tag 19 bei 508g, an Tag 27 jedoch nur bei 706g. Dazwischen lag an Tag 27 die Kontrollgruppe mit durchschnittlich 978g, nachdem die Tiere dieser Gruppe an Tag 27 durchschnittlich 523g wogen.



**Abb. 10 Gewichtsentwicklung 3. VR**

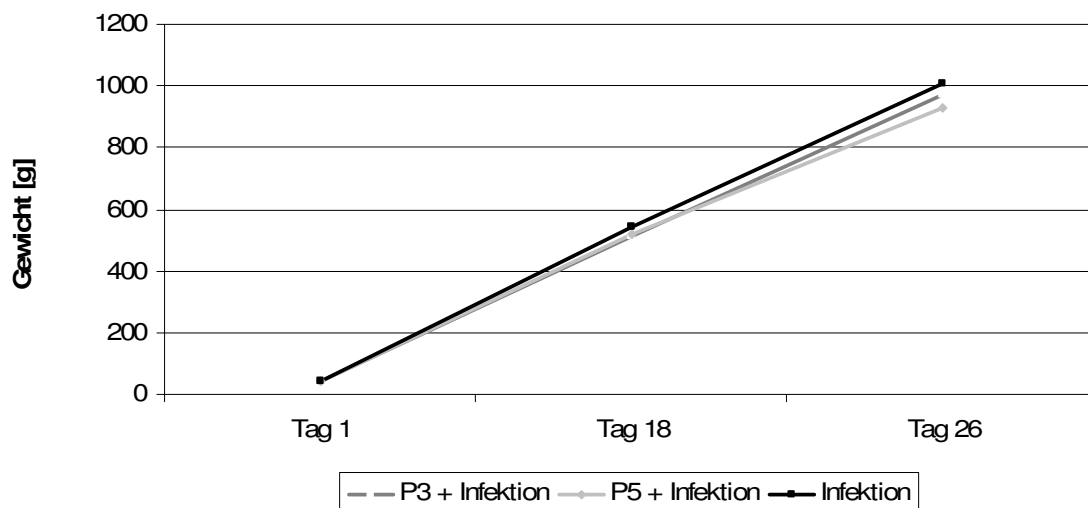
In der dritten Versuchsreihe lagen die vier untersuchten Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum eng beieinander (Kontrolle: Tag 1: 47g, Tag 19: 508g und Tag 27: 834g; Infektion: Tag 1: 47g, Tag 19: 442g, Tag 27: 828g; P1 + Infektion: Tag 1: 48g,

Tag 19: 402g, Tag 27: 765g; P2 + Infektion: Tag 1: 48g, Tag 19: 530g, Tag 27: 667g).



**Abb. 11** Gewichtsentwicklung 4. VR

In der vierten Versuchsreihe lagen alle drei Gruppen in Bezug auf die Gewichtsentwicklung sehr eng beieinander. Am Einstellungstag wogen die Küken der Gruppe „P3 + Infektion“ 42g, wie auch die der Gruppe „P4 + Infektion“. Die Gruppe „Infektion“ wog im Schnitt 41g. Am 19. Lebenstag variierten die Gewichte nur leicht (P3 + Infektion: 514g, P4 + Infektion: 512g, Infektion 534g). An Tag 27 wogen die Küken der Gruppe „P3 + Infektion“ 990g, die der Gruppe „P4 + Infektion“ 912g und die der Gruppe „Infektion“ 969g.



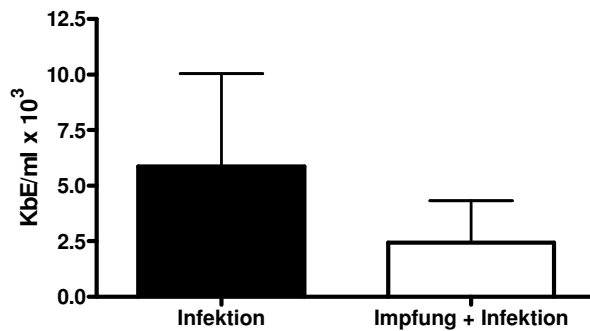
**Abb. 12** Gewichtsentwicklung 5. VR

Abbildung 12 zeigt die Gewichtsentwicklung der fünften Versuchsreihe. Die mit dem Probiotikum P3 behandelte und infizierte Gruppe wog am Einstellungstag durchschnittlich 44g, am 19. Lebenstag 514g und am 27. Lebenstag 970g. Die Gruppe „P5 + Infektion“ hatte am 1. Lebenstag ein durchschnittliches Gewicht von ebenfalls 44g, am 19. Lebenstag von 517g und am 27. Lebenstag von 929g. Die lediglich infizierten Tiere wogen am 1. Tag 42g, am 19. 540g und am 27. 1009g.

## 3.2 Bakteriologische Untersuchung

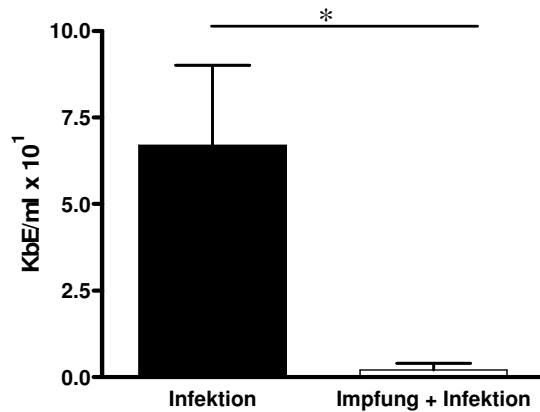
### 3.2.1 Quantitative bakteriologische Untersuchung

In der ersten Versuchsreihe (VR) wurden bei der quantitativen bakteriologischen Untersuchung 10 Tiere aus der geimpften und infizierten und 10 Tiere aus der lediglich infizierten Gruppe auf ihre Keimgehalte in Caecuminhalt und Leber untersucht. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 14 und 15. Die Werte werden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM) in Kolonie-bildenden Einheiten pro Milliliter multipliziert mit 1000 bzw. 10 angegeben.



**Abb. 13 Bakteriologische Untersuchung Caecum 1. VR**  
n = 10, Werte werden angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  
6 dpi (= Tage nach der Infektion, days post infection)

Die Untersuchung der Caecumproben ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen „Infektion“ ( $(5,86 \pm 4,18) \times 10^3$ ) und „Impfung und Infektion“ ( $(2,44 \pm 1,87) \times 10^3$ ). Pro Gruppe wurden zehn Tiere untersucht.

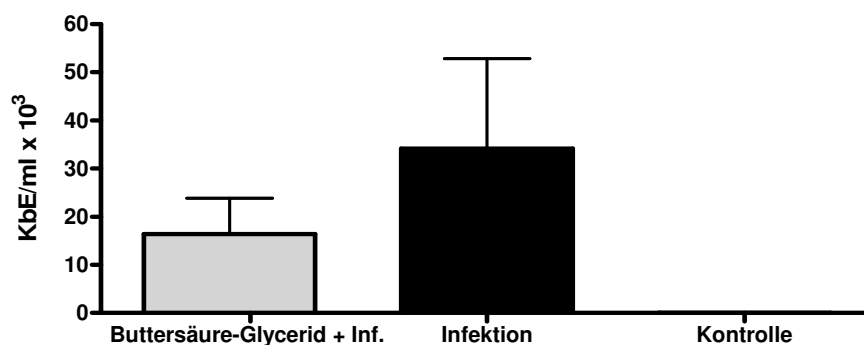


**Abb. 14 Bakteriologische Untersuchung Leber 1. VR**

Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter multipliziert mit  $10^1$   
 $n = 10$ , Werte werden angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ ,  
 6 dpi (= Tage nach der Infektion, days post infection)

Bei den Leberproben zeigte sich eine signifikant niedrigere Besiedlung dieses Organs bei geimpften und infizierten Tieren ( $(0,20 \pm 0,20) \times 10^1$ ) im Vergleich mit lediglich infizierten ( $(6,70 \pm 2,31) \times 10^1$ ) ( $p < 0,05$ ).

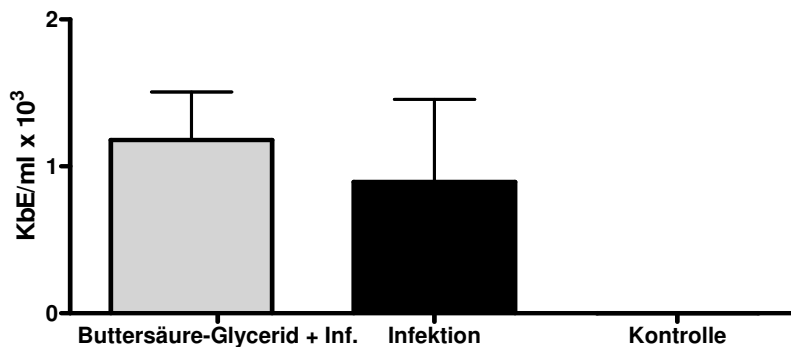
Bei der quantitativen bakteriologischen Untersuchung der zweiten Versuchsreihe wurden aus folgenden Gruppen jeweils sieben Tiere untersucht: Gruppe 1: Buttersäure-Glycerid + Infektion, Gruppe 2: Infektion, Gruppe 3: Kontrolle. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 und 16 gezeigt.



**Abb. 15 Bakteriologische Untersuchung Caecum 2. VR**

Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter multipliziert mit 1000  
 $n = 7$ , Werte werden angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  
 6 dpi (= Tage nach der Infektion, days post infection)

Während die Kontrolle negativ war, zeigten die infizierten Tiere die höchste Besiedlung mit Salmonellen im Caecuminhalt ( $(34,15 \pm 18,65) \times 10^3$ ). Die mit dem Futterzusatz Buttersäure-Glycerid gefütterten Tiere zeigten eine geringere Salmonellenkontamination im Darminhalt ( $(16,44 \pm 7,37) \times 10^3$ ) als die lediglich infizierten Küken. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.



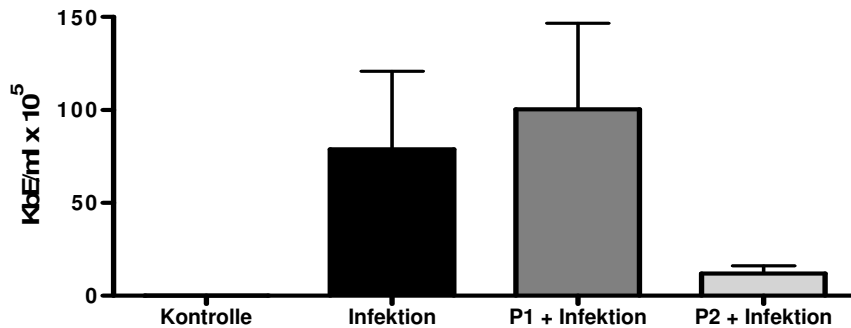
**Abb. 16 Bakteriologische Untersuchung Leber 2. VR**

Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter multipliziert mit 1000  
n = 7, Werte werden angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  
6 dpi (= Tage nach der Infektion, days post infection)

Die untersuchten Leberproben zeigten bei den infizierten ( $(0,89 \pm 0,56) \times 10^3$ ) und den behandelten und infizierten Küken ( $(1,18 \pm 0,33) \times 10^3$ ) keine signifikanten Unterschiede, während die Kontrollgruppe negativ war.



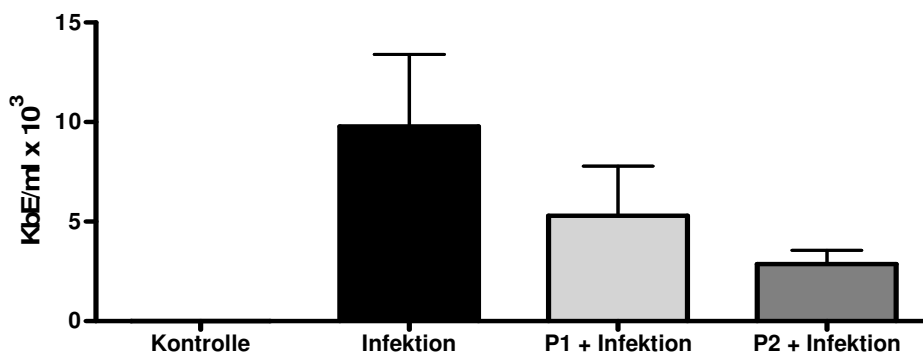
In der dritten Versuchsreihe wurden pro Gruppe sieben Tiere untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt.



**Abb. 17 Bakteriologische Untersuchung Caecum 3. VR**

Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter multipliziert mit  $10^5$   
 $n = 7$ , Werte werden angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  
 6 dpi (= Tage nach der Infektion, days post infection)

Der Caecuminhalt der mit P1 behandelten Gruppe erwies sich als geringfügig stärker mit Salmonellen besiedelt ( $(100,4 \pm 46,35) \times 10^5$ ) als der der infizierten Gruppe ( $(78,84 \pm 41,91) \times 10^5$ ). P2 bewirkte eine Reduktion der Keimzahl der Salmonellen ( $(11,89 \pm 4,23) \times 10^5$ ) gegenüber der Infektion. Die Unterschiede waren nicht signifikant. Die Kontrollgruppe war negativ.

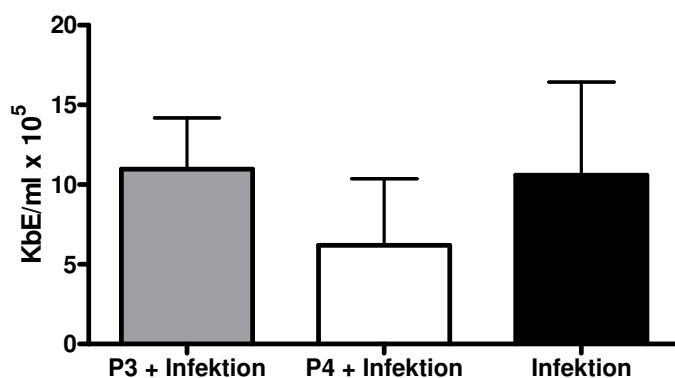


**Abb. 18 Bakteriologische Untersuchung Leber 3. VR**

Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter multipliziert mit  $10^4$   
 $n = 7$ , Werte werden angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  
 6 dpi (= Tage nach der Infektion, days post infection)

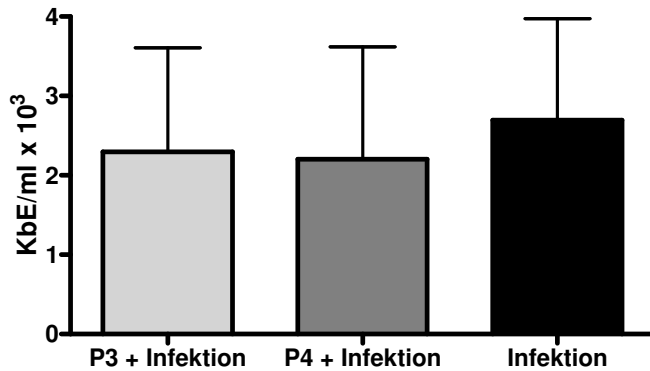
Die mit den Probiotika P1 ( $(5,29 \pm 2,50) \times 10^3$ ) und P2 ( $(2,86 \pm 0,70) \times 10^3$ ) behandelten Gruppen zeigten eine verminderte Anreicherung mit Salmonellen in der Leber als die infizierte Gruppe ( $(9,78 \pm 3,63) \times 10^3$ ). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Kontrollgruppe war negativ.

Die Ergebnisse der vierten Versuchsreihe sind in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt. In dieser Versuchsreihe wurden von 15 Tieren pro Gruppe die Caeca und die Lebern bakteriologisch untersucht. Da die Kontrollgruppe in den vorangehenden Untersuchungen stets negativ war, wurden in den folgenden Versuchsreihen keine Kontrolltiere mehr eingesetzt. Dies ermöglichte die Untersuchung einer größeren Anzahl an Tieren.



**Abb. 19 Bakteriologische Untersuchung Caecum 4. VR**  
 Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter multipliziert mit  $10^5$   
 n = 15, Werte werden angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  
 6 dpi (= Tage nach der Infektion, days post infection)

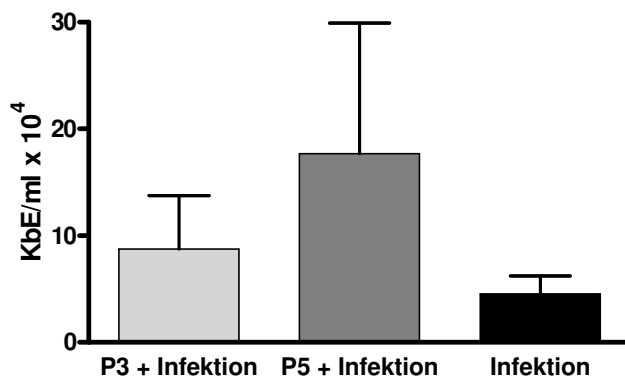
Im Caecum zeigte sich eine Reduktion der Salmonellenbesiedlung bei der mit dem Probiotikum P4 behandelten Gruppe ( $6,19 \times 10^5 \pm 4,17$ ) gegenüber der infizierten ( $10,95 \times 10^5 \pm 5,85$ ). Die mit P3 behandelte Gruppe ( $10,97 \times 10^5 \pm 3,21$ ) entsprach der infizierten Gruppe. Die Unterschiede waren nicht signifikant.



**Abb. 20 Bakteriologische Untersuchung Leber 4. VR**  
 Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter multipliziert mit 10<sup>3</sup>  
 n = 15, Werte werden angegeben als Mittelwerte ± SEM,  
 6 dpi (= Tage nach der Infektion, days post infection)

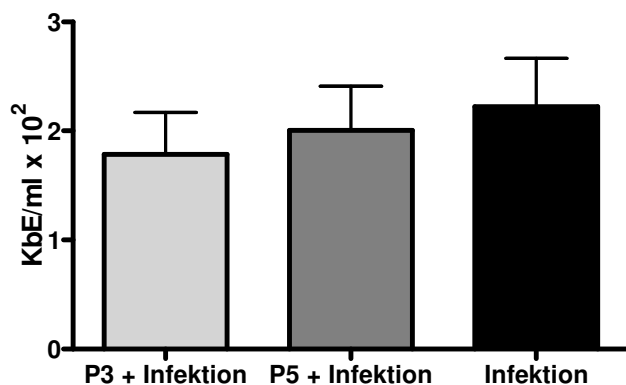
Die mit den Probiotika P3 ((2,30 ± 1,31) x 10<sup>3</sup>) und P4 ((2,21 ± 1,41) x 10<sup>3</sup>) behandelten Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Anreicherung von Salmonellen in der Leber nicht signifikant von der infizierten Gruppe ((2,69 ± 1,28) x 10<sup>3</sup>).

In der fünften Versuchsreihe wurden nochmals 15 Tiere pro Gruppe untersucht. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 21 und 22.



**Abb. 21 Bakteriologische Untersuchung Caecum 5. VR**  
 Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter multipliziert mit 10<sup>4</sup>  
 n = 15, Werte werden angegeben als Mittelwerte ± SEM,  
 6 dpi (= Tage nach der Infektion, days post infection)

Im Caecuminhalt zeigte die mit P5 behandelte Gruppe  $((17,67 \pm 12,26) \times 10^4)$  geringgradig höhere Werte als die mit P3 behandelte  $((8,73 \pm 5,00) \times 10^4)$  und die Infektions-Gruppe  $((4,55 \pm 1,66) \times 10^4)$ .

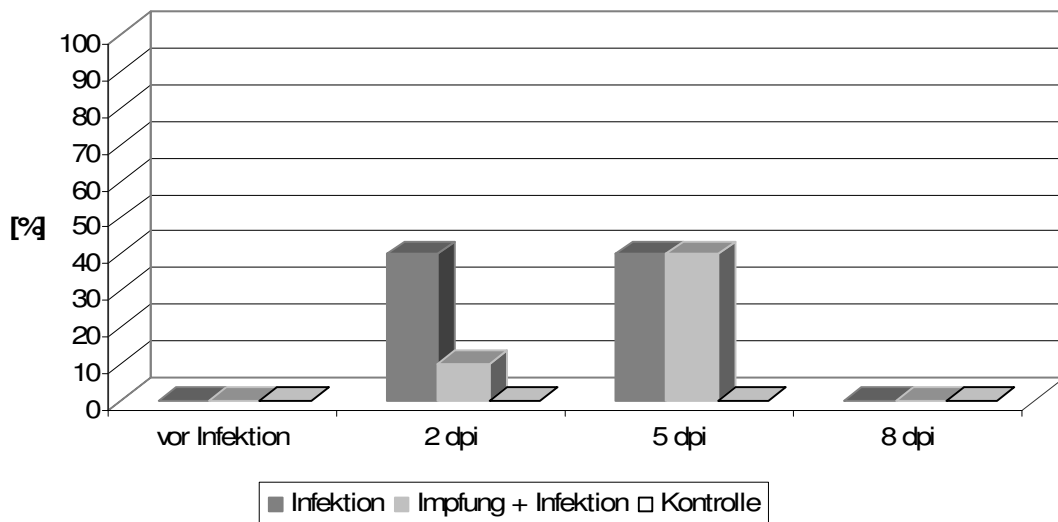


**Abb. 22 Bakteriologische Untersuchung Leber 5. VR**  
Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter multipliziert mit  $10^2$   
 $n = 15$ , Werte werden angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  
6 dpi (= Tage nach der Infektion, days post infection)

Zwischen den Leberproben zeigten sich in der fünften Versuchsreihe keine signifikanten Unterschiede (P3 + Infektion:  $(1,79 \pm 0,38) \times 10^2$ ; P5 + Infektion:  $(2,01 \pm 0,41) \times 10^2$ ; Infektion:  $(2,22 \pm 0,44) \times 10^2$ ).

### 3.2.2 Tupferproben

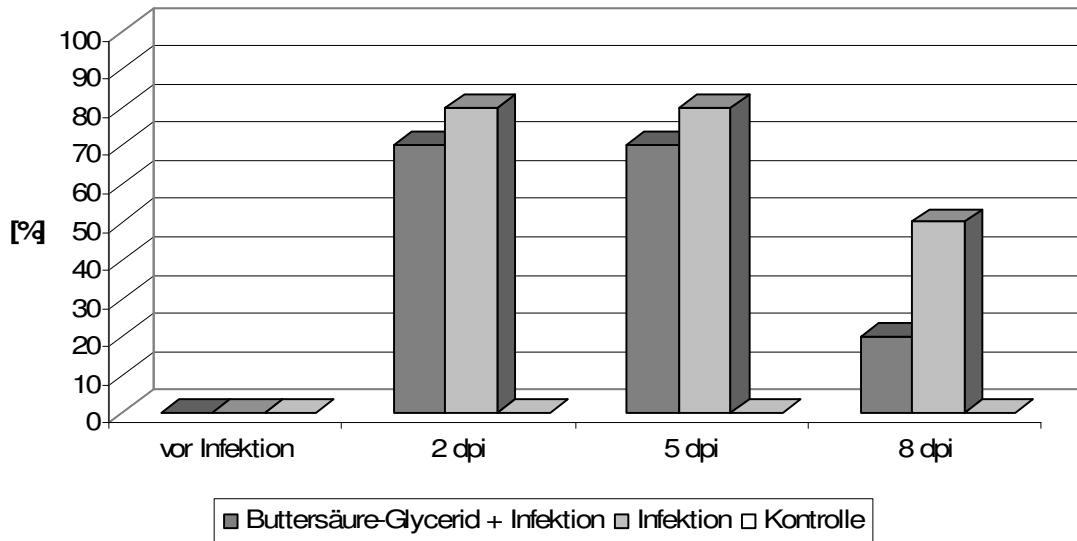
Im Folgenden sind die Ergebnisse der Tupferproben der durchgeführten Versuchsreihen dargestellt. Es wurden pro Gruppe zehn Tiere sechs Tage vor und zwei, fünf und acht Tage nach der Infektion mit Salmonellen beprobt. Die untersuchten Tiere wurden zufällig ausgewählt.



**Abb. 23 Tupferproben 1. VR**

Anteil [%] der positiv auf den eingesetzten Infektionsstamm reagierenden Tiere an vier verschiedenen Zeitpunkten, n = 10, dpi = Tage nach der Infektion (days post infection)

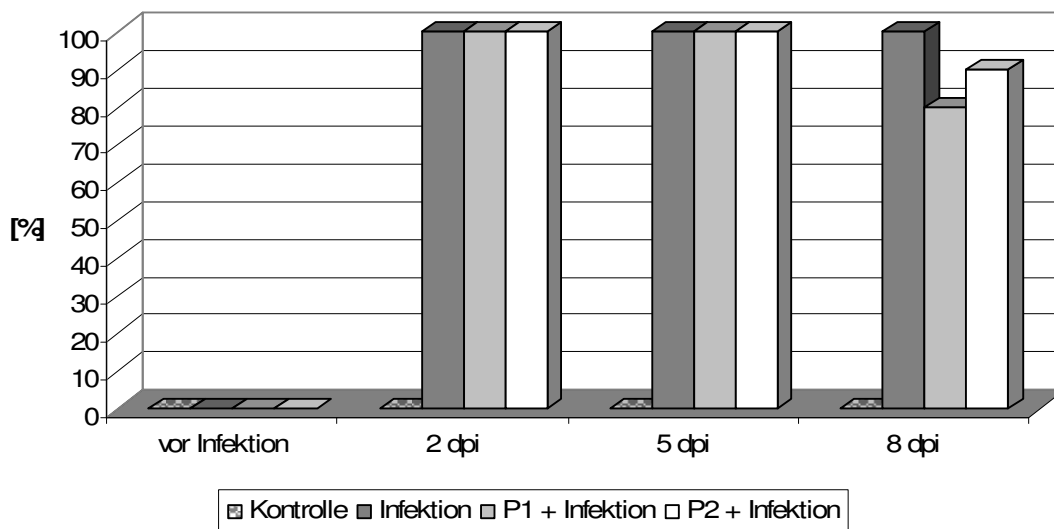
Sowohl die Kontrollgruppe als auch alle Gruppe vor dem Infektionszeitpunkt waren negativ. Zwei und fünf Tage nach der Infektion schieden sowohl die infizierten als auch die geimpften Tiere zu bis zu 40% den Salmonellenstamm mit den Faeces aus.



**Abb. 24 Tupferproben 2. VR**

Anteil [%] der positiv auf den eingesetzten Infektionsstamm reagierenden Tiere an vier verschiedenen Zeitpunkten, n = 10, dpi = Tage nach der Infektion (days post infection)

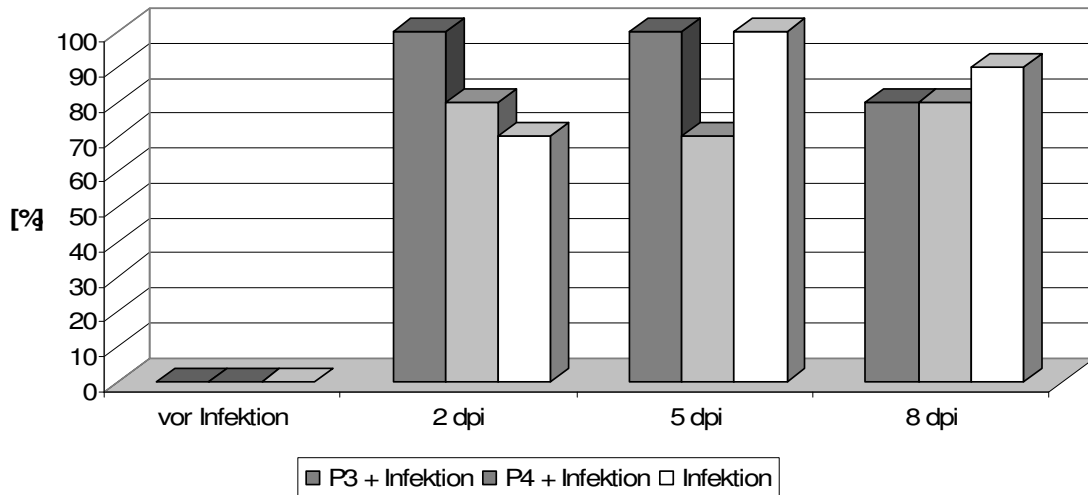
Nachdem vor der Infektion mit Salmonellen alle Gruppen negativ waren, stiegen die Prozentzahlen in der zweiten Versuchsreihe schon zwei Tage nach der Infektion an und lagen bei den infizierten Gruppen zwischen 70 und 80 %. Am fünften Tag nach der Infektion veränderten sich diese Werte nicht, erst am achten Tag nach der Infektion verminderte sich die Ausscheidung auf 20 bzw. 50% der Tiere. Die Kontrollgruppe war durchgängig negativ (Abb. 24).



**Abb. 25 Tupferproben 3. VR**

Anteil [%] der positiv auf den eingesetzten Infektionsstamm reagierenden Tiere an vier verschiedenen Zeitpunkten, n = 10, dpi = Tage nach der Infektion (days post infection)

In der dritten Versuchsreihe waren, nachdem die erste Tupferprobe negativ ausgefallen war, am zweiten und fünften Tag nach der Infektion alle beprobten Tiere (bis auf die Kontrollgruppe) positiv. Am achten Tag nach der Infektion sanken die Zahlen bei den beiden mit den Probiotika P1 und P2 behandelten Gruppen auf 80 bzw. 90% ab, während die Infektionsgruppe weiterhin nahezu bei 100% Salmonellen-positiven Tieren lag (Abb. 25).

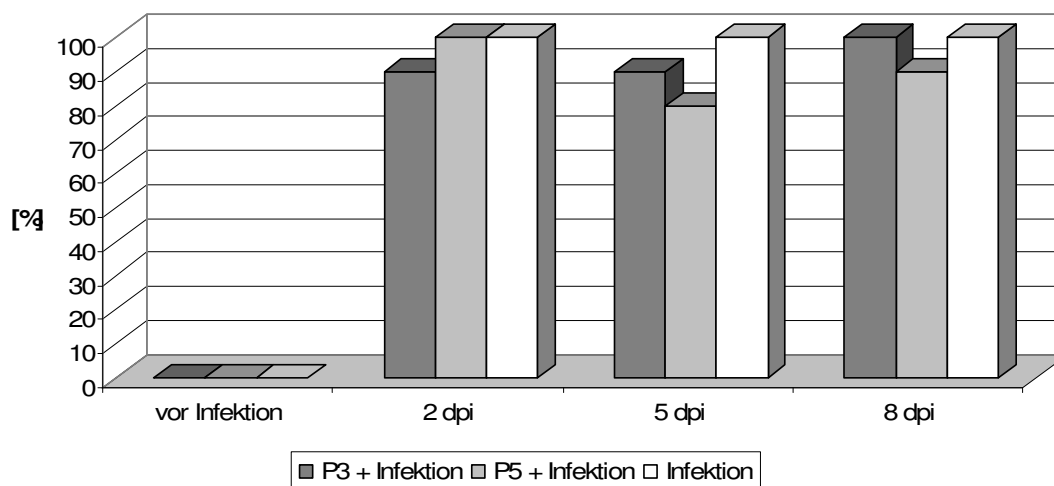


**Abb. 26 Tupferproben 4. VR**

Anteil [%] der positiv auf den eingesetzten Infektionsstamm reagierenden Tiere an vier verschiedenen Zeitpunkten, n = 10, dpi = Tage nach der Infektion (days post infection)

In der vierten Versuchsreihe waren vor der Infektion alle Tiere Salmonellen-negativ. Da die Kontrollgruppen in den vorangegangenen Versuchen durchgängig negativ waren, wurde in dieser Versuchsreihe auf die Kontrollgruppe verzichtet. Die mit dem Probiotikum P3 behandelte Gruppe war sowohl zwei als auch fünf Tage nach der Infektion zu 100% positiv und auch acht Tage nach der Infektion waren noch 8 von 10 Tieren positiv. Die mit P4 behandelte und die Infektionsgruppe zeigten niedrigere Werte (80 bzw. 70% 2 dpi und 80 bzw. 90% 8 dpi). Am fünften Tag nach der Infektion waren bei der infizierten Gruppe alle Tiere positiv und bei der mit P4 behandelten 70% (Abb. 26).

## Ergebnisse



### Abb. 27 Tupferproben 5. VR

Anteil [%] der positiv auf den eingesetzten Infektionsstamm reagierenden Tiere an vier verschiedenen Zeitpunkten, n = 10, dpi = Tage nach der Infektion (days post infection)

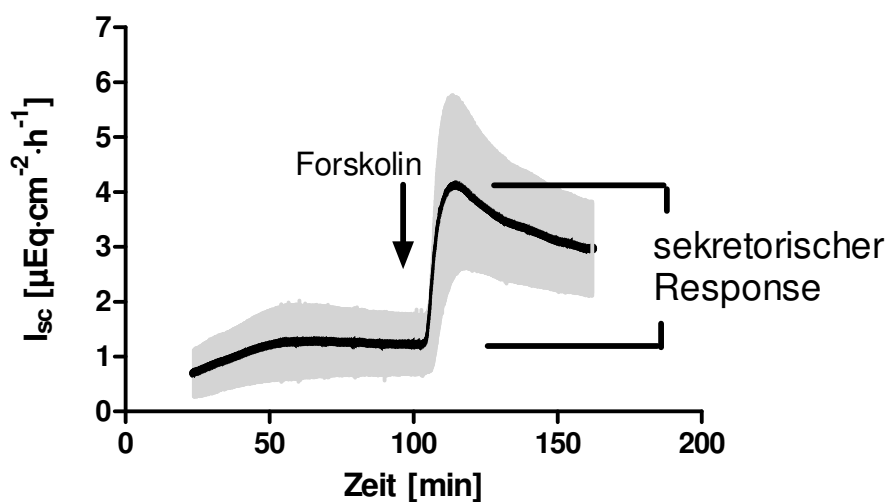
In der fünften Versuchsreihe (Abb. 27) zeigten sich in allen Gruppen nach negativen Ergebnissen vor der Infektion durchgängig hohe Prozentzahlen zwischen 80 und 100%. Wiederum wurden 10 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt beprobt.



### 3.3 Epithel-physiologische Versuche

#### 3.3.1 Kurzschlussstrom $I_{sc}$ und Gewebeleitfähigkeit $G_t$

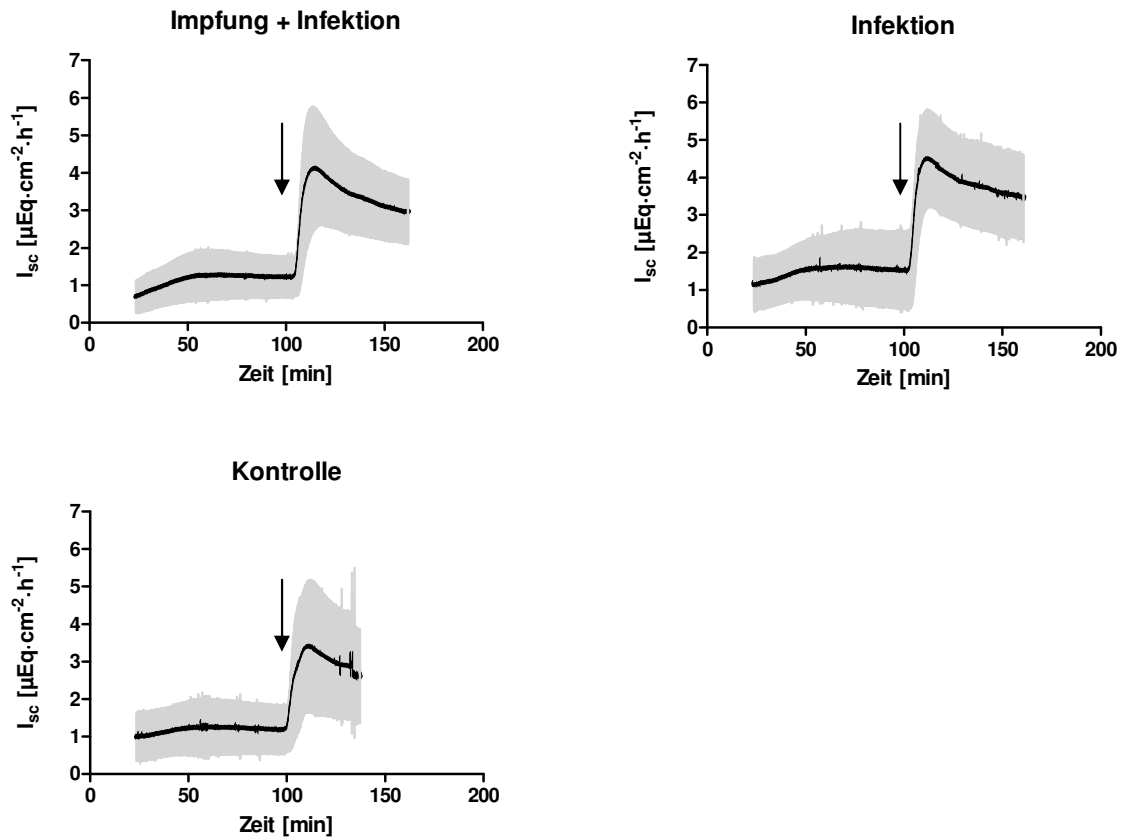
Prinzipiell verliefen die Kurven der Gewebeleitfähigkeiten und Kurzschlussströme bei allen Gruppen in allen Versuchsreihen ähnlich. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.



**Abb. 28 Sekretorischer Response**

definiert als maximale Zunahme des Kurzschlussstroms [ $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] nach Zugabe von Forskolin

Nach der Zugabe von Forskolin wurde der maximale Anstieg des Kurzschlussstroms  $I_{sc}$  ermittelt, indem der Mittelwert der letzten drei Werte vor der Zugabe vom maximalen Wert innerhalb der ersten drei Minuten nach der Zugabe subtrahiert wurde. Dieser Wert wird folgend als „sekretorischer Response“ bezeichnet.

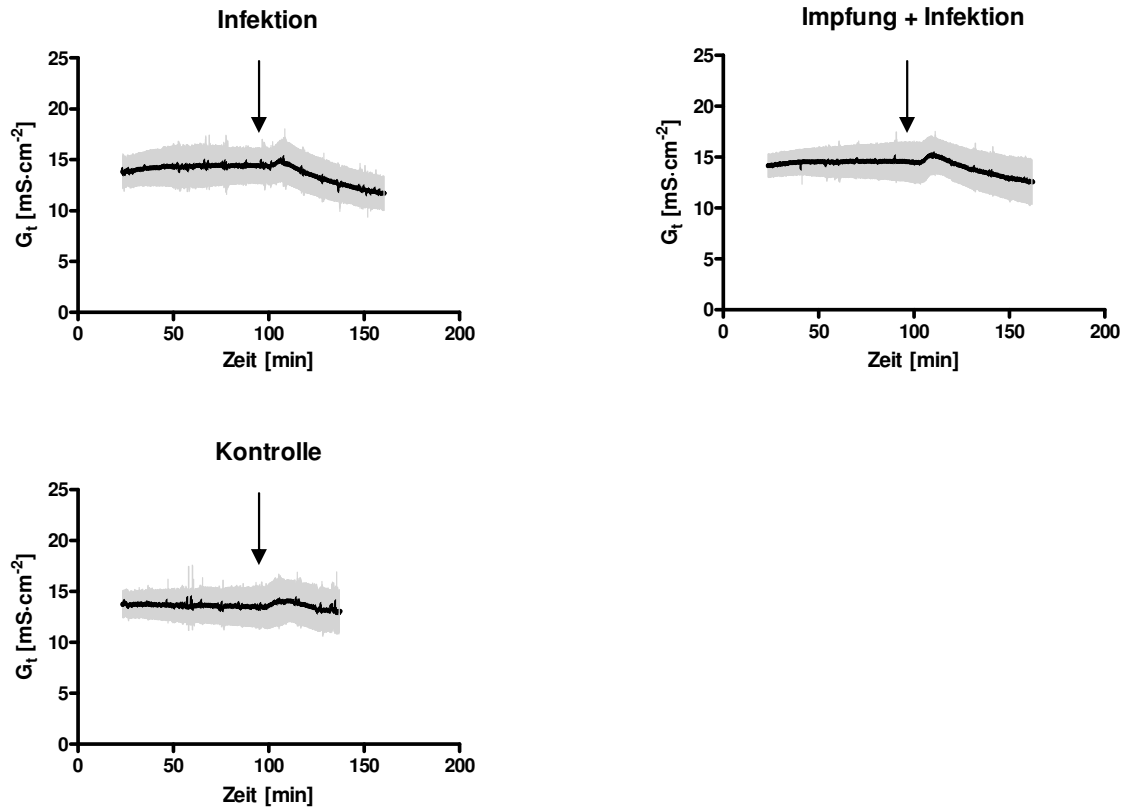


**Abb. 29 Epithel-physiologische Versuche Kurzschlussstrom 1. VR**

Kurzschlussstrom  $I_{sc}$  [ $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ], die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von Forskolin

Nach ca. 50-minütiger Inkubation der Gewebe in den Ussing-Kammern stellte sich in allen Gruppen ein konstanter Kurzschlussstrom von im Mittel  $1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  („Impfung + Infektion“, „Kontrolle“), bzw.  $1,5 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  („Infektion“) ein.

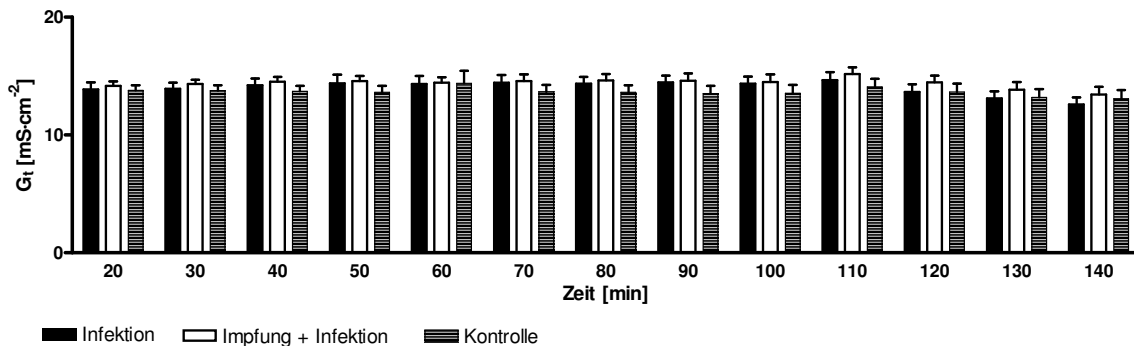
Die Steigerung des Kurzschlussstroms [ $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] durch die Zugabe von Forskolin zur serosalen Gewebeseite nach 95 Minuten wird als sekretorischer Response angegeben. In der ersten Versuchsreihe betrug der sekretorische Response [ $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] in der Gruppe „Infektion“  $2,98 \pm 0,7$ , in der Gruppe „Impfung + Infektion“  $2,93 \pm 1,12$  und in der Kontrollgruppe  $2,22 \pm 1,21$ . Das Maximum dieser Stromantwort wurde ca. drei Minuten nach der Zugabe erreicht. Danach fiel der Kurzschlussstrom stetig ab. Pro Gruppe wurden neun Tiere untersucht. Die Unterschiede im sekretorischen Response waren nicht signifikant.



**Abb. 30 Epithel-physiologische Versuche Gewebeleitfähigkeit 1. VR**

Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  [mS·cm<sup>-2</sup>], die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von Forskolin

Die Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  lag in allen Gruppen bei Mittelwerten von 14 mS·cm<sup>-2</sup>. Die Zugabe von Forskolin hatte keinen nennenswerten Einfluss auf diesen Parameter. Die Gewebeleitfähigkeiten wurden sowohl zwischen den Gruppen als auch über die Zeit verglichen. Abbildung 31 zeigt den Vergleich zwischen den drei Gruppen („Infektion“, „Impfung“ und „Kontrolle“). Alle zehn Minuten wurden die Leitfähigkeiten verglichen. Es zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.



**Abb. 31 Gewebeleitfähigkeit im Gruppenvergleich 1. VR**

In keiner der Gruppen zeigte sich ein Zeiteffekt (Abb. 32). Auch die Zugabe von Forskolin nach 95 Minuten führte zu keiner signifikanten Veränderung der Gewebeleitfähigkeit.

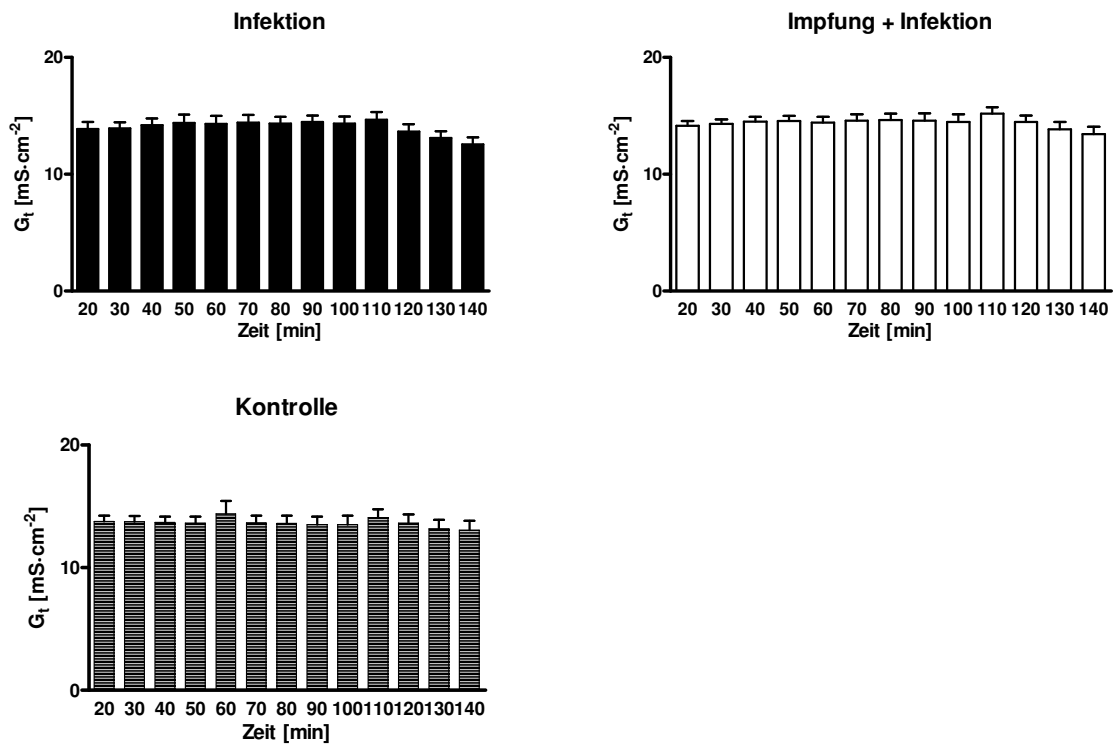
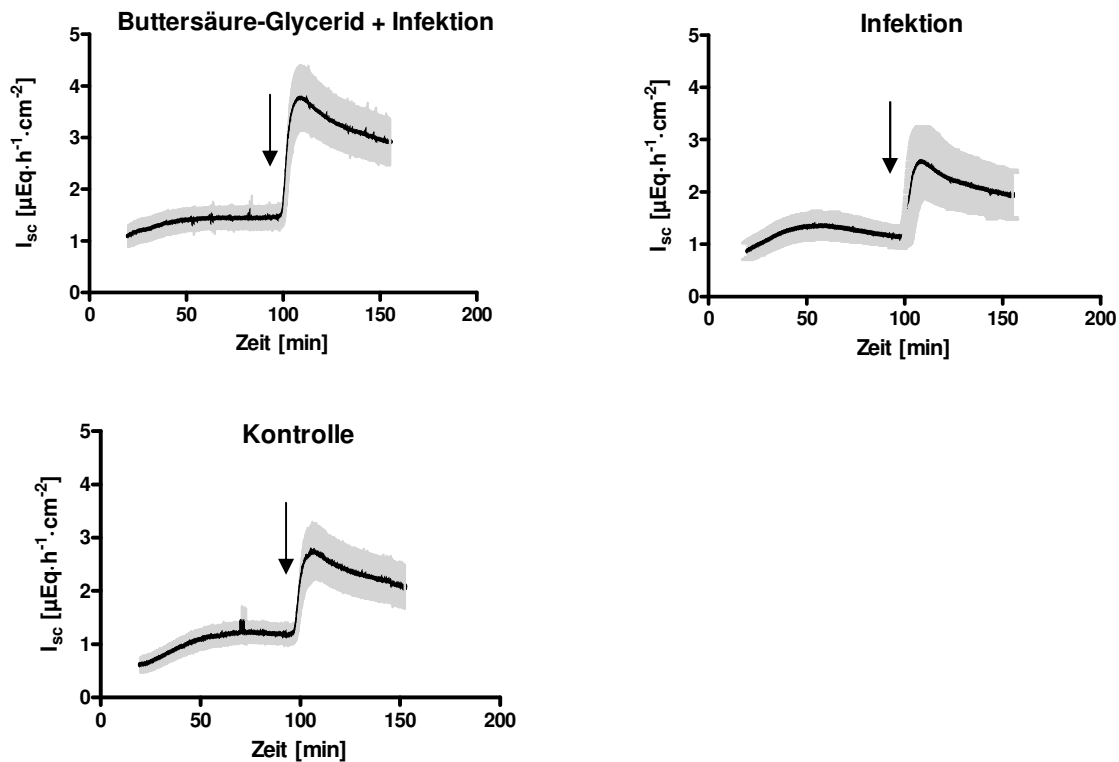


Abb. 32 Gewebeleitfähigkeit; Vergleich der Gruppen über die Zeit 1. VR



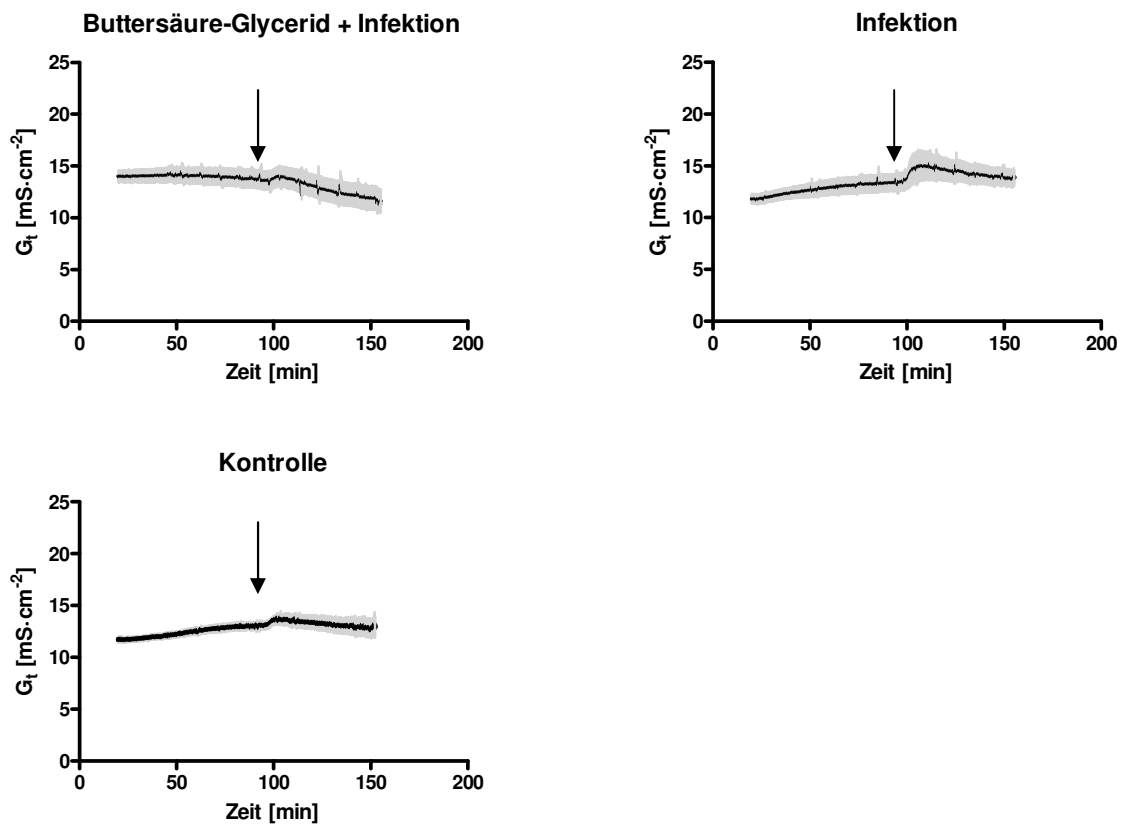
**Abb. 33 Epithel-physiologische Versuche Kurzschlussstrom 2. VR**

Kurzschlussstrom  $I_{sc}$  [ $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ], die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von Forskolin.

In der zweiten Versuchsreihe stellte sich nach ca. 50-minütiger Inkubation in den Ussing-Kammern ein konstanter Wert von 1- 1,5  $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ein.

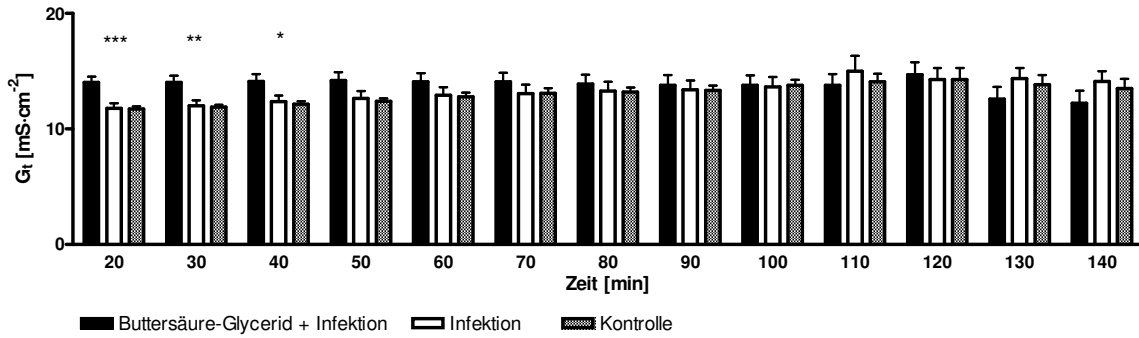
Die Zugabe von Forskolin zur serosalen Gewebeseite erwirkte stets einen schnellen Anstieg des Kurzschlussstroms auf Werte zwischen 2,5 („Infektion“) und 3,8 („Buttersäure-Glycerid + Infektion“) („Kontrolle“: 2,8). Das Maximum der Stromantwort wurde nach ca. 3 Minuten nach der Zugabe erreicht. Darauf folgte ein stetiger Abfall des Kurzschlussstroms. Der sekretorische Response unterschied sich zwischen den Gruppen „Buttersäure-Glycerid + Infektion“ ( $2,35 \pm 1,32$ ), „Infektion“ ( $1,43 \pm 1,56$ ) und „Kontrolle“ ( $1,55 \pm 0,96$ ) nicht signifikant.

Der Verlauf der Gewebeleitfähigkeiten ist in den Abbildungen 34 bis 36 gezeigt. In der Anfangsphase dieses Versuches (20-40 Minuten nach Versuchsstart) traten Unterschiede in der Leitfähigkeit zwischen den Gruppen auf. 50 Minuten nach Start des Versuches jedoch stellte sich ein konstanter Wert von im Mittel  $13 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$  ein. Im weiteren Verlauf veränderte sich die Leitfähigkeit nicht. Die Zugabe von Forskolin 95 Minuten nach Versuchsstart hatte einen geringen, nicht signifikanten Anstieg der Gewebeleitfähigkeit zur Folge.



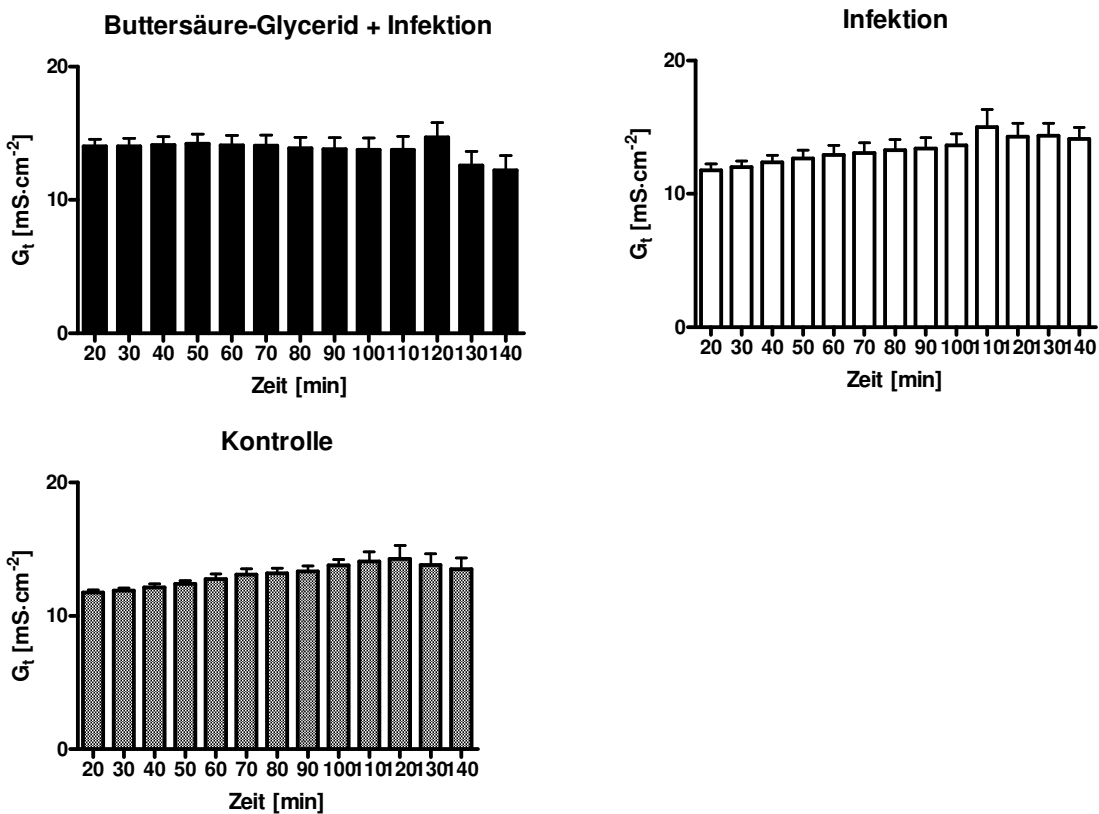
**Abb. 34 Epithel-physiologische Versuche Gewebeleitfähigkeit 2. VR**  
 Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  [ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ], die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von Forskolin.

## Ergebnisse



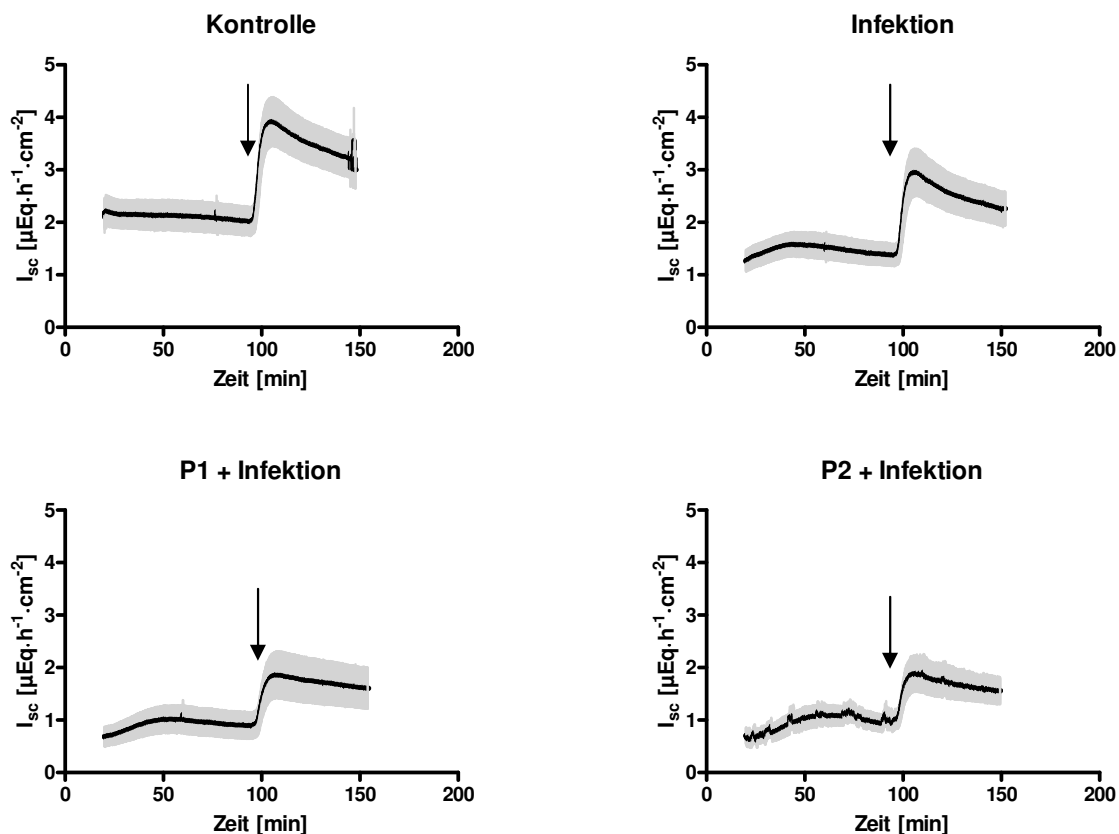
**Abb. 35 Gewebeleitfähigkeit im Gruppenvergleich 2. VR**

Während der zwei Stunden, in denen das Epithel in die Ussing-Kammern eingespannt war, zeigte sich kein Effekt der Zeit auf die Gewebeleitfähigkeit (Abb. 35) bei den verschiedenen Gruppen. Auch die Zugabe von Forskolin führte zu keiner signifikanten Veränderung wie es beim Kurzschlussstrom der Fall war.



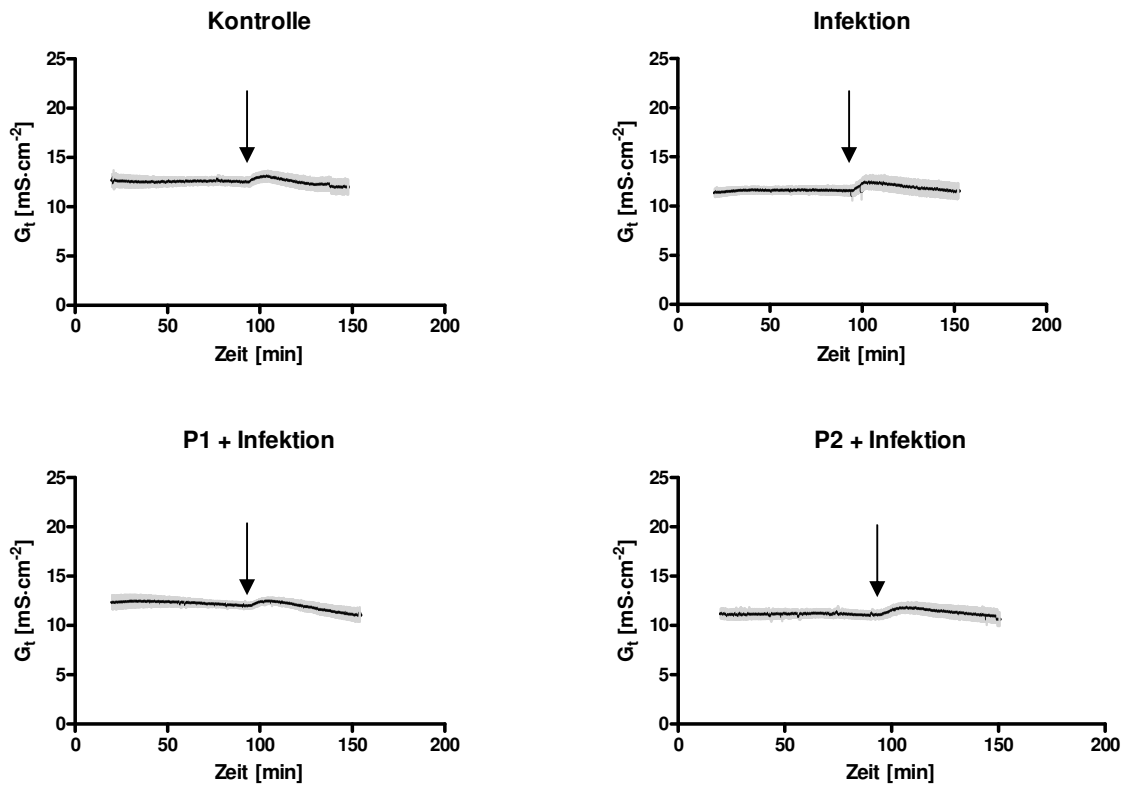
**Abb. 36 Gewebeleitfähigkeit; Vergleich der Gruppen über die Zeit 2. VR**

In der dritten Versuchsreihe wurden die beiden Probiotika P1 und P2 mit einer Infektions- und einer Kontrollgruppe verglichen. Nach 50 Minuten Inkubation in den Ussing-Kammern hatten alle Gruppen einen konstanten Wert von  $1-2 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  erreicht. Lediglich die Gruppe „P2 + Infektion“ zeigte auch weiterhin leichte Schwankungen, die aber keinen nennenswerten Einfluss auf den sekretorischen Response hatten. Alle Gruppen reagierten auf die Forskolin-Zugabe nach 95 Minuten nach Versuchsstart mit einem raschen Anstieg des Kurzschlussstroms. Der sekretorische Response [ $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] der vier Gruppen wies allerdings keine signifikanten Unterschiede auf (Kontrolle:  $1,84 \pm 0,66$ , Infektion:  $1,61 \pm 0,82$ , P1 + Infektion  $1,01 \pm 0,78$ , P2 + Infektion:  $0,96 \pm 0,71$ ). Nachdem das Maximum des Stromanstieges ca. 3 Minuten nach Zugabe erreicht war, sank der Kurzschlussstrom kontinuierlich ab.



**Abb. 37 Epithel-physiologische Versuche Kurzschlussstrom 3. VR**  
 Kurzschlussstrom  $I_{sc}$  [ $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ], die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von Forskolin.



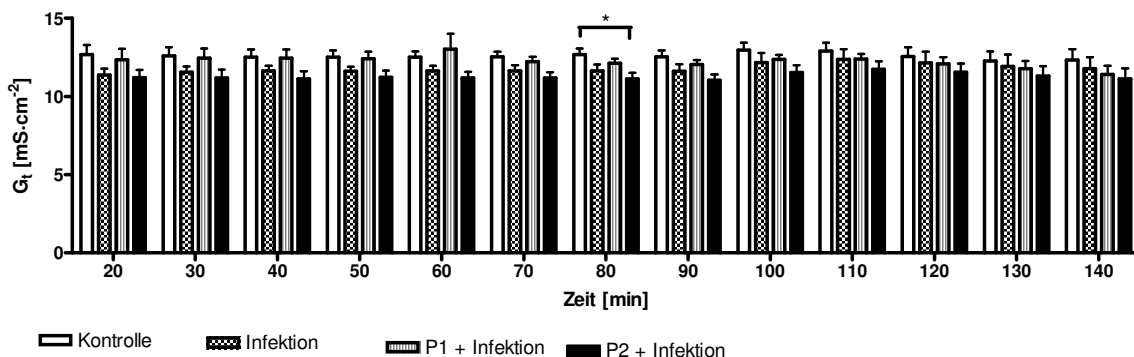


**Abb. 38 Epithel-physiologische Versuche Gewebeleitfähigkeit 3. VR**

Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  [mS·cm<sup>-2</sup>], die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von Forskolin.

In der dritten Versuchsreihe lagen die Gewebeleitfähigkeiten der einzelnen Gruppen im Mittel bei 12 mS·cm<sup>-2</sup>. Die Zugabe von Forskolin bewirkte keine nennenswerte Änderung der Leitfähigkeit.

Der Vergleich der Gewebeleitfähigkeiten zwischen den Gruppen ergab in dieser Versuchsreihe bis auf eine Ausnahme (80 Minuten nach Versuchsstart zwischen den Gruppen „Kontrolle“ und „P2 + Infektion“) keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 39 Gewebeleitfähigkeit im Gruppenvergleich 3. VR**

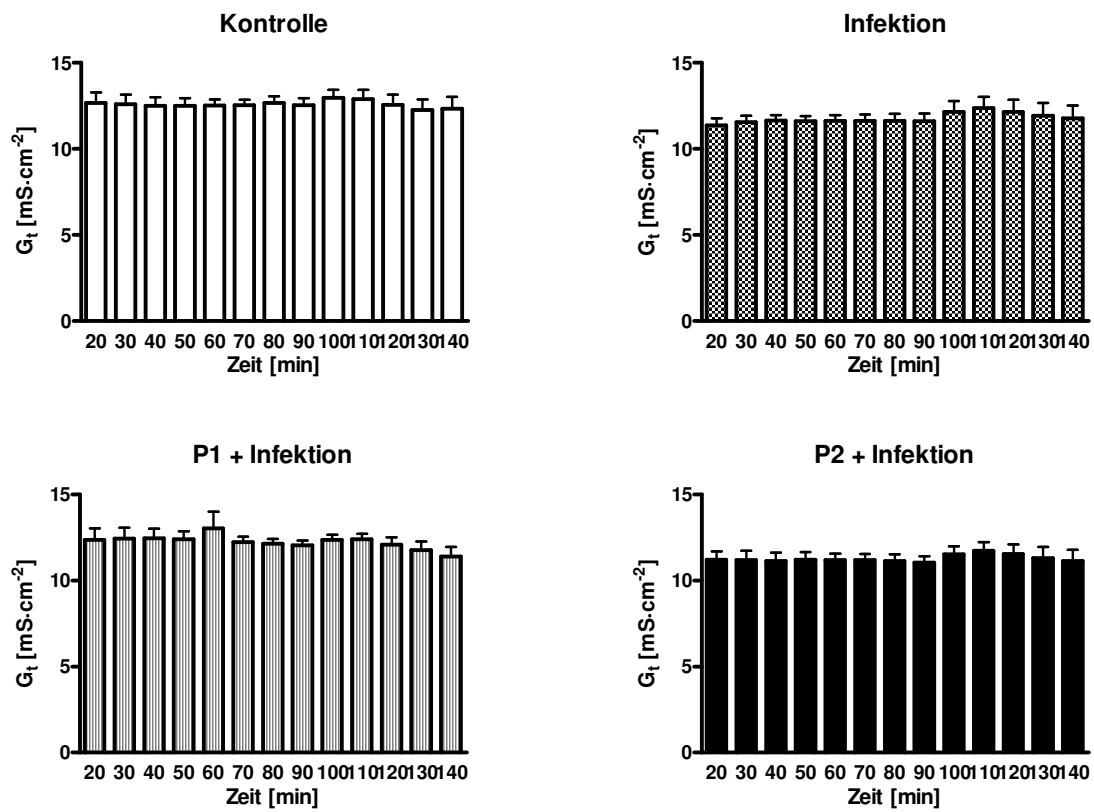
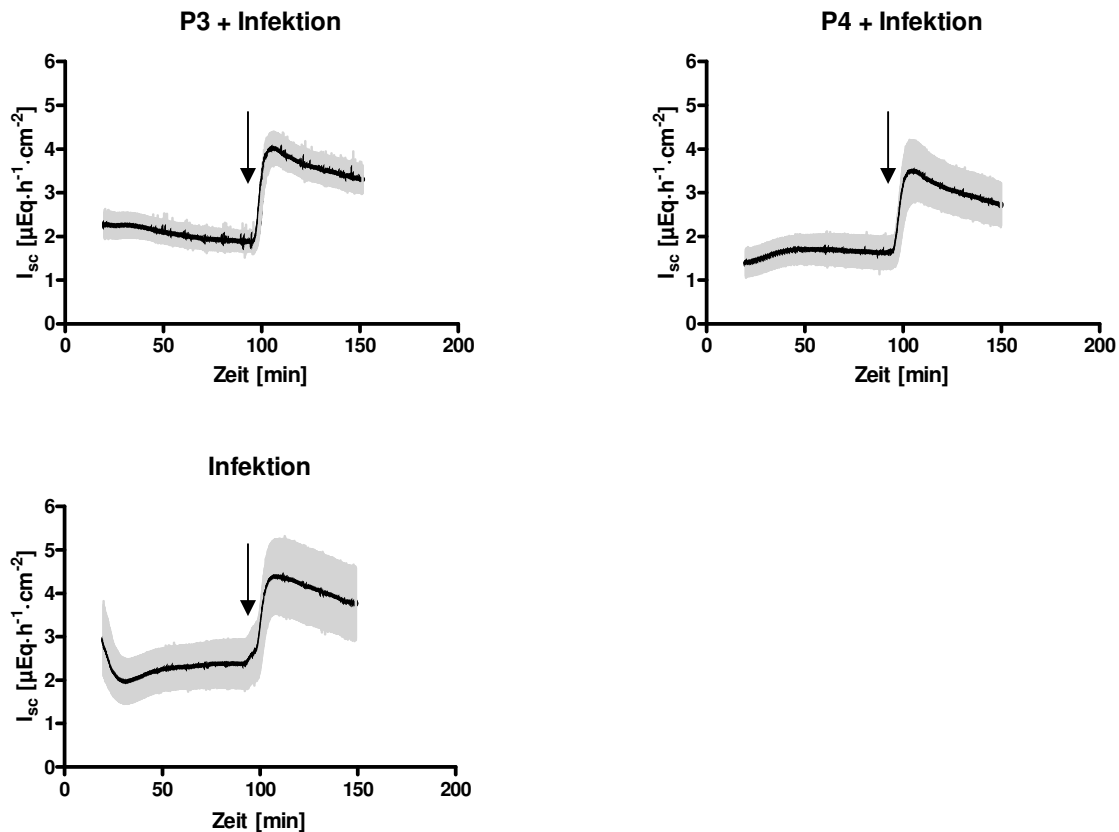


Abb. 40 Gewebeleitfähigkeit; Vergleich der Gruppen über die Zeit 3. VR

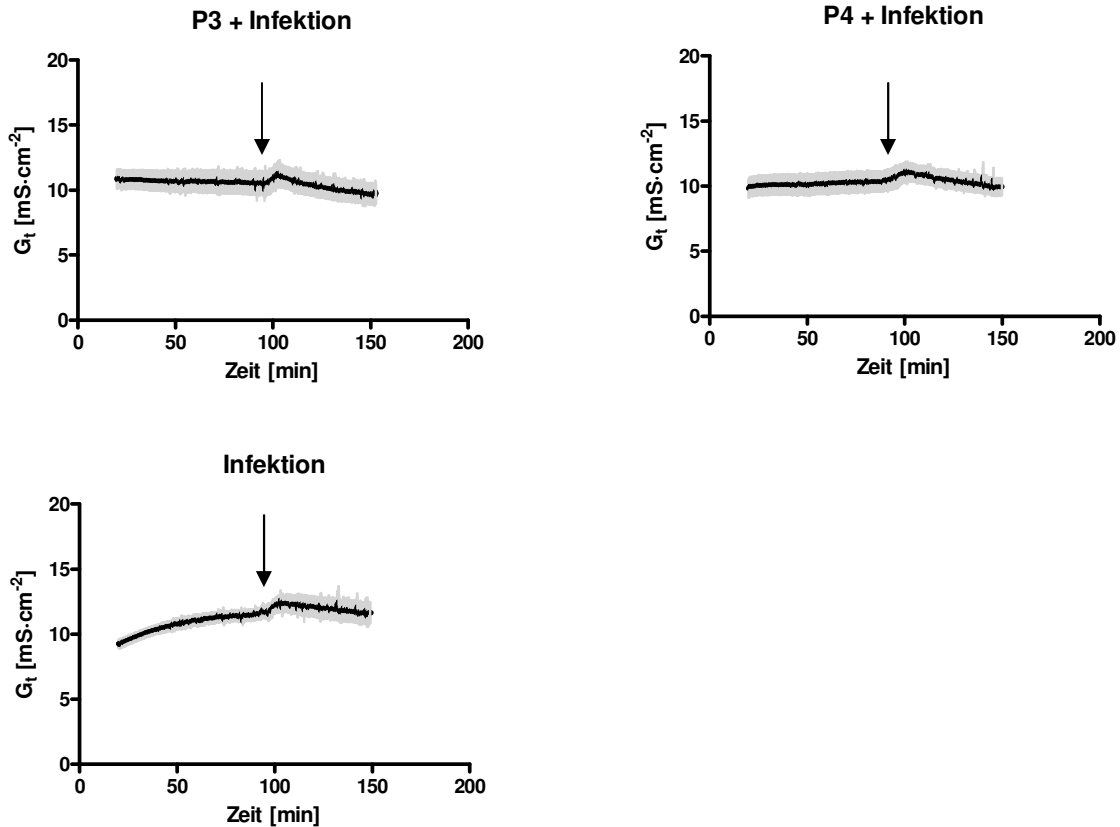
Im Vergleich der Zehn-Minuten-Werte innerhalb der Gruppen war kein Effekt der Zeit darstellbar. Die Gewebeleitfähigkeit lag kontinuierlich in allen Gruppen bei im Mittel 12 mS·cm<sup>-2</sup>.



**Abb. 41 Epithel-physiologische Versuche Kurzschlussstrom 4. VR**

Kurzschlussstrom  $I_{sc}$  [ $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ], die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von Forskolin.

Nach einer Inkubationszeit von ca. 50 Minuten erreichten in der vierten Versuchsreihe die eingespannten Gewebe einen stabilen Wert von 2 („P3 + Infektion“), 1,7 („P4 + Infektion“) bzw. 2,3 („Infektion“)  $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Alle Gewebe reagierten auf die Zugabe von Forskolin nach 95 Minuten mit einem raschen Anstieg des Kurzschlussstroms, die Unterschiede im sekretorischen Response („P3 + Infektion“:  $2,50 \pm 0,78$ , „P4 + Infektion“:  $1,85 \pm 1,16$ , „Infektion“:  $2,05 \pm 1,13$ ) waren nicht signifikant. Das Maximum des Anstiegs wurde nach ca. drei Minuten nach Zugabe registriert. Daraufhin fiel der Kurzschlussstrom kontinuierlich bis zum Versuchsende ab.



**Abb. 42 Epithel-physiologische Versuche Gewebeleitfähigkeit 4. VR**

Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  [ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ], die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von Forskolin.

Die Gewebeleitfähigkeit lag in allen drei Gruppen bei im Mittel 10 - 11  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Während die Gruppen „P3 + Infektion“ und „P4 + Infektion“ von Versuchsbeginn an konstante Werte zeigten, stieg die Gewebeleitfähigkeit der Gruppe „Infektion“ bis ca. 70 Minuten nach Versuchsbeginn leicht an. Es hatten jedoch alle Gruppen vor der Zugabe von Forskolin einen konstanten Level erreicht. Die Zugabe führte bei keiner der Gruppen zu einer signifikanten Änderung der Leitfähigkeit.

Ein Vergleich der Gruppen über die gesamte Versuchsdauer ergab zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede (Abb. 43).

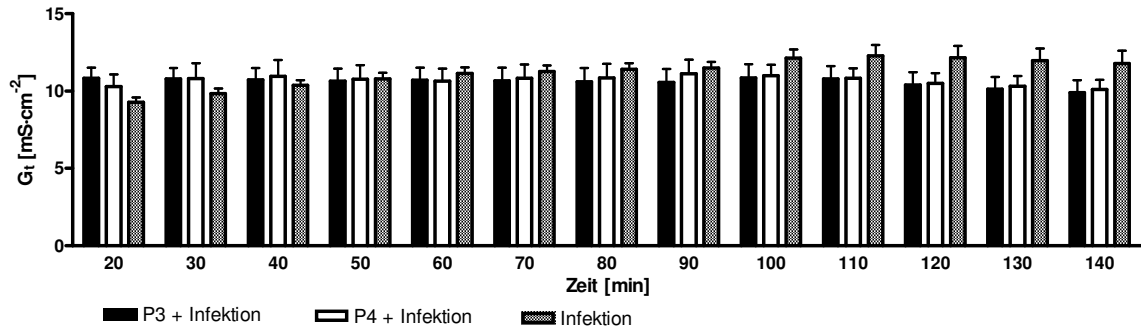


Abb. 43 Gewebeleitfähigkeit im Gruppenvergleich 4. VR

In den Gruppen „P3 + Infektion“ und „P4 + Infektion“ war kein Zeiteffekt zu beobachten. Die Gewebeleitfähigkeit in der Gruppe „Infektion“ stieg leicht an (Abb. 44). Dies deutet darauf hin, dass das eingespannte Gewebe während des mehr als zweistündigen Versuchs leichten Schaden genommen hat.

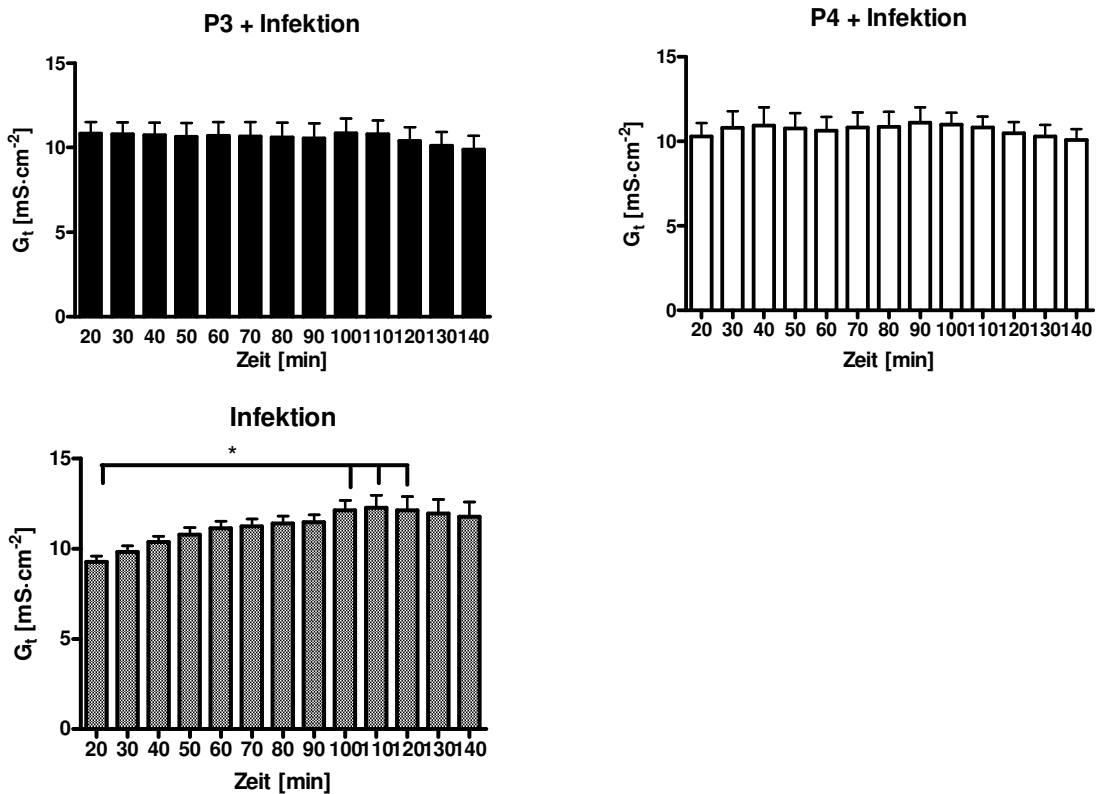
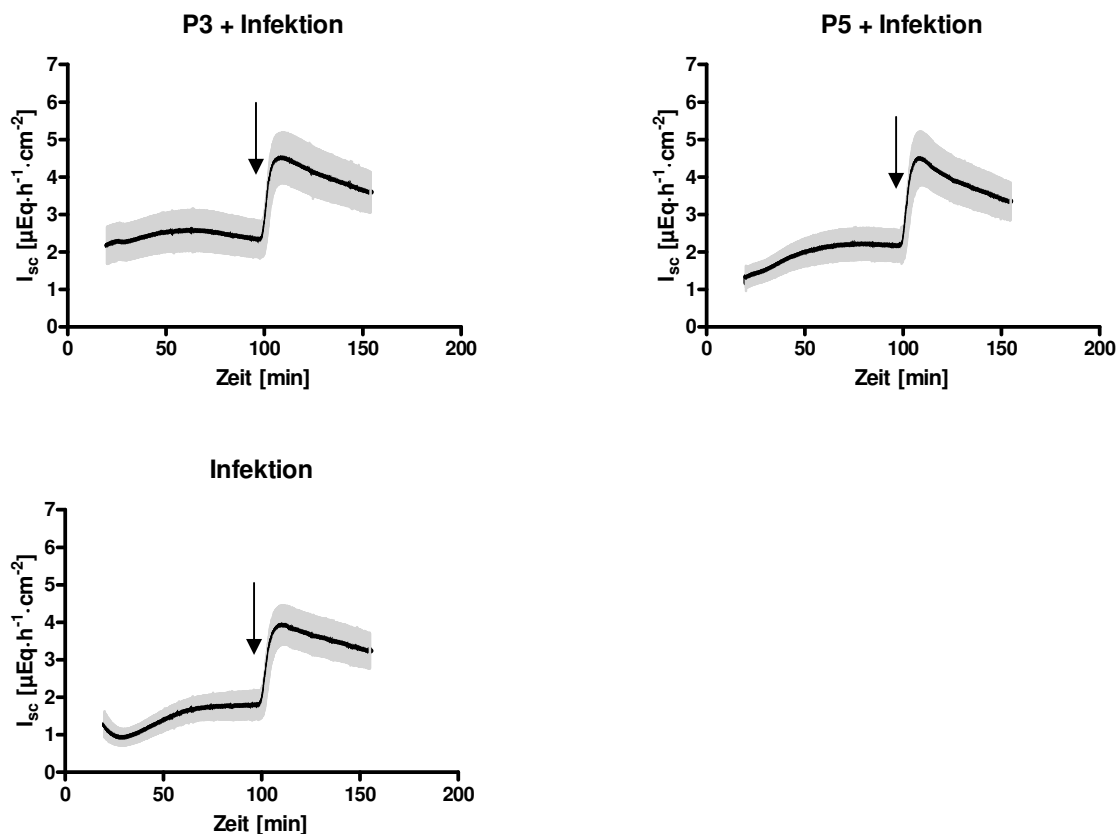


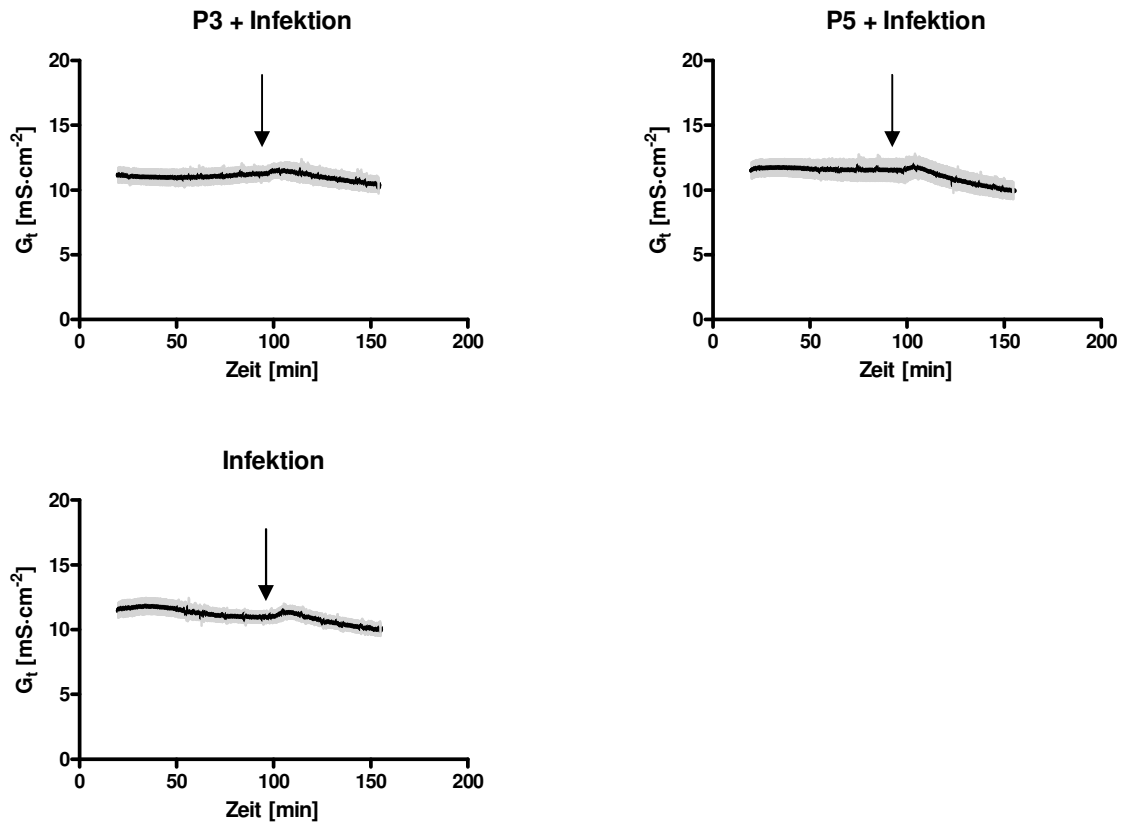
Abb. 44 Gewebeleitfähigkeit; Vergleich der Gruppen über die Zeit 4. VR

In der fünften Versuchsreihe (Abbildungen 45 bis 48) wurden die beiden Probiotika P3 und P5 im Vergleich mit einer lediglich infizierten Gruppe getestet. Bezüglich des Kurzschlussstroms erreichten ca. 70 Minuten nach Versuchsstart alle Gruppen konstante Werte von  $1,8 - 2,5 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die Zugabe von Forskolin nach 95 Minuten bewirkte einen starken Anstieg des Stroms, der sein Maximum innerhalb der ersten drei Minuten nach der Zugabe erreichte. Es ergaben sich im Vergleich zur Infektionsgruppe keine signifikanten Unterschiede der Gruppen „P3 + Infektion“ und „P5 + Infektion“ in Bezug auf den sekretorischen Response. Dieser betrug in der Gruppe „P3 + Infektion“  $2,23 \pm 0,68$ , in der Gruppe „P5 + Infektion“  $2,36 \pm 1,17$  und in der Gruppe „Infektion“  $2,19 \pm 0,56$ . Auf das innerhalb von drei Minuten erreichte Maximum des Kurzschlussstroms folgte ein kontinuierlicher Abfall bis zum Versuchsende.



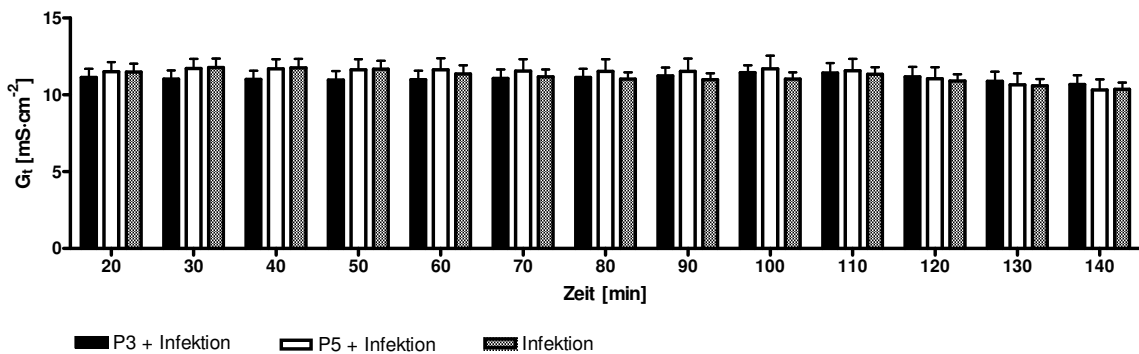
**Abb. 45 Epithel-physiologische Versuche Kurzschlussstrom 5. VR**

Kurzschlussstrom  $I_{sc}$  [ $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ], die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von Forskolin.



**Abb. 46 Epithel-physiologische Versuche Gewebeleitfähigkeit 5. VR**  
 Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  [mS·cm<sup>-2</sup>], die Pfeile kennzeichnen die Zugabe von Forskolin.

Die Gewebeleitfähigkeit der drei in dieser Versuchsreihe untersuchten Gruppen lag in allen Gruppen bei 11 mS·cm<sup>-2</sup>. Die Zugabe von Forskolin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Leitfähigkeit.



**Abb. 47 Gewebeleitfähigkeit im Gruppenvergleich 5. VR**

Zu keinem Zeitpunkt während des Versuchs traten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abb. 47).

Auch ein Zeiteffekt innerhalb der einzelnen Gruppen war nicht sichtbar (Abb. 48). So kann davon ausgegangen werden, dass die eingespannten Gewebe über den gesamten Versuchszeitraum intakt waren.

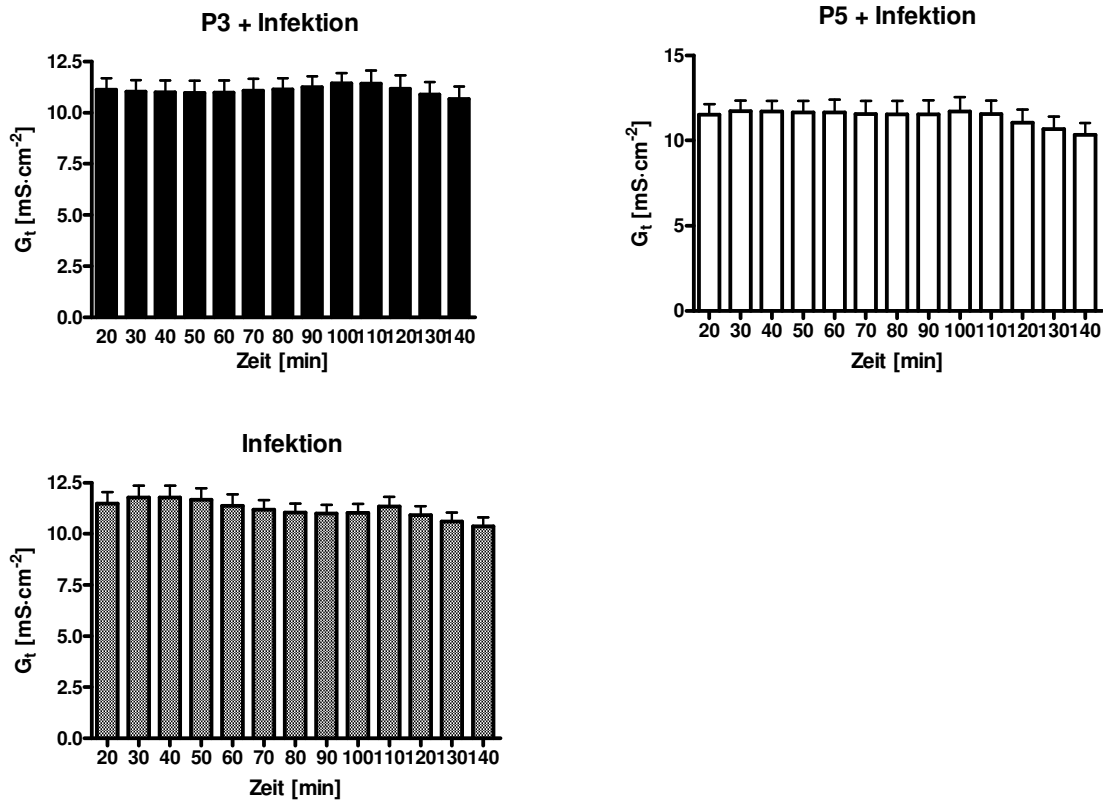


Abb. 48 Gewebeleitfähigkeit; Vergleich der Gruppen über die Zeit 5. VR



### 3.3.2 Unidirektionale Fluxraten

Mittels  $^3\text{H}$ -markiertem Mannit wurden in jeder Versuchsreihe unidirektionale Fluxraten ermittelt. Diese geben Hinweise auf die parazelluläre Permeabilität, da davon ausgegangen wird, dass Mannit auf Grund seiner Molekülgröße parazellulär transportiert wird. Pro Gruppe wurden acht bis neun Tiere untersucht, lediglich in der Kontrollgruppe der dritten Versuchsreihe standen nur fünf Tiere für die Ermittlung des  $J_{\text{ms}}$  zur Verfügung.

**Tab. 6 Unidirektionale Fluxraten von  $^3\text{H}$ -Mannit [ $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ]**  
zur Untersuchung der parazellulären Permeabilität

VR	Gruppe	$J_{\text{ms}}$	$J_{\text{sm}}$	$n^1$ ms/sm
1	Infektion	42,66 ± 1,90	45,45 ± 1,08	9 / 9
	Impfung + Infektion	52,95 ± 3,35 <sup>3</sup>	43,04 ± 1,07 <sup>3</sup>	8 / 9
	Kontrolle	40,71 ± 2,13	39,22 ± 1,19	8 / 9
2	Buttersäure-Glycerid + Infektion	36,89 ± 1,71	39,63 ± 0,81	9 / 9
	Infektion	50,88 ± 4,62 <sup>4</sup>	33,57 ± 1,12 <sup>4</sup>	8 / 9
	Kontrolle	39,01 ± 1,78	35,38 ± 1,62	8 / 9
3	Kontrolle	41,83 ± 3,51	35,14 ± 1,01	5 / 8
	Infektion	29,10 ± 2,02	28,91 ± 1,24	9 / 9
	P1 <sup>2</sup> + Infektion	31,22 ± 0,75	29,89 ± 0,93	9 / 9
	P2 <sup>2</sup> + Infektion	25,28 ± 1,30	27,06 ± 0,96	9 / 9
4	P3 <sup>2</sup> + Infektion	26,43 ± 1,39	24,64 ± 0,70	9 / 9
	P4 <sup>2</sup> + Infektion	24,80 ± 1,28	27,14 ± 1,01	9 / 9
	Infektion	26,49 ± 2,02	31,60 ± 0,99	9 / 9
5	P3 <sup>2</sup> + Infektion	30,55 ± 2,46	29,20 ± 0,96	9 / 9
	P5 <sup>2</sup> + Infektion	23,79 ± 0,83	31,95 ± 0,80	9 / 9
	Infektion	30,38 ± 1,04	26,84 ± 0,37	9 / 9

<sup>1</sup> n = Anzahl der Tiere

<sup>2</sup> P1 - P5: Probiotika 1-5

<sup>3, 4</sup> signifikante Unterschiede ( $J_{\text{ms}} \leftrightarrow J_{\text{sm}}$ )

Werte angegeben als Mittelwerte ± SEM

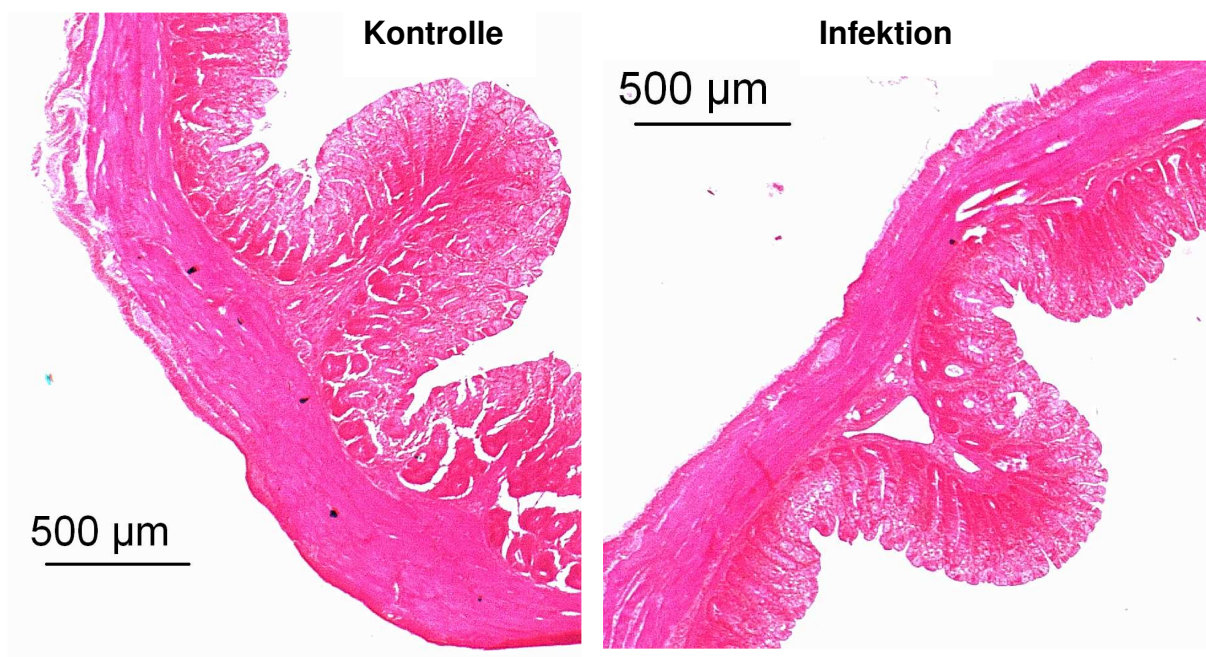
Um die Fluxraten zu ermitteln, wurden nach radioaktiver Markierung im Abstand von 10 Minuten 11 Proben entnommen, die im Szintillationszähler gezählt wurden. So konnten die Zerfälle (dpm) pro Minute bestimmt werden. Die Fluxraten von mukosal nach serosal und umgekehrt unterschieden sich lediglich in Ausnahmefällen

voneinander. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Werte werden angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Infektion mit Salmonellen keinen signifikanten Einfluss auf die parazelluläre Permeabilität hat.

### 3.4 Histologie

Bei der histologischen Untersuchung konnten bei 2 $\mu$ m dicken, HE-gefärbten Schnitten keine Unterschiede in der Beschaffenheit des Darmepithels zwischen infizierten und Kontrolltieren festgestellt werden. Auch die Epitheldicke und die Struktur der Zotten und Krypten gaben keine Hinweise auf Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Dementsprechend unterschieden sich auch die mit Probiotika gefütterten Gruppen nicht von den anderen. Daher kann keine Aussage über die Wirkung der eingesetzten Probiotika auf die Darmwand getroffen werden. Beispielhaft sind hier ein histologisches Bild eines Kontroll- und eines infizierten Tieres abgebildet.



## 4 Diskussion

Die vorliegende Studie untersucht erstmals zuvor in einem *in vitro*-Screening-Verfahren getestete Probiotika hinsichtlich ihrer Wirksamkeit *in vivo* bei experimentell mit *Salmonella enterica* infizierten Broilern. Im Gegensatz zu früheren Studien wurden probiotische Stämme eingesetzt, die sich in Hemmstofftests bereits als besonders geeignet für die Hemmung des Wachstums von Salmonellen erwiesen hatten.

Neben bakteriologischen und histologischen Untersuchungen wurden in elektrophysiologischen Versuchen Änderungen in Kurzschlussstrom und Gewebeleitfähigkeit bestimmt. Zudem wurde der parazelluläre Transportweg durch den Einsatz von <sup>3</sup>H-markiertem Mannit als Tracer beobachtet. So konnte auf verschiedenen Ebenen der Einfluss von Probiotika auf die gastrointestinale und systemische Besiedlung mit Salmonellen untersucht werden.

### 4.1 Die aviäre Darmflora

Der Gastrointestinaltrakt von Eintagsküken ist nach dem Schlupf steril. Die Etablierung der intestinalen Flora findet in den ersten 24 Stunden nach der ersten Futteraufnahme statt. In einer Studie von LEV und BRIGGS (1956) existierte keine graduelle Entwicklung einer adulten Flora nach der Fütterung in Bezug auf die absoluten Zahlen der vorherrschenden Bakterien. Proben aus dem Kropf und den Caeca waren bei zwei Tage alten Küken genauso stark besiedelt wie bei Tieren, die schon einen Monat alt waren. Die Darmflora von Eintagsküken (nach der ersten Fütterung) ist von besonderem Interesse, da sie die erste reife Population von intestinalen Mikroorganismen darstellt. Die Tiere in der vorliegenden Studie erhielten die probiotischen Futterzusatzstoffe in der ersten, zweiten und vierten Versuchsreihe jeweils vom ersten Lebenstag an, damit die erste Fütterung in die Zeit der Entwicklung der Darmflora fiel. Die Flora des Darmtraktes sollte vom ersten Lebenstag an beeinflusst werden, denn die komplexe Mikroflora im Gastrointestinaltrakt aller warmblütigen Tiere schützt diese effektiv gegen

Krankheiten. Die Komposition dieser protektiven Flora kann durch diätetische oder umweltbedingte Faktoren verändert werden (FULLER 1989). Daher ist diese Zeitspanne in der Entwicklung der Küken in Bezug auf die Besiedlung des Darms mit Bakterien besonders kritisch. Um allerdings mögliche negative Effekte auf die Entwicklung der natürlichen Darmflora wie eine eventuelle Verdrängung protektiver Stoffe zu vermindern, wurden in den Versuchsreihen drei und fünf die Probiotika erst ab dem siebten Lebenstag eingesetzt. Bei einem effektiv wirksamen Probiotikum hätte diese spätere Verabreichung zusätzlich den Vorteil des höheren wirtschaftlichen Profits, da die Küken in den ersten Lebenstagen kommerzielles Broilerfutter fressen könnten.

Im Darm gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Arten von Bakterienpopulationen. Die erste ist mit dem Darmepithel assoziiert, die zweite existiert frei im Darmlumen. Die Populationen, die sich selbst im Darmtrakt ansiedeln, können sowohl hilfreich als auch schädlich für den Gesamtorganismus sein. Sie sind nicht nur in der Lage, bestimmte Krankheitsbilder hervorzurufen, sondern auch in Konkurrenz um essentielle Nährstoffe zu treten (JERNIGAN et al. 1985). Diese Erkenntnisse können für die Entwicklung eines wirksamen Probiotikums von Bedeutung sein. Die Konkurrenz um Nährstoffe mit den zu eliminierenden Pathogenen könnte dazu führen, dass diese sich im Gastrointestinaltrakt nicht weiter ansiedeln. Die Krankheitserreger, im Fall dieser Studie die Salmonellen, würden somit ausgeschlossen.

Der Darm stellt ein offenes, interaktives ökologisches System dar, das viele mikrobielle Lebensräume bietet (SAVAGE 1977). Seine Mikroflora erfüllt eine Reihe von Funktionen: Sie erzeugt eine mikrobielle Barriere gegen pathogene Erreger, beeinflusst das darmassoziierte Immunsystem, fördert Stoffwechsel und Durchblutung, regt die Darmmotilität an, reduziert die bakterielle Translokation vom Darmlumen ins Lymphsystem und schließlich ist sie in der Lage, Vitamine zu produzieren (SAVAGE 1977; METHNER 2000). Die Effizienz der Darmflora als Barriere gegen pathogene und opportunistische Mikroorganismen ist erstaunlich

hoch, wenn man die großen Mengen an Bakterien bedenkt, die in den Gastrointestinaltrakt gelangen. Die meisten können sich dort nicht ansiedeln (HOLZAPFEL et al. 1998). Diese Barriereigenschaften sollen durch den Einsatz probiotischer Futterzusatzstoffe noch verbessert werden.

Die Zusammensetzung der Darmflora ist variabel und nicht leicht festzustellen. SALANITRO et al. (1974) haben allein aus der caecalen Mikroflora von fünf Wochen alten Broilern 325 Bakterienstämme isoliert. 77% dieser Stämme bestanden aus strikt anaeroben Bakterien (gram-negative, pleomorphe Kokken (5,2%), Peptostreptococcus (1,5%), gram-positive Stäbchen (36,1%, *Propionibacterium acnes* und *Eubacterium* spp.), gram-negative Stäbchen (18,6%, *Bacterioides clostridiiformis*, *B. hypermegas* und *B. fragilis*) und sporenbildende Bakterien (15,7% *Clostridium* sp.). Zudem wurden zwei Typen von fakultativ anaeroben Bakterien isoliert: gram-positive Kokken und *E. coli* (17,5% der verbleibenden Flora). Neben externen Einflüssen wie Haltung und Fütterung spielt laut ZOETENDAL et al. (1998) der Genotyp des Individuums eine Rolle im Hinblick auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora.

### 4.2 Probiotika

Bei den in dieser Studie eingesetzten Probiotika handelte es sich um Stämme der Gattung *Lactobacillus* sowie *Bacillus cereus* var. *toyoi*. Die probiotischen Futterzusatzstoffe sowie das in einer Versuchsreihe eingesetzte Buttersäure-Glycerid wurden in Pulverform hergestellt. Dieses Pulver ließ sich leicht in kommerzielles Broilerfutter einmischen und wurde von den Tieren bereitwillig aufgenommen. Eine tägliche individuelle Verabreichung mittels oraler Applikation hätte einen großen Stressfaktor für die Tiere dargestellt und wurde daher nicht gewählt. Durch die gegebene unterschiedliche Wasserlöslichkeit der Zusatzstoffe wäre eine gleichmäßige Verabreichung bei einer Mischung in das Trinkwasser nicht gesichert gewesen. Daher wurden alle Probiotika sowie das Buttersäure-Glycerid über das Futter verabreicht. Die einzelnen Probiotika werden in der Beschreibung der jeweiligen Versuchsreihen behandelt.

### 4.3 Salmonellen

Salmonellen sind enterische Pathogene, die vor 120-160 Millionen Jahren aus dem Genus *Escherichia* entstanden (COTTER u. DIRITA 2000). Benannt wurden sie nach dem Biologen Daniel Elmer Salmon (1850-1914), der sie 1885 zum ersten Mal isolierte. Diese gram negativen Keime zählen zur Familie der Enterobacteriaceae. Sie zeichnen sich in Form opportunistisch intrazellulärer Pathogene durch eine Vielzahl von Virulenzgenen aus (VAN IMMERSEEL et al. 2006). Die überwiegend beweglichen, 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm großen Stäbchenbakterien sind in der Lage, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, H<sub>2</sub>S zu bilden, Propylenglykol abzubauen und Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwenden. Von diagnostischer Bedeutung sind der fehlende Laktoseabbau und die fehlende Hämolyse auf Blutagar (ROLLE u. MAYR 2002). Die an den Menschen angepassten Vertreter *Salmonella typhi* und *Salmonella paratyphi* sind für Tiere nicht von Bedeutung. Beim Menschen hingegen lösen sie Typhus und Paratyphus aus. Anders verhält es sich mit an bestimmte Tierarten angepassten Salmonellen wie *Salmonella dublin* (Rind), *Salmonella cholerasuis* (Schwein), *Salmonella gallinarum* (Huhn), *Salmonella abortusequi* (Pferd) oder *Salmonella abortusovis* (Schaf), die bei diesen Tieren seuchenhafte Krankheitsverläufe verursachen können, beim Menschen allerdings nur selten infektiös sind. Mehr als 2000 weitere Serovare zeigen keine Anpassung an bestimmte Tierarten und verhalten sich nicht invasiv (ROLLE u. MAYR 2002).

### 4.4 Infektionsmodell

Die Empfänglichkeit von Küken für Salmonellen nimmt mit steigendem Alter ab (METHNER 2000). Am 13. Lebenstag wurden in dieser Studie die Küken mit 10<sup>9</sup> KbE *Salmonella Enteritidis* (Versuchsreihen 1-4) bzw. *Salmonella Infantis* (Versuchsreihe 5) direkt in den Kropf infiziert. Dadurch wurde sichergestellt, dass jedes Tier dieselbe Menge an Salmonellensuspension bekam. Bei frisch geschlüpften Tieren führte in einer Studie von METHNER et al. (1995) bereits eine Infektionsdosis von 10<sup>2</sup> KbE zu einer kontinuierlichen Infektion, wohingegen bei acht Tage alten Vögeln eine höhere

Dosis nötig war. Diese Beziehung zwischen Alter und Dosis stellten auch schon MILNER und SHAFFER (1952) fest.

Die Küken in dieser Studie wurden oral infiziert, da dies die physiologische Route einer Salmonelleninfektion ist. Eine parenterale Applikation wäre zwar möglich gewesen, hätte jedoch zu einer anderen Pathogenese und eventuell zu einer höheren Morbidität geführt (BARROW et al. 1987; RAO u. CHAUHAN 1987).

Das Infektionsmodell erwies sich als geeignet, da bis zu 100% der zuvor Salmonellen-negativen Tiere nach der Infektion Salmonellen ausschieden. Dies wurde durch die Kloakentupferproben gezeigt.

### 4.5 Gewichtsentwicklung

Der Geflügelfleischkonsum hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Daher ist es von besonderer Bedeutung in der Geflügelzucht, das Wachstum zu intensivieren. Broiler sind in fünf bis sechs Wochen ausgemästet und ihr Schlachtkörper zeichnet sich durch einen relativ hohen Eiweißgehalt bei geringem Fettgehalt aus. Da Fett einen sehr hohen Brennwert hat (37 MJ/kg), wird es in der Broilermast zur Steigerung der Wachstumskapazität eingesetzt (BICKEL et al. 2001). ENSMINGER et al. (1990) und KIRCHGESSNER (1997) empfehlen 4-6% Fettanteil im Futter. Der Bedarf der Tiere ist bereits mit 3-5% gedeckt. In einer Studie von BICKEL et al. (2001) hatte der Einsatz von tierischem Fett einen positiven Einfluss auf die Mastleistung der Broiler. In der vorliegenden Studie wurden dem Futter keine zusätzlichen Fette zugefügt. Das könnte dazu beigetragen haben, dass die Tiere im Allgemeinen etwas leichter waren (zwischen 600 und 1100g am 28./29. Lebenstag) als in der konventionellen Mast (bis zu 1500g am 29. Lebenstag) (AVIAGEN 2007). ENGBERG et al. konnten zeigen, dass die Futterpartikelgröße Einfluss auf das Wachstum und die Futtermittelverwertung von Broilern hat. Die Fütterung von pelletiertem Futter erhöhte diese Faktoren. Das in der vorliegenden Studie eingesetzte Futter war aus Produktionsgründen nicht pelletiert, was zu den leicht verminderten Gewichtszunahmen der Broiler geführt haben könnte. Experimente mit Schweinen wiesen auf eine Verbindung zwischen dem Einsatz pelletierter Futtermittel und dem

Auftreten von Infektionen mit Salmonellen hin. Diese könnten auf eine Veränderung in der intestinalen mikrobiellen Zusammensetzung nach der Aufnahme der Pellets zurückzuführen sein (JORGENSEN et al. 1999) zitiert nach (ENGBERG et al. 2002). Darin könnte ein Vorteil des nicht pelletierten Futters gesehen werden.

### 4.6 Prinzip der Ussing-Kammer-Technik

Von neun Tieren pro Gruppe wurde in jeder Versuchsreihe Caecumgewebe mittels Ussing-Kammer-Technik untersucht. Diese Technik wurde ursprünglich für transportphysiologische Untersuchungen an der Froschhaut entwickelt (USSING u. ZERAHN 1951). Heute können unter anderem unidirektionale Fluxraten von mukosal nach serosal ( $J_{ms}$ ) und von serosal nach mukosal ( $J_{sm}$ ) mit Hilfe von Radioisotopen gemessen werden. Die Erfassung des Kurzschlussstroms  $I_{sc}$  (Maß für elektrogene Transportvorgänge) und der Gewebeleitfähigkeit  $G_t$  (Maß für den elektrischen Widerstand des Gewebes) lässt Rückschlüsse auf die Integrität und Vitalität des eingesetzten Gewebes zu.

Die Zugabe von Forskolin führte zu einer Steigerung des Kurzschlussstroms. In Ussing-Kammer-Experimenten wird Forskolin eingesetzt, um einen sekretorischen Response, definiert als maximale Zunahme des Kurzschlussstroms nach Forskolinzugabe, zu induzieren. Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase auf direktem Weg, indem es mit der katalytischen Untereinheit interagiert (GREGER u. WINDHORST 1996) und so die cAMP-vermittelte Chloridsekretion stimuliert. Bei vitalem Gewebe führt dies zu einer raschen Steigerung des Kurzschlussstroms (BROWN et al. 1990; HEMPE 2007). So konnte diese Zugabe außerdem genutzt werden, um die Vitalität des eingespannten Gewebes sicherzustellen.

In dieser Studie wurde neben Forskolin keine weitere Substanz zugegeben. Dieses Vorgehen wurde zugunsten der Untersuchung der  $^3\text{H}$ -Mannit-Fluxraten gewählt. So konnten im 10-Minuten-Takt Proben entnommen werden, aus denen die unidirektionalen Fluxraten berechnet wurden. Diese geben Hinweise auf einen Einfluss der Salmonellen und der Probiotika auf die parazelluläre Permeabilität. In elektrophysiologischen Untersuchungen, die nicht mit der Bestimmung



unidirektionaler Fluxraten gekoppelt sind, folgt im Allgemeinen auf jede Zugabe eine Inkubationszeit von bis zu 30 Minuten, bevor eine neue Substanz eingesetzt wird. Die Darmwand der Broiler, die zum Untersuchungszeitpunkt erst 2-3 Wochen alt waren, konnte jedoch nur 2-2,5 Stunden für die Untersuchungen genutzt werden. Danach erhöhten sich in Vorversuchen die Gewebeleitfähigkeiten erheblich, da das Gewebe nicht mehr intakt war. Daher war die Versuchsdauer auf zwei Stunden beschränkt, sodass keine weitere Substanzzugabe erfolgen konnte.

Mittels der Ussing-Kammer-Technik konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Infektion mit Salmonellen keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe des Kurzschlussstroms sowie der Gewebeleitfähigkeit hat. Dies steht im Kontrast zu der Ausgangshypothese, dass Salmonellen diese Parameter beeinflussen können. Allerdings wurden in dieser Studie nur zwei Serovare in jeweils einer Konzentration eingesetzt, um reproduzierbare Basiswerte für die Untersuchung der verschiedenen Probiotika zu gewährleisten. Höhere Dosierungen dieser oder anderer Serovare hätten unter Umständen zu einer deutlichen Beeinflussung des Kurzschlussstroms und der Gewebeleitfähigkeit geführt.

### **4.7 Untersuchung der parazellulären Permeabilität**

Aufgrund seiner Molekülgröße wird Mannit parazellulär transportiert (FAVUS u. ANGEID-BACKMAN 1984). Daher wurde es in dieser Studie in  $^3\text{H}$ -markierter Form als Tracer für den parazellulären Transport verwendet. So konnte überprüft werden, ob diese sich durch die Infektion mit Salmonellen verändert. Die Messungen der unidirektionalen Fluxraten ergaben annähernd gleiche Werte für den unidirektionalen Flux von serosal nach mukosal ( $J_{sm}$ ) sowie den von mukosal nach serosal ( $J_{ms}$ ) in allen Versuchsreihen. Daraus lässt sich ableiten, dass alle eingespannten Darmstücke intakt waren und keine Löcher aufwiesen. Es traten nur wenige signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Fluxrichtungen auf. Daher sind diese Unterschiede vermutlich eher auf ein Solvent-Drag-Phänomen zurückzuführen, da gelöste Substrate nach einer Änderung des osmotischen Gradienten dem Wasser durch die Membran folgen.

Die Infektion mit Salmonellen hatte keine Änderungen der unidirektionalen Fluxraten zur Folge. Somit ergeben sich keine Hinweise auf eine Beeinflussung des parazellulären Transportweges durch die Infektion. Auch die Verabreichung der probiotischen Futterzusatzstoffe hatte keinen Einfluss auf dieses Transportsystem (siehe Kapitel 4.11-4.15).

### **4.8 Bakteriologische Untersuchungen**

Tupferproben in zeitlichen Abständen von zwei bis drei Tagen gaben einen Überblick über die Dauer und Intensität der Ausscheidung der Infektionsstämme. Bevor die Tiere infiziert wurden, erwiesen sich alle als Salmonellen-negativ. Dies war eine Grundvoraussetzung für die Auswertung der gesamten Versuchsreihen. Die Salmonellenfreiheit wurde durch eine Sammelkotprobe bei der Einstallung sowie eine Tupferprobe von zehn Tieren pro Gruppe sechs Tage vor der Infektion gewährleistet. Parallel zur Ermittlung der Kolonie-bildenden Einheiten pro Milliliter wurde eine Objektträgerschnellagglutination zur Absicherung der Ergebnisse vorgenommen. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer Zusammenballung antigener Partikel durch die Antigen-Antikörper-Reaktion (ROLLE u. MAYR 2002).

Für die Isolierung der Salmonellen wurde als Selektivnährboden BPLS-Agar verwendet (LMBG). Um nicht durch extensives Wachstum von coliformen Keimen das Erkennen von Salmonellen zu erschweren, wurde dem Nährboden Nalidixinsäure (100mg/l) zugesetzt. Die eingesetzten Salmonellen waren gegen dieses Antibiotikum resistent und konnten so ungehindert wachsen. Die Platten wurden jeweils 24 Stunden bebrütet.

Da Leber- und Milzproben in einer Studie von METHNER et al. (1995) sehr ähnliche Ergebnisse erzielt hatten, wurden in dieser Studie nur Proben aus der Leber bakteriologisch untersucht.

In den zwei ersten Versuchsreihen lagen die Werte der bakteriologischen Untersuchungen der Caeca und Lebern niedriger als in den folgenden. Das

angewendete Infektionsmodell scheint – obwohl es nicht verändert wurde – in den letzten drei Versuchsreihen effektiver gewirkt zu haben. Alle bakteriologischen Untersuchungen wurden im Hinblick auf statistische Sicherheit in der Auswertung im Doppelansatz durchgeführt.

### 4.9 Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen zeigten in der HE-Färbung keine Unterschiede in der Beschaffenheit des Caecumgewebes zwischen den infizierten und den Kontrolltieren. Die eingesetzten Salmonellen scheinen keinen maßgeblichen Einfluss auf die Beschaffenheit des Gewebes zu haben. Daher konnten auch keine Effekte der probiotischen Behandlung erfasst werden. Diese Beobachtung lässt sich mit den fehlenden klinischen Symptomen der Küken und den Ergebnissen aus den Ussing-Kammer-Versuchen und den bakteriologischen Untersuchungen vereinbaren.

### 4.10 Versuchsreihe 1

#### 4.10.1 Versuchsaufbau und eingesetzte Futterzusatzstoffe

Die erste Versuchsreihe diente in erster Linie der Etablierung der verschiedenen Methoden. Dazu wurde eine Impfung (TAD Salmonella vac E) im Vergleich zur Infektion und einer Kontrolle getestet. Es ist bekannt, dass die Impfung beim Geflügel einen erfolgreichen Schutz gegen eine Salmonelleninfektion bietet (COOPER et al. 1990; LUDWIG u. CALSOW 1992; COOPER et al. 1993; HASSAN u. CURTISS 1997). COOPER et al. (1990) zeigten, dass eine orale Impfung mit dem Lebendimpfstoff Aro<sup>-</sup> *S. enteritidis* Eintagsküken gegen eine Infektion mit virulenten *S. enteritidis* schützen kann. Die Küken in dieser Studie wurden am ersten Lebenstag oral mittels Kropfinstillation geimpft. Sie erhielten eine Impfdosis von  $10^8$  KbE. Laut Hühnersalmonellen-Verordnung (2009) ist die Impfung gegen *Salmonella Enteritidis* und *Salmonella Typhimurium* in Beständen ab einer bestimmten Betriebsgröße

vorgeschrieben. Es werden vor allem Lebendimpfstoffe eingesetzt, um die fakultativ intrazellulären Bakterien zu erreichen.

In dieser Versuchsreihe wurden keine probiotischen Futterzusatzstoffe eingesetzt.

### 4.10.2 Epithel-physiologische Versuche

Durch die Zugabe von Forskolin wurde ein sekretorischer Response erzeugt, der sich in einem Anstieg des Kurzschlussstroms äußerte. Dieser Anstieg unterschied sich in seiner Ausprägung jedoch nicht signifikant zwischen den Gruppen. Ein stark erhöhter sekretorischer Response in einer der Gruppen hätte auf eine vermehrte Aktivierung des Chlorid-Systems hingedeutet. Dies könnte *in vivo* zu einer sekretorischen Diarrhoe führen. Die Tiere dieser Versuchsreihe zeigten jedoch keine Anzeichen einer Diarrhoe, wodurch die Ergebnisse der epithel-physiologischen Versuche mit dem klinischen Erscheinungsbild der Küken vereinbar sind. Denn in dieser Versuchsreihe ergaben sich keine Unterschiede zwischen infizierten, geimpften und Kontrolltieren.

Die Mannit-Fluxraten wiesen bis auf eine Ausnahme (Gruppe „Impfung + Infektion“) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Fluxrichtungen ( $J_{ms}$  und  $J_{sm}$ ) auf. Dies zeigt die Integrität des Gewebes. Hochgradig unterschiedliche Fluxraten weisen auf mangelnde Integrität des Epithels hin, die durch mechanische Beanspruchung beim Einspannen oder durch den Einfluss einer Infektion bedingt sein könnten. Es ist in diesem Fall nicht davon auszugehen, dass die Infektion mit Salmonellen oder die Impfung einen Einfluss auf die parazelluläre Permeabilität haben.

Die Gewebeleitfähigkeit unterschied sich weder zwischen den Gruppen noch innerhalb der Gruppen über die Zeit signifikant. Eine erhöhte Leitfähigkeit hätte wiederum auf eine mangelnde Integrität des Gewebes hingewiesen. Verändert sich die Leitfähigkeit zum Ende des Versuches hin deutlich, ist der Versuch abubrechen, da das Epithel nicht mehr intakt ist und die Messdaten nicht aussagekräftig sind. In

dieser Versuchsreihe blieben die Leitfähigkeiten jedoch bis zum Versuchsende konstant.

### **4.10.3 Bakteriologische Untersuchungen**

Bei der quantitativen bakteriologischen Untersuchung wiesen alle Proben aus dem Caecumgewebe eine deutliche Besiedlung mit Salmonellen auf, allerdings traten keine signifikanten Unterschiede zwischen ausschließlich infizierten und zusätzlich geimpften Tieren auf. Die Leberproben der geimpften und zudem infizierten Gruppe in dieser Versuchsreihe wiesen signifikant niedrigere Keimzahlen auf als die der infizierten Gruppe. Dies zeigt, dass der eingesetzte Impfstamm in diesem Organ einen Einfluss auf die Translokation der Salmonellen hat.

Die Tupferproben der Kontrollgruppe waren zu jedem Probenzeitpunkt (-6, 2, 5, 8 dpi) negativ. Die Gruppen „Infektion“ und „Impfung und Infektion“ zeigten eine Besiedlung des Darms nach der Infektion. Acht Tage nach der Infektion wurden in dieser Versuchsreihe keine Salmonellen mehr ausgeschieden. Die Besiedlung mit Salmonellen lag in dieser Versuchsreihe bei nur 10 - 40% der Tiere. Vermutlich ist dieser relativ geringe Prozentsatz infizierter Tiere darauf zurückzuführen, dass einige Tiere nicht die gesamte Infektionsdosis geschluckt haben. In den folgenden Versuchsreihen wurde bei der Verabreichung verstärkt darauf geachtet, dass die Küken die gesamte Menge schluckten. Vor allem in den Versuchsreihen 3-5 wurden sehr gute Infektionsraten von bis zu 100% erreicht.

## **4.11 Versuchsreihe 2**

### **4.11.1 Versuchsaufbau und eingesetzte Futterzusatzstoffe**

In der zweiten Versuchsreihe wurde der Effekt eines Buttersäure-Glycerids (Gemisch aus Mono-, Di- und Triglyceriden) gegen eine Salmonelleninfektion (*Salmonella Enteritidis*) getestet. Zur Konservierung von Futtermitteln für den Einsatz bei

Nutztieren werden verschiedene Säuren eingesetzt (KOCH 2005; ROTH u. ETTLE 2005). Daher wäre es bei einem kommerziellen Einsatz des in dieser Studie getesteten Buttersäure-Glycerids durchaus möglich, diesen Futterzusatzstoff kostengünstig in Broilerfutter einzumischen. Kurzkettige Fettsäuren wurden schon in der Vergangenheit als Futterzusatzstoffe zur Prävention von Salmonelleninfektionen bei verschiedenen Zielspezies eingesetzt. LARDON et al. (2007) präsentierten eine starke Reduktion der *Salmonella Typhimurium*-Exkretion durch die Verabreichung von ummantelter Buttersäure bei Schweinen. VAN IMMERSEEL et al. (2005; 2006) zeigten, dass die caecale Besiedlung mit *Salmonella Enteritidis* bei Hühnern durch die Behandlung mit ummantelter Buttersäure signifikant gesenkt werden konnte. So wurden auch die fäkale Ausscheidung und somit die Kontamination der Umwelt der Broiler vermindert.

Allerdings besiedeln Salmonellen vor allem die Blinddärme (DESMIDT et al. 1997), während Säuren über das Futter oder Trinkwasser verabreicht oft nur im oberen Gastrointestinaltrakt Wirkung zeigen können, da sie im weiteren Verlauf resorbiert werden. Möglicherweise trat diese Problematik auch in dieser Versuchsreihe auf. Das eingesetzte Buttersäure-Glycerid hat wahrscheinlich die Caeca gar nicht erreicht, da es vorher resorbiert wurde, und demnach konnten auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen dargestellt werden.

In Fermentationstests wurde in einer Studie von BJERRUM et al. (2006) gezeigt, dass die meisten aus dem Ileum und den Caeca entnommenen Proben Ameisen-, Essig- und Buttersäure produzieren konnten. Die häufig isolierten *F. prausnitzii*-Stämme waren die einzigen, die Buttersäure herstellen konnten. So vermuten die Autoren, dass beträchtliche Mengen an Butyrat im Ileum und den Caeca produziert werden. CORRIER et al. (1990) verabreichten Broilern Laktose, was zu einer erhöhten Konzentration von flüchtigen Fettsäuren führte. Diese wirkten bakteriostatisch auf Salmonellen. Demnach wäre es auch möglich, nicht die Säuren direkt zu verabreichen, sondern ihre Entstehung am Zielort zu fördern.

Um die Absorption der Säuren im oberen Gastrointestinaltrakt (GIT) zu verhindern und die Freisetzung im unteren GIT zu gewährleisten, haben Forschungsgruppen versucht, diesen Transport durch Mikro-Einkapselung zu gewährleisten. Van IMMERSEEL et al. (2004c) zeigten, dass ummantelte Buttersäure ummantelter Ameisensäure und Essigsäure in Bezug auf die Kontrolle der Salmonellenbesiedlung überlegen war. In einer anderen Studie ergab der Vergleich zwischen ummantelter und in Puderform (0,63 g/kg Buttersäure) mit gleichem Versuchsprotokoll eine verminderte Besiedlung der Caeca bei der ummantelten Buttersäure, nicht jedoch bei der Puderform (VAN IMMERSEEL et al. 2005). Die Mikro-Einkapselung ist demnach ein möglicher weiterer Ansatzpunkt bei der Entwicklung wirksamer Buttersäure-Präparate, der aber in dieser Studie nicht weiter verfolgt wurde.

### **4.11.2 Epithel-physiologische Versuche**

Die epithel-physiologischen Experimente in dieser Versuchsreihe ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit dem Buttersäure-Glycerid gefütterten, infizierten und Kontrolltieren. Wie auch in der ersten Versuchsreihe zeigten die Küken keine Anzeichen einer klinischen Infektion.

In dieser Versuchsreihe traten bis auf die infizierte Gruppe in keiner Gruppe signifikante Unterschiede zwischen den unidirektionalen Fluxraten von serosal nach mukosal ( $J_{sm}$ ) und mukosal nach serosal ( $J_{ms}$ ) auf. Daher ist von einer über die gesamte Zeit der Probennahmeperiode andauernden Integrität des eingespannten Epithels auszugehen. Desweiteren ergaben sich keine Hinweise auf Änderungen der parazellulären Permeabilität.

Die Gewebeleitfähigkeiten unterschieden sich lediglich zu Beginn des Versuches. Im weiteren Verlauf traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten auf. Diese Ergebnisse passen in das Bild der anderen Methoden. Die Infektion hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Gewebeleitfähigkeit und so konnten auch keine Veränderungen durch die Zufütterung von Buttersäure-Glycerid erzielt werden.

### **4.11.3 Bakteriologische Untersuchungen**

Bei der quantitativen bakteriologischen Untersuchung zeigten sich in den Proben aus den Caeca weitaus höhere Kolonisationswerte als in den Leberproben, da die Blinddärme den Hauptlokalisationsort für Salmonellen darstellen. Vom Gastrointestinaltrakt aus können sich invasive Salmonellen-Stämme im gesamten Organismus ausbreiten und die inneren Organe, so auch die Leber, erreichen.

Die Tupferproben zeigten eine Salmonellenfreiheit der Kontrolltiere zu jedem Untersuchungszeitpunkt. Die anderen Gruppen wiesen deutliche Infektionsraten auf. Diese Ergebnisse zeigen ein deutliches Ansprechen der Tiere auf den Infektionsstamm bei vorhergehender Salmonellenfreiheit.

## **4.12 Versuchsreihe 3**

### **4.12.1 Versuchsaufbau und eingesetzte Futterzusatzstoffe**

In der dritten Versuchsreihe wurden die beiden Probiotika P1 und P2 eingesetzt und mit den Gruppen „Infektion“ und „Kontrolle“ verglichen. Die hier eingesetzten Probiotika bestanden aus demselben *Lactobacillus*-Stamm und unterschieden sich lediglich in ihrer Konzentration im Futter (P1: 2 mg/kg, P2: 0,5 mg/kg). Dadurch sollte die Dosisabhängigkeit einer möglichen „protektiven“ Wirkung des probiotischen Stammes geprüft werden. Diese sollte vor allem aus wirtschaftlichen Gründen so gering wie möglich, jedoch so hoch wie nötig sein.

Laktobazillen können große Mengen an Laktat aus einfachen Kohlenhydraten produzieren und einem hohen Säuregrad standhalten, der für andere Bakterien meist tödlich ist (JERNIGAN et al. 1985). Bei der Futterherstellung werden die einzelnen Komponenten hohen Temperaturen und niedrigen pH-Werten ausgesetzt, die Laktobazillen überstehen können. Diese Eigenschaft birgt einen großen Vorteil der Milchsäurebakterien und macht sie so zu einem vielversprechenden Kandidaten in der Entwicklung eines gegen Salmonellen wirksamen Probiotikums. JIN et al. (1996) verglichen in einer Studie zwölf verschiedene *Lactobacillus*-Stämme aus dem



Hühnerdarm, die eine ausgeprägte oder geringe Fähigkeit besaßen, sich *in vitro* an die ilealen Epithelzellen anzuheften. Inhibitorische Effekte dieser Stämme gegen fünf *Salmonella*-Stämme wurden getestet. Alle 12 *Lactobacillus*-Isolate konnten das Wachstum der Salmonellen hemmen.

Das Ileum der von BJERRUM et al. (2006) untersuchten konventionellen Broiler war vor allem von Laktobazillen besiedelt, während die Caeca eine größere mikrobielle Diversität aufwiesen. Sie wurden von einer großen Gruppe unbekannter Bakterien dominiert, die mit *Faecalibacterium prausnitzii* eng verwandt waren. Daher sind Laktobazillen, wenn sie die Caeca erreichen, einer großen Zahl unterschiedlicher Bakterien ausgesetzt, die zum Teil in Konkurrenz mit ihnen stehen.

Im Vorfeld der vorliegenden Studie wurden alle eingesetzten Probiotika auf ihre *in vitro*-Effektivität von der Firma Organobalance, Berlin, getestet. Nur die Stämme mit der stärksten Hemmwirkung gegen Salmonellen kamen zum Einsatz. Auch JACOBSEN et al. (1999) testeten 47 zum Teil kommerziell erhältliche *Lactobacillus*-Stämme *in vitro* auf ihre Fähigkeit, das Wachstum anderer Bakterien zu hemmen. Die Mehrzahl der eingesetzten Stämme zeigte sich in der Lage, *Yersinia enterocolica* (46 Stämme) und *Bacillus cereus* (37 Stämme) zu hemmen. Nur wenige wirkten gegen *Staphylococcus aureus* und *Salmonella typhimurium*.

Die Kombination aus Laktose und *Lactobacillus acidophilus* und Laktose allein reduzierten in einer Studie von QIN et al. (1995) signifikant die Population von *Salmonella Enteritidis* in den Caeca von mit *Eimeria tenella* infizierten Hühnern. Die Kombination erwies sich als effektiver als Laktose allein. Der Zusatz einer anaeroben Kultur von *Lactobacillus acidophilus* allein reduzierte die Population von *Salmonella Enteritidis* in den Caeca nicht signifikant. Die Gabe eines aus 11 LAB-Stämmen bestehenden Probiotikums eine Stunde nach der Infektion reduzierte in einer Studie von HIGGINS et al. (2007) das Vorkommen von *Salmonella Enteritidis* (60-70% Reduktion) oder *Salmonella Typhimurium* (89-95% Reduktion) in den Caecaltonsillen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich verminderte die Gabe der *Lactobacillus*-Kultur eine Reduktion der caecalen *Salmonella Enteritidis*-Anreicherung um mehr als

$2,9 \log_{10}$ . Das Probiotikum verminderte nicht nur die Inzidenz Salmonella-positiver Hühner sondern reduzierte auch die Infektionslevel der infizierten Tiere. In der vorliegenden Studie wurden keine Kombinationspräparate eingesetzt, um das Risiko des Auftretens von unerwünschten Effekten so gering wie möglich zu halten. Prinzipiell kann jedes lebende Bakterium, das unter den im Wirt vorherrschenden Bedingungen überleben kann, eine Infektion auslösen. Dies trifft auch auf Laktobazillen zu, auch wenn sie generell als sicher angesehen werden (OUWEHAND et al. 1999). Milchsäurebakterien gehören zur normalen Darmflora und werden daher vom Körper nicht als Fremdstoffe identifiziert. Aufgrund dessen sind Unverträglichkeiten relativ selten. Spezies der natürlichen, angeborenen Mikroflora werden durch Probiotika nicht beeinflusst (BERNET-CAMARD et al. 1997; JACOBSEN et al. 1999). Ein ideales Probiotikum sollte keine Resistenzen induzieren, nicht toxisch sein und keine unerwünschten Nebeneffekte hervorrufen. Zudem sollte es bei lebensmittelliefernden Tieren keine Rückstände im Schlachtkörper hinterlassen (FULLER 1989). Diese Anforderungen sind bei Laktobazillen erfüllt.

Probiotika werden vorzugsweise prophylaktisch und nicht erst therapeutisch eingesetzt, da nach einer Infektion mit Salmonellen klinische Symptome in der Mehrzahl der Fälle nicht auftreten. Daher würden erkrankte Tiere oft nicht erkannt und die Erreger könnten in die Lebensmittelkette gelangen. In einer Studie von JOHANNSEN et al. (2004) führte die Verabreichung von Laktose und *Lactobacillus acidophilus* bei 3 Wochen alten Puten allerdings zu keiner Reduktion der *Salmonella Typhimurium*-Besiedlung des Kropfes. Die prophylaktische Behandlung mit *Lactobacillus acidophilus* reduzierte in einem Versuch von WATKINS und MILLER (1983) signifikant die Mortalität der Küken verglichen mit der therapeutischen Gabe. Außerdem verringerte sie sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch die Ausscheidung von *Salmonella Typhimurium* und *Staphylococcus aureus*. Sie verminderte auch die Zahl der aus dem Kropf isolierbaren *Salmonella Typhimurium* und *Staphylococcus aureus*, nicht jedoch die Zahl dieser Keime im Caecum- und Rektuminhalt der Hühner postmortem. Auch PRIYANKARAGE et al. (2004) schlugen

vor, Probiotika prophylaktisch zu verabreichen, um das Auftreten von Salmonellen in Geflügelbeständen zu verringern.

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung verschiedener Probiotika für den Einsatz gegen die häufig vorkommenden Stämme *Salmonella Enteritidis* und *Salmonella Infantis*. Ein direkt mit dem *Salmonella Enteritidis*-Stamm C-114 ( $10^5$  KbE/g) oral an Eintagsküken verabreichtes Probiotikum (*Lactobacillus salivarius* CTC2197) vermittelte bei PASCUAL et al. (1999) eine komplette Ausscheidung des Pathogens nach 21 Tagen. Gleiche Ergebnisse ergaben sich, wenn das Probiotikum über das Futter oder Trinkwasser verabreicht wurde. Zwischen dem 21. und 28. Tag konnte der verabreichte *Lactobacillus*-Stamm nicht nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass eine einmalige Behandlung nicht ausreichend ist, um über die gesamte Aufzuchtperiode einen sicheren Schutz zu bieten. Die ausgeprägte Fähigkeit von *Lactobacillus salivarius* CTC2197 sich an Epithelzellen anzuheften und der *in vitro* bewiesene Antagonismus gegen *S. enteritidis* können die Möglichkeit erklären, dass *Lactobacillus salivarius* diesem Pathogen auch *in vivo* entgegen tritt. In der vorliegenden Studie wurde versucht, die Kolonisation von Laktobazillen in den Caeca durch die tägliche Verabreichung über das Futter anstelle einer einmaligen Behandlung zu fördern. Auch Laktobazillen der Gattung *Lactobacillus salivarius* A 23 waren laut ZACCONI et al. (1999) in der Lage, sich im Hühnerkropf anzusiedeln, indem sie sich am Epithel anheften, ihr Anteil überstieg den der anderen vorherrschenden Bakterien. Vor allem hydrophobe Stämme waren sehr adhäsiv (EHRMANN et al. 2002). Adhäsion ist eine wichtige Eigenschaft probiotischer LAB-Stämme, die sie befähigt, sich im Darm anzusiedeln. Diese wird entweder unspezifisch durch physiko-chemische Faktoren oder spezifisch durch adhäsive bakterielle Oberflächenmoleküle und epitheliale Rezeptormoleküle vermittelt (HOLZAPFEL et al. 1998). Die Adhäsionsfähigkeit an die Darmoberfläche ist eines der Hauptkriterien für die Selektion bestimmter Stämme für den Einsatz als Probiotika. Ein anderer wichtiger Faktor ist das Fehlen des Potenzials zur Plättchenaggregation. Diese ist potenziell schädlich für den Wirtsorganismus und kann zu Endokarditiden führen. Die Adhäsion vermittelt eine verlängerte

Verweildauer der Bakterienstämme im Darmtrakt des Wirtes und kann so die Wirksamkeit der Probiotika verstärken (SALMINEN et al. 1996; SCHIFFRIN et al. 1997; SALMINEN et al. 1998). Die Fähigkeit zur Adhäsion kann allerdings auch als Virulenz-Faktor für Pathogene angesehen werden (FINLAY u. FALKOW 1997). KIRJAVAINEN et al. (1999) haben die Adhäsionsfähigkeit von acht klinischen *Lactobacillus*-Isolaten an intestinalen Mucus getestet. Die meisten Stämme zeigten keine herausragende Adhäsionsfähigkeit. So scheint diese Fähigkeit kein potentieller Virulenzfaktor für probiotische Laktobazillen zu sein (OUWEHAND et al. 1999).

### **4.12.2 Epithel-physiologische Versuche**

In den epithel-physiologischen Versuchen ergaben sich in dieser Versuchsreihe keine signifikanten Unterschiede im sekretorischen Response zwischen den eingesetzten Gruppen. SCHRÖDER et al. (2006) zeigten, dass die Behandlung mit Probiotika beim Schwein zu einem signifikant geringeren sekretorischen Response führten, verglichen mit der unbehandelten, infizierten Gruppe. Im Gegensatz zu Schweinen zeigen Broiler weithin jedoch keine klinischen Zeichen einer infektiösen Diarrhoe. Ihr Gastrointestinaltrakt scheint von den Salmonellen nicht so stark beeinflusst zu werden. Daher unterschied sich in dieser Studie der sekretorische Response der infizierten Broiler nicht signifikant von dem der Kontrolltiere und infizierten Tiere.

In dieser Versuchsreihe ergaben sich keine Hinweise auf eine Beeinflussung der parazellulären Permeabilität.

Bezüglich der Gewebeleitfähigkeit traten bis auf eine Ausnahme (80 min nach Versuchsstart) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Die Gewebe waren über die gesamte Zeit intakt, repräsentiert durch die Konstanz der Leitfähigkeit über die Zeit.

### **4.12.3 Bakteriologische Untersuchungen**

Bei den bakteriologischen Untersuchungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Kontrollgruppe zeigte keinerlei

Salmonellenbesiedlung, ein Indikator für die Verlässlichkeit der Methode und Sicherheit der Infektion.

Während die Kontrolltiere zu jedem Zeitpunkt der Tupferprobennahme negativ waren, zeigten die anderen Gruppen nach der Infektion eine deutliche Besiedlung mit *Salmonella Enteritidis*. Diese Ergebnisse zeigen sowohl die gelungene Abschirmung nicht infizierter Tiere von infizierten als auch den Erfolg der Infektion. Die eingesetzten Probiotika waren nicht in der Lage, die Inzidenz der Salmonellen zu reduzieren.

### 4.13 Versuchsreihe 4

#### 4.13.1 Versuchsaufbau und eingesetzte Futterzusatzstoffe

In der vierten Versuchsreihe wurden die Probiotika P3 und P4 getestet. Eine nicht infizierte Kontrollgruppe wurde nicht eingesetzt. Die vorherigen Versuchsreihen hatten gezeigt, dass keinerlei Salmonellenbesiedlung bei den Kontrolltieren auftrat. So konnten diese Ergebnisse als Referenz für die kommenden Versuchsreihen verwendet werden.

Bei P3 handelte es sich um ein sprühgetrocknetes Produkt des Stammes *Lactobacillus delbrueckii spp. Indicus* in einer Konzentration von 0,5 mg/kg Futter. P4 war ebenfalls sprühgetrocknet.

#### 4.13.2 Epithel-physiologische Versuche

In den epithel-physiologischen Versuchen reagierten alle Gruppen erwartungsgemäß mit einem Anstieg des Kurzschlussstroms auf die Zugabe von Forskolin. Bezüglich des sekretorischen Responses konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Bezüglich der Fluxraten des <sup>3</sup>H-markierten Mannits ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Gewebeleitfähigkeit unterschied sich weder zwischen den Gruppen noch in den einzelnen Gruppen über die Zeit. So kann von durchgängig intakten Geweben ausgegangen werden.

Die Gabe der Probiotika führte zu keiner Veränderung der elektrophysiologischen Parameter sowie der parazellulären Permeabilität.

### **4.13.3 Bakteriologische Untersuchungen**

Die quantitative bakteriologische Untersuchung ergab keine signifikanten Unterschiede in der Besiedlung der Blinddärme und Lebern zwischen lediglich infizierten und behandelten Gruppen.

Wie auch in den anderen Versuchsreihen wiesen die Tiere nach anfänglicher Salmonellenfreiheit deutliche Kontaminationsraten auf. Dies konnte durch die Ergebnisse der Tupferproben gezeigt werden.

Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant von einander, wodurch davon auszugehen ist, dass die verabreichten Probiotika keinen Einfluss auf die bakteriologischen Parameter hatten.

## **4.14 Versuchsreihe 5**

### **4.14.1 Versuchsaufbau und eingesetzte Futterzusatzstoffe**

Die fünfte Versuchsreihe beinhaltete die mit den Probiotika P3 und P5 behandelten und infizierten Gruppen sowie eine infizierte, unbehandelte Gruppe. P3 wurde in derselben Konzentration wie in der vierten Versuchsreihe getestet, allerdings wurde in der fünften Versuchsreihe ein anderer Salmonellen-Stamm eingesetzt (*Salmonella Infantis*), der weniger invasiv ist (BERNDT et al. 2007). Während *Salmonella Enteritidis* 2006 das Serovar mit der höchsten Nachweisrate in Deutschland war (43,94%), repräsentierte *Salmonella Infantis* lediglich 1,63 % der Fälle beim Menschen (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2007). Bei Broilern wurde *Salmonella Infantis*

allerdings häufiger isoliert (10,6 % aller positiven Herden) als *Salmonella Enteritidis* mit 7,6 % (BFR 2006).

Bei P5 handelt es sich um Toyocerin<sup>®</sup>, ein kommerzielles probiotisches Produkt, das aus lebensfähigen Sporen von *Bacillus cereus var. toyoi* besteht, die ursprünglich aus Erde isoliert wurden ( $10^9$  Sporen/g). Es hat eine permanente Zulassung als Futterzusatz für Schweine und eine provisorische Genehmigung für Kälber. Zusätzlich ist es zur Mast von Hühnern und anderen Tieren zugelassen. Toyocerin<sup>®</sup> kann im Gastrointestinaltrakt persistieren, sich jedoch dort nicht vermehren (EUROPEANCOMMISSION 2001).

### 4.14.2 Epithel-physiologische Versuche

Die Gewebeleitfähigkeit der behandelten Tiere der vorliegenden Studie unterschied sich nicht von der der Kontrolltiere sowie der der infizierten Küken. Dies lässt sich mit Ergebnissen aus anderen Studien vereinbaren. Bei mit *Bacillus cereus var. toyoi* oder *Saccharomyces boulardii* vorbehandelten Schweinen zeigten epithel-physiologischen Untersuchungen unter basalen Bedingungen keine Beeinflussung des Kurzschlussstroms und der Gewebeleitfähigkeit (WINCKLER et al. 1998).

Die Untersuchung des sekretorischen Responses ergab in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Der maximale Kurzschlussstrom am Jejunum des Schweines nach Zugabe von Glucose war bei mit *Bacillus cereus var. toyoi* behandelten Tieren signifikant höher als in der Kontrollgruppe (BREVES et al. 2000). Jedoch wurde in dieser Studie Glucose im Gegensatz zu Forskolin eingesetzt. Beim Geflügel bewirkt die Zugabe von Glucose keine Veränderung des Kurzschlussstroms, wie in unveröffentlichten Vorversuchen gezeigt werden konnte.

Auch in der fünften Versuchsreihe waren die Fluxraten des <sup>3</sup>H-markierten Mannits konstant und wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem  $J_{sm}$  und dem  $J_{ms}$  auf. So kann davon ausgegangen werden, dass das Epithel intakt war. Dies wurde auch durch die einheitlichen Gewebeleitfähigkeiten bestätigt. Die errechneten unidirektionalen Fluxraten gaben in dieser Versuchsreihe keine Hinweise auf durch Probiotika verursachte Änderungen der parazellulären Permeabilität.

#### 4.14.3 Bakteriologische Untersuchungen

Auch die bakteriologischen Untersuchungen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Infektion mit *Salmonella Infantis*, die durch die Tupferproben eindeutig bestätigt wurde, scheint keine mit den vorliegenden Parametern messbaren Auswirkungen zu haben.

#### 4.15 Schlussfolgerungen

Die elektrophysiologischen Versuche in dieser Studie erzielten keine signifikanten Unterschiede zwischen mit Probiotika gefütterten, infizierten und Kontrollgruppen bezüglich der Gewebeleitfähigkeit und des Kurzschlussstroms. Die Hypothese, dass Probiotika elektrophysiologische, histologische und bakteriologische Parameter beim Huhn signifikant verändern können, konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden.

Ein Problem bei der Entwicklung eines effektiven Probiotikums ist die Tatsache, dass Hühner oft keine klinischen Krankheitssymptome entwickeln und es so nicht immer ersichtlich ist, welche Tiere infiziert sind. So könnten durch asymptomatische Trägartiere Salmonellen in die Lebensmittelkette gelangen und zu Erkrankungen beim Menschen führen. Der Einsatz von Probiotika könnte ein geeigneter Weg zur Reduktion dieses Risikos sein

Der sekretorische Response konnte in allen Gruppen gezeigt werden. Dadurch wird deutlich, dass die Gewebe über die Zeit der Messung vital waren und bei starker Schädigung durch die Salmonellen Veränderungen im Kurzschlussstrom und auch in der Gewebeleitfähigkeit gezeigt hätten. Je stärker ein Epithel geschädigt ist, desto höher liegt die Gewebeleitfähigkeit, die den reziproken Wert des elektrischen Widerstandes darstellt. Die Tatsache, dass keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Salmonellen lediglich einen geringen Einfluss auf das Darmgewebe von Hühnern haben. In der Mehrzahl der Fälle zeigen die Tiere in anderen Studien keinerlei klinische Krankheitsanzeichen



(KELLER et al. 1995; METHNER et al. 1995). Auch in dieser Studie gab es keine Anzeichen für eine klinische Erkrankung.

Zur Verminderung einer Kontamination mit pathogenen Keimen ist ein umfassendes Reinigungs- und Desinfektionssystem sowie eine möglichst artgerechte und stressarme Haltung der Hühner von großer Bedeutung. Dies wurde auch in dieser Studie angewendet. Möglicherweise hätten allerdings die Probiotika effektiver gewirkt, wenn die Küken unter einem größeren Stress gestanden hätten oder suboptimaler gehalten worden wären. Die Ermittlung des Stresslevels der Tiere ist jedoch nur mittels großen Aufwands über längere Zeit möglich und wurde in dieser Studie nicht betrieben.

Die intestinale bakterielle Mikroflora kann durch diätetische Veränderungen, die die Substratverfügbarkeit beeinflussen, modifiziert werden (EGGUM et al. 1982; LAN et al. 2002; ALZUETA et al. 2003). So könnte der Einsatz von Probiotika die Darmflora beeinflussen. Der genaue Wirkmechanismus von Probiotika ist jedoch bis heute ungeklärt. Probiotika wie *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus rhamnosus GG* können laut MACK et al. (1999) Muzine induzieren und so die Funktion der Darmbarriere verbessern. Laut SOERJADI et al. (1981) bildet die verabreichte Mikroflora eine Matte aus vernetzten Fasern, die als Glykokalyx bezeichnet wird. Durch diese Barrierenbildung könnte eine Besiedlung mit Salmonellen verhindert werden. Möglich ist auch, dass Probiotika mit den pathogenen Mikroorganismen um die freien Bindungsstellen an der Darmwand konkurrieren. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Permeabilität der Darmschleimhaut und die Produktion von schädigenden Metaboliten durch *Lactobacillus rhamnosus GG* reduziert werden konnten (GUPTA et al. 2000; YOUNG u. HUFFMAN 2003). In einer mit ausgewählter Darmflora behandelten Gruppe zeigte sich eine frühe Besiedlung von adhärenenten Bakterien und Fasern, die zusammen eine Mikrofloramatte bildeten. Diese Matte ist möglicherweise verantwortlich für den Schutz der Caeca vor einer Besiedlung mit Salmonellen (SOERJADI et al. 1982). In der vorliegenden Studie bewirkten die

eingesetzten Probiotika allerdings keine Änderung in der Besiedlung mit und Ausscheidung von Salmonellen.

Einige Studien beschäftigten sich mit dem Effekt von Probiotika auf die intestinale Mikroökologie. Sie zeigten, dass spezielle Stämme probiotischer Bakterien intestinale mikrobielle Enzymaktivitäten regulieren können (GOLDIN et al. 1992; LING et al. 1994; PEDROSA et al. 1995; KASPER 1998; SPANHAAK et al. 1998). Gleichzeitig kann die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren wie Buttersäure die Integrität und Versorgung der Mukosa verbessern (OUWEHAND et al. 1999).

Ein anderer Ansatz beschäftigt sich mit den Toxinrezeptoren in der Darmmukosa. Laut CONWAY et al. (1987) können Probiotika diese Rezeptoren zerstören und so die schädliche Wirkung bakterieller Toxine mindern.

Wie auch in der vorliegenden Studie zeigten PRIYANKARAGE et al. (2004) keine Verhinderung einer durch eine hohe Dosis Salmonellen hervorgerufenen klinischen Infektion durch Probiotika. Auch PALLIYAGURU et al. (2004) konnten keinen Einfluss von drei getesteten Probiotika (Protexin®, G-Probiotic®, Hi-yield®) auf die Futterverwertung und die Darmflora von Broilern erkennen.

Um Hühnerbetriebe vor Salmonelleninfektionen zu schützen, haben Anfang des 20. Jahrhunderts viele Farmer in Nordamerika den prophylaktischen Gebrauch von Antibiotika eingeführt. Diese Vorgehensweise fand auch in Europa große Zustimmung. Allerdings besteht die allgemeine Besorgnis, dass diese Methode zu einer großen Verbreitung von Antibiotikaresistenzen führen kann. Daher wurden immer mehr Probiotika eingesetzt, um diese bakteriellen Infektionen zu kontrollieren und die Abhängigkeit der Farmer von Antibiotikabehandlungen zu reduzieren (GONG et al. 2002). In einer Studie von SMIRNOV et al. (2005) steigerte die Supplementierung des Futters mit Probiotika die relativen Anteile von Laktobazillen im Ileum von Broilern um 47% verglichen mit der Kontrollgruppe, nicht jedoch im Jejunum und Duodenum. Die Behandlung mit Probiotika und Antibiotika bewirkte keine Veränderungen der Dicke der der Schleimhaut anheftenden Schicht. Antibiotika wurden jahrelang auch wegen ihrer wachstumsfördernden Wirkung

eingesetzt. In den vergangenen Jahren wurden antibiotische Futterzusatzstoffe mit dem vermehrten Auftreten multipler Resistenzen in Verbindung gebracht (WRAY u. DAVIES 2000). Demzufolge ist die Entwicklung gezielt wirkender Probiotika, zum Beispiel in Form von Laktobazillen, ein sinnvoller Ansatz zur Reduktion des Auftretens von Salmonellen.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass es für Laktobazillen schwierig ist, die Blinddärme zu erreichen. Die Gabe von  $10^{10}$  KbE in den Kropf von frisch geschlüpften Küken bewirkte keine Reduktion der Salmonellen in den Blinddärmen (ADLER u. DAMASSA 1980). Salmonellen besiedeln jedoch hauptsächlich die Caeca und so war es ein Anliegen dieser Studie, Probiotika einzusetzen, die die Blinddärme erreichen können. Die verwendeten Stämme wurden zuvor *in vitro* getestet und nur die wirksamsten wurden im Tierversuch eingesetzt. Jedoch auch mit sorgfältig voruntersuchten Stämmen waren bei FULLER (1989) die Effekte nur von kurzer Dauer. Die meisten Probiotika können sich nicht im Darm ansiedeln, daher sollten sie kontinuierlich verabreicht werden (NETHERWOOD et al. 1999). Mittels eines kontinuierlichen Fütterungssystems wurde versucht, eine höhere Kolonisationsrate der probiotischen Agenzien in den Blinddärmen zu erreichen.

Die Entwicklung eines effektiven Probiotikums für den Einsatz beim Geflügel ist erstrebenswert, denn neue Regularien bezüglich der Salmonellenfreiheit von Geflügelschlachtkörpern können zu großen wirtschaftlichen Verlusten in der Geflügelproduktion führen. Alle Broiler- und Putenschlachtkörper müssen seit 2008 auf Salmonellen getestet werden und ab 2012 darf laut (VO\_2160/2003) nur noch Fleisch, das nachgewiesen Salmonellen-frei ist, in der Europäischen Union auf den Markt gebracht werden. Ungeachtet ihrer guten Wirksamkeit sind orale oder intramuskuläre Impfungen teurer und aufwendiger als es ein einheitliches Fütterungssystem mit probiotischen Futterzusätzen wäre. Die in dieser Studie eingesetzten Probiotika konnten unter den gegebenen Umständen die Inzidenz von *Salmonella Enteritidis* und *Salmonella Infantis* jedoch nicht senken. Weitere Untersuchungen für die Entwicklung eines wirksamen Probiotikums sind

anzustreben. Weitergehende Untersuchungen sollten unter Beibehaltung des Infektionsmodells weitere Salmonellen-Serovare testen sowie auch weitere probiotische Stämme in höheren Konzentrationen testen.

## 5 Zusammenfassung

Nina Tippkemper (2010): **Untersuchungen zum protektiven Einfluss verschiedener Futterzusatzstoffe auf die gastrointestinale und systemische Besiedlung mit *Salmonella enterica* nach experimenteller Infektion bei Broilern**

Der Einsatz probiotischer Futterzusatzstoffe ist ein Ansatz zur Reduktion des Eintrags von Salmonellen in die Lebensmittelkette. Salmonellen rufen bei Broilern oftmals keine klinischen Symptome hervor und Infektionen werden daher oft nicht erkannt. Durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel tierischer Herkunft kommt es zu jedoch Salmonellose beim Verbraucher, die sich in einer teils schweren Enteritis äußern.

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Prüfung verschiedener Futterzusatzstoffe im Tierversuch im Hinblick auf die Reduktion der Salmonellenbesiedlung des Darms und der inneren Organe von mit *Salmonella enterica* infizierten Broilern. Dafür wurden fünf verschiedene Probiotika sowie Buttersäure-Glycerid getestet. Alle in dieser Studie eingesetzten Präparate waren zuvor in einem *in vitro* Screening-Verfahren auf ihre Hemmwirkung gegen Salmonellen getestet worden. Vor und nachdem die Küken am 13. Lebenstag mit Salmonellen infiziert wurden, wurden im Abstand von einigen Tagen Tupferproben zur qualitativen bakteriologischen Untersuchung entnommen. Eine quantitative bakteriologische Untersuchung von Leber- und Caecumproben fand am 19. Lebenstag statt. Vom 18. – 29. Lebenstag wurden epithel-physiologische Untersuchungen mittels Ussing-Kammer-Technik durchgeführt und die Parameter Kurzschlussstrom und Gewebeleitfähigkeit sowie Einflüsse auf die parazelluläre Permeabilität mittels  $^3\text{H}$ -Mannit-Fluxraten ermittelt. Zusätzlich wurden Caecumgewebe-Proben histologisch untersucht. Insgesamt wurden fünf Versuchsreihen durchgeführt.

Die in dieser Studie eingesetzten Futterzusatzstoffe zeigten keine Veränderungen der untersuchten Parameter. So hat sich die Hypothese, dass diese Probiotika die Besiedlung des Darms und der inneren Organe mit Salmonellen vermindern und epithel-physiologische Parameter beeinflussen können, nicht bestätigt.

## 6 Summary

Nina Tippkemper (2010): **Effects of probiotics on intestinal health in chickens in response to experimental infection with *Salmonella enterica***

One of the main sources for human Salmonellosis are poultry products. Infected broilers usually do not show any clinical signs, whereas humans often develop a serious enteritis after the consumption of *Salmonella*-contaminated poultry products. Probiotics were designed to reduce *Salmonella* shedding of broilers and laying hens. Therefore probiotic *Lactobacillus* strains as well as butyric acid glycerid were examined in the present study. All probiotics were tested *in vitro* before being fed to the chickens.

In each of the five trials two groups of chickens were fed with probiotics (days 1- 29) and infected with *Salmonella Enteritidis* and *infantis* (day 13), respectively. The others were either infected without probiotic gavage or served as untreated control groups.

Short circuit currents and tissue conductance were measured using the Ussing chamber technique (days 18- 29). Furthermore, paracellular permeability of isolated intact cecal tissue was detected using [<sup>3</sup>H] mannitol as a tracer. Cecal tissue was histologically examined as well. Additionally, cloacal swabs were collected (pre infection and 2, 5 and 8 dpi) and liver and cecum samples were examined bacteriologically (day 19).

The probiotic treatment did not lead to significant protective effects concerning intestinal health of chickens under the presented conditions.

## 7 Literaturverzeichnis

- ADLER, H. E. u. A. J. DAMASSA (1980):  
Effect of ingested Lactobacilli on Salmonella infantis and Escherichia coli and on intestinal flora, pasted vents, and chick growth.  
Avian Dis. 24, 868-878
- ALVAREZ-OLMOS, M. I. u. R. A. OBERHELMAN (2001):  
Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy.  
Clin. Inf. Dis. 32, 1567-1576
- ALZUETA, C., M. L. RODRIGUEZ, M. T. CUTULI, A. REBOLÉ, L. T. ORTIZ, C. CENTENO u. J. TREVINO (2003):  
Effect of whole and demucilaged linseed in broiler chicken diets on digesta viscosity, nutrient utilisation and intestinal microflora.  
Br. Poult. Sci. 44, 67-74
- AVIAGEN (2007):  
Broiler Performance Objectives June 2007 Ross 308.
- BAJKA, B. H., C. M. GILLESPIE, C. B. STEEB, L. C. READ u. G. S. HOWARTH (2003):  
Applicability of the Ussing chamber technique to permeability determinations in functionally distinct regions of the gastrointestinal tract in the rat.  
Scand. J. Gastroenterol. 38, 732-741
- BARNES, E. M. (1972):  
The avian intestinal flora with particular reference to the possible ecological significance of the cecal anaerobic bacteria.  
Am. J. Clin. Nutr. 25, 1475-1479
- BARROW, P. A. (2005):  
Salmonella infections and vaccines.  
17<sup>th</sup> World Veterinary Poultry Congress, 22.-26. August 2005, Istanbul, Türkei, 86-98
- BARROW, P. A., M. B. HUGGINS, M. A. LOVELL u. J. M. SIMPSON (1987):  
Observations on the pathogenesis of experimental Salmonella typhimurium infection in chickens.  
Res. Vet. Sci. 42, 194-199
- BARROW, P. A., J. M. SIMPSON u. M. A. LOVELL (1988):  
Intestinal colonisation in the chicken by food-poisoning salmonella serotypes; Microbial characteristics associated with faecal excretion.  
Avian Pathol. 17, 571-588

BARROW, P. A., G. C. MEAD, C. WRAY u. M. DUCHET-SUCHAUX (2003):  
Control of food-poisoning salmonella in poultry - biological options.  
World Poult. Sci. 59, 373-383

BARTH, S., S. DUNCKER, J. HEMPE, G. BREVES, G. BALJER u. R. BAUERFEIND  
(2009):  
Escherichia coli Nissle 1917 for probiotic use in piglets: evidence for intestinal  
colonization.  
J. Appl. Microbiol. 107, 1697-1710

BEFUS, A. D., N. JOHNSTON, G. A. LESLIE u. J. BIENENSTOCK (1980):  
Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some  
functional characteristics of Peyer's patches.  
J. Immunol. 125, 2626-2632

BERNDT, A., A. WILHELM, C. JUGERT, J. PIEPER, K. SACHSE u. U. METHNER  
(2007):  
Chicken cecum immune response to Salmonella enterica serovars of different levels  
of invasiveness.  
Infect. Immun. 75, 5993-6007

BERNET-CAMARD, M. F., V. LIEVIN, D. BRASSART, J. R. NEESER, A. L. SERVIN  
u. S. HUDAULT (1997):  
The human Lactobacillus acidophilus strain LA1 secretes a nonbacteriocin  
antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo.  
Appl. Environ. Microbiol. 63, 2747-2753

BFR (2006):  
Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz von Salmonellen in *Gallus-gallus*-  
Broilerbetrieben.

BIERER, W. B. (1960):  
Effect of age factor on mortality in Salmonella typhimurium infection in turkey poults.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 137, 657-658  
zitiert nach HAFEZ u. JODAS (2000)

BICKEL, S., W. WETSCHEREK u. R. LEITGEB (2001):  
Einfluss der Fettart auf die Leistung von Masthühnern, sowie auf verschiedene für  
den Konsumenten wichtige Qualitätskriterien im Schlachtkörper 1. Mitteilung: Einfluss  
von Rapsöl und tierischem Fett auf die Mast- und Schlachtleistung von Broilern.  
Die Bodenkultur 52, 45-53

BJERRUM, L., R. M. ENGBERG, T. D. LESER, B. B. JENSEN, K. FINSTER u. K.  
PEDERSEN (2006):  
Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens als  
revealed by molecular and culture-based techniques.  
Poult. Sci. 85, 1151-1164



- BRADY, L. J., D. D. GALLAHER u. F. F. BUSTA (2000):  
The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer.  
J. Nutr. 130, 410S-414S
- BREVES, G., C. WALTER, M. BURMESTER u. B. SCHROEDER (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, 9-20
- BROWN, D. R., M. F. OVEREND u. B. G. TREDER (1990):  
Neurohormonal regulation of ion transport in the porcine distal jejunum. Actions of  
somatostatin-14 and its natural and synthetic homologs.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 252, 126-134
- BURNS, R. B. u. M. H. MAXWELL (1986):  
Ultrastructure of Peyer's patches in the domestic fowl and turkey.  
J. Anat. 147, 235-243
- COLLINS, F. M. u. P. B. CARTER (1978):  
Growth of Salmonellae in orally infected germfree mice.  
Infect Immun 21, 41-47
- CLARKE, R.C. u. C. L. GYLES (1993):  
Salmonella.  
In: GYLES, C. L. u. C. O. THOEN (Hrsg.): Pathogenesis of bacterial infections in  
animals.  
2. Aufl., Iowa State University Press, Ames, S. 133-153
- CONWAY, P. L., S. L. GORBACH u. B. R. GOLDIN (1987):  
Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells.  
J. Dairy Sci. 70, 1-12
- COOPER, G. L., R. A. NICHOLAS, G. A. CULLEN u. C. E. HORMAECHE (1990):  
Vaccination of chickens with a *Salmonella enteritidis aroA* live oral *Salmonella*  
vaccine.  
Microb. Pathog. 9, 255-265
- COOPER, G. L., L. M. VENABLES, R. A. NICHOLAS, G. A. CULLEN u. C. E.  
HORMAECHE (1993):  
Further studies of the application of live *Salmonella enteritidis aroA* vaccines in  
chickens.  
Vet. Rec. 133, 31-36

CORRIER, D. E., A. HINTON, JR., R. L. ZIPPRIN, R. C. BEIER u. J. R. DELOACH (1990):

Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids, and *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chicks.

Avian Dis. 34, 617-625

COTTER, P. A. u. V. J. DIRITA (2000):

Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective.

Annu. Rev. Microbiol. 54, 519-565

CUMMINGS, J. H. (1981):

Short chain fatty acids in the human colon.

Gut 22, 763-779

DESMIDT, M., R. DUCATELLE u. F. HAESEBROUCK (1997):

Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens.

Vet. Microbiol. 56, 99-109

DUNNE, C., L. MURPHY, S. FLYNN, L. O'MAHONY, S. O'HALLORAN, M. FEENEY, D. MORRISSEY, G. THORNTON, G. FITZGERALD, C. DALY, B. KIELY, E. M. QUIGLEY, G. C. O'SULLIVAN, F. SHANAHAN u. J. K. COLLINS (1999):

Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials.

Antonie Van Leeuwenhoek 76, 279-292

EGGUM, B. O., G. THORBEEK, R. M. BEAMES, A. CHWALIBOG u. S. HENCKEL (1982):

Influence of diet and microbial activity in the digestive tract on digestibility, and nitrogen and energy metabolism in rats and pigs.

Br. J. Nutr. 48, 161-175

EHRMANN, M. A., P. KURZAK, J. BAUER u. R. F. VOGEL (2002):

Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry.

J. Appl. Microbiol. 92, 966-975

ENGBERG, R. M., M. S. HEDEMANN u. B. B. JENSEN (2002):

The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens.

Br. Poult. Sci. 43, 569-579

ENSMINGER, M. E., J. E. OLDFIELD u. W. W. HEINEMANN (1990):

Feeds and nutrition, Second edition, The Ensminger Publishing Company.

EUROPEANCOMMISSION (2001):

Health & Consumer Protection Directorate - General Report of the scientific committee on animal nutrition on product Toyocerin (R) for use as feed additive.

- FAVUS, M. J. u. E. ANGEID-BACKMAN (1984):  
Effects of lactose on calcium absorption and secretion by rat ileum.  
Am .J. Physiol. 246, G281-G285
- FINLAY, B. B. u. S. FALKOW (1997):  
Common themes in microbial pathogenicity revisited.  
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 136-169
- FULLER, R. (1977):  
The importance of Lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop.  
Br. Poult. Sci. 18, 85-94
- FULLER, R. (1989):  
Probiotics in man and animals. A review.  
J. Appl. Bacteriol. 66, 365-378
- GANTOIS, I., R. DUCATELLE, F. PASMANS, F. HAESEBROUCK u. F. V. IMMERSEEL (2008):  
*Salmonella enterica* Serovar Enteritidis genes induced during oviduct colonization and egg contamination in laying hens.  
Appl. Environ. Microbiol. 74, 6616-6622
- GAST, R. K. (2003):  
Salmonella infections.  
In: SAIF, Y. M. (Hrsg.): Diseases of poultry.  
11. Aufl., Iowa State Press, Ames, S. 567-568
- GEWIRTZ, A. T., T. A. NAVAS, S. LYONS, P. J. GODOWSKI u. J. L. MADARA (2001):  
Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression.  
J. Immunol. 167, 1882-1885
- GOLDIN, B. R., S. L. GORBACH, M. SAXELIN, S. BARAKAT, L. GUALTIERI u. S. SALMINEN (1992):  
Survival of Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract.  
Dig. Dis. Sci. 37, 121-128
- GONG, J., R. J. FORSTER, H. YU, J. R. CHAMBERS, P. M. SABOUR, R. WHEATCROFT u. S. CHEN (2002):  
Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen.  
FEMS Microbiol. Lett. 208, 1-7

- GREGGER, R. u. U. WINDHORST (1996):  
Cellular Transduction Processes, Comprehensive Human Physiology, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- GUARNER, F. u. J. R. MALAGELADA (2003):  
Gut flora in health and disease.  
Lancet 361, 512-519
- GUPTA, P., H. ANDREW, B. S. KIRSCHNER u. S. GUANDALINI (2000):  
Is Lactobacillus GG helpful in children with Crohn's Disease? Results of a preliminary, open-label study.  
J. Pediatr. Gastroent. Nutr. 31, 453-457
- HAFEZ, H. M. u. S. JODAS (2000):  
Salmonella infections in turkeys.  
In: C. WRAY und A. WRAY (Hrsg.): Salmonella in Domestic Animals  
CABI Publishing, Wallingford, New York, S. 133-155
- HASSAN, J. O. u. R. CURTISS, 3<sup>rd</sup> (1997):  
Efficacy of a live avirulent Salmonella typhimurium vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis.  
Avian Dis. 41, 783-791
- HEIDER, G. u. G. MONREAL (1992):  
Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels.  
Gustav Fischer Verlag, Jena
- HENRY, R. R. (2000):  
Salmonella infection in ducks.  
In: C. WRAY und A. WRAY (Hrsg.): Salmonella in Domestic Animals  
CABI Publishing, Wallingford, New York, S. 157-167
- HEMPE, J. (2007):  
Characterisation of chloride secretion in the jejunum and colon of pigs of different age groups (Charakterisierung der Chloridsekretion im Jejunum und Colon von Schweinen verschiedener Altersklassen).  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- HIGGINS, J. P., S. E. HIGGINS, J. L. VICENTE, A. D. WOLFENDEN, G. TELLEZ u. B. M. HARGIS (2007):  
Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on Salmonella in neonatal broilers.  
Poult. Sci. 86, 1662-1666
- HOLST, H. u. G. BREVES (2005):  
Probiotika - von der Erfahrungsmedizin zum therapeutischen Standard.  
Z. Gastroenterol. 43, 601-606

HOLZAPFEL, W. H., P. HABERER, J. SNEL, U. SCHILLINGER u. J. H. HUIS IN'T VELD (1998):

Overview of gut flora and probiotics.

Int. J. Food Microbiol. 41, 85-101

HÜHNER-SALMONELLEN-VERORDNUNG (2009):

Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonelleninfektionen beim Haushuhn (Hühner-Salmonellen-Verordnung) in der Fassung vom 6. April 2009.

ISOLAURI, E., J. JOENSUU, H. SUOMALAINEN, M. LUOMALA u. T. VESIKARI (1995):

Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG.

Vaccine 13, 310-312

JACOBSEN, C. N., V. ROSENFELDT NIELSEN, A. E. HAYFORD, P. L. MOLLER, K. F. MICHAELSEN, A. PAERREGAARD, B. SANDSTROM, M. TVEDE u. M. JAKOBSEN (1999):

Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans.

Appl. Environ. Microbiol. 65, 4949-4956

JERNIGAN, M. A., R. D. MILES u. A. S. ARAFA (1985):

Probiotics in Poultry - A Review.

World's Poult. Sci. 41, 99-107

JIN, L. Z., Y. W. HO, N. ABDULLAH, M. A. ALI u. S. JALALUDIN (1996):

Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken.

Lett. Appl. Microbiol. 23, 67-71

JIN, L. Z., Y. W. HO, N. ABDULLAH u. S. JALALUDIN (1997):

Probiotics in poultry: modes of action.

World's Poult. Sci. 53,

JOHANNSEN, S. A., R. W. GRIFFITH, I. V. WESLEY u. C. G. SCANES (2004):

*Salmonella enterica* serovar typhimurium colonization of the crop in the domestic turkey: influence of probiotic and prebiotic treatment (*Lactobacillus acidophilus* and lactose).

Avian Dis. 48, 279-286

JOHANNSON, M.-L., G. MOLIN, B. JEPPSSON, S. NOBAEK, S. AHRNE u. S. BENGMARK (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, 15-20

JORGENSEN, L., J. DAHL, B. B. JENSEN u. H. D. POULSEN (1999):  
Effekt af ekspandering, pelletering og formalingsgrad pa Salmonella,  
produktionsresultater og mavetarmsundhed hos sjagetesvin samt pa fytaseaktivitet og  
vitamin stabilitet i foder.

Landsulvalget for Svin, Den rullende Afprovning, Danske Slagterier, Axelborg,  
Axeltorv 3, DK-1609 Kobenhavn V. Report No. 426, 424 pp.

KASPER, H. (1998):

Protection against gastrointestinal diseases-present facts and future developments.  
Int. J. Food Microbiol. 41, 127-131

KELLER, L. H., C. E. BENSON, K. KROTEC u. R. J. ECKROADE (1995):

*Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly  
laid eggs of chickens.

Infect. Immun. 63, 2443-2449

KIRCHGESSNER, M. (1997):

Tierernahrung, Verlagsunion Agrar, DLG Verlag Frankfurt (Main).

KIRJAVAINEN, P. V., E. M. TUOMOLA, R. G. CRITTENDEN, A. C. OUWEHAND, D.  
W. HARTY, L. F. MORRIS, H. RAUTELIN, M. J. PLAYNE, D. C. DONOHUE u. S. J.  
SALMINEN (1999):

In vitro adhesion and platelet aggregation properties of bacteremia-associated  
lactobacilli.

Infect. Immun. 67, 2653-2655

KOCH, F. (2005):

Organische Säuren in der Tierernahrung.

[www.rindergesundheit.com](http://www.rindergesundheit.com)

LAN, G. Q., N. ABDULLAH, S. JALALUDIN u. Y. W. HO (2002):

Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacterial culture on the  
performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets.

Poult. Sci. 81, 1522-1532

LARDON, I., F. BOYEN, R. DUCATELLE, F. V. IMMERSEEL, F. HAESEBROUCK u.  
F. PASMANS (2007):

The influence of fatty acids on the expression of virulence genes of *Salmonella*  
*typhimurium* and the colonization of pigs.

Proceedings Safepork 2007, Verona, Italy 473-476

LEV, M. u. C. A. E. BRIGGS (1956):

The gut flora of the chick. 2. The establishment of the flora.

J. Appl. Bacteriol. 19, 224-230

- LILLY, D. M. u. R. H. STILLWELL (1965):  
Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms.  
Science 147, 747-748
- LING, W. H., R. KORPELA, H. MYKKÄNEN, S. SALMINEN u. O. HÄNNINEN (1994):  
Lactobacillus strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive  
enzyme activities in healthy female adults.  
J. Nutr. 124, 18-23
- LINK-AMSTER, H., F. ROCHAT, K. Y. SAUDAN, O. MIGNOT u. J. M.  
AESCHLIMANN (1994):  
Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora  
mediated through fermented milk intake.  
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 10, 55-63
- LUDWIG, H.-J. u. P. CALSOW (1992):  
Prophylaxis of Salmonella infections in hens by vaccination (Versuche zur Vorbeuge  
von Salmonelleninfektionen bei Legehennen durch Impfung).  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 105, 096-099
- LMBG § 35 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren L(00,00-20).
- MACK, D. R., S. MICHAEL, S. WEI, L. MCDOUGALL u. M. A. HOLLINGSWORTH  
(1999):  
Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal  
mucin gene expression.  
Am. J. Physiol. 276, G941-950
- MATSUZAKI, T., R. YAMAZAKI, S. HASHIMOTO u. T. YOKOKURA (1998):  
The effect of oral feeding of Lactobacillus casei strain Shirota on immunoglobulin E  
production in mice.  
J. Dairy Sci. 81, 48-53
- METHNER, U. (2000):  
Verabreichung von autochthoner Darmflora - ein Verfahren zur Prophylaxe der  
Salmonellainfektion beim Geflügel.  
Dtsch. tierärztl. Wschr. 107, 402-408
- METHNER, U., H. KOCH u. H. MEYER (1995):  
Modell zur experimentellen Wirksamkeitsprüfung von Bekämpfungsmaßnahmen  
gegen Salmonellainfektionen beim Huhn.  
Dtsch. tierärztl. Wschr. 102, 225-228
- MILNER, K. C. u. M. F. SHAFFER (1952):  
Bacteriologic studies of experimental Salmonella infections in chicks.  
J. Infect. Dis. 90, 81-96

NAKAMURA, A., Y. OTA, A. MIZUKAMI, T. ITO, Y. B. NGWAI u. Y. ADACHI (2002):  
Evaluation of aviguard, a commercial competitive exclusion product for efficacy and  
after-effect on the antibody response of chicks to Salmonella.  
Poult. Sci. 81, 1653-1660

NETHERWOOD, T., H. J. GILBERT, D. S. PARKER u. A. G. O'DONNELL (1999):  
Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian  
gastrointestinal tract.  
Appl. Environ. Microbiol. 65, 5134-5138

OTTE, J. M. u. D. K. PODOLSKY (2004):  
Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative  
microorganisms.  
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 286, G613-626

OUWEHAND, A. C., P. V. KIRJAVAINEN, C. SHORTT u. S. SALMINEN (1999):  
Probiotics: mechanisms and established effects.  
Int. Dairy J. 9, 43-52

PALLIYAGURU, M. W., N. PRIYANKARAGE, S. S. SILVA, S. P. GUNARATNE, W.  
M. WEERASINGHE, P. S. FERNADO u. A. M. ATTAPATU (2004):  
Effect of different probiotics on nutrient utilisation and intestinal microflora of broiler  
chickens.  
Br. Poult. Sci. 45 Suppl 1, S58-59

PARKER, R. B. (1974):  
Probiotics, the other half of the antibiotic story.  
Anim. Nutr. Health 29, 4-8

PASCUAL, M., M. HUGAS, J. I. BADIOLA, J. M. MONFORT u. M. GARRIGA (1999):  
Lactobacillus salivarius CTC2197 prevents Salmonella enteritidis colonization in  
chickens.  
Appl. Environ. Microbiol. 65, 4981-4986

PEDROSA, M. C., B. B. GOLNER, B. R. GOLDIN, S. BARAKAT, G. E. DALLAL u. R.  
M. RUSSELL (1995):  
Survival of yogurt-containing organisms and Lactobacillus gasseri (ADH) and their  
effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and  
hypochlorhydric elderly subjects.  
Am. J. Clin. Nutr. 61, 353-359

PICHARDT, K. (1998):  
Lebensmittelmikrobiologie: Grundlagen für die Praxis.  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 42-43



PRIYANKARAGE, N., S. S. SILVA, G. A. GUNAWARDANA, M. W. PALLIYAGURU, W. M. WEERASINGHE, G. K. FERNANDO u. R. CHANDIMA (2004):  
Effect of different probiotics against a lethal dose of Salmonella challenge in broiler chickens.

Br. Poult. Sci. 45 Suppl 1, S43-45

QIN, Z. R., T. FUKATA, E. BABA u. A. ARAKAWA (1995):  
Effect of lactose and Lactobacillus acidophilus on the colonization of Salmonella enteritidis in chicks concurrently infected with Eimeria tenella.

Avian Dis. 39, 548-553

RAO, V. u. H. V. S. CHAUHAN (1987):

The pathology and pathogenesis of Salmonella stanley infection in experimental chicks.

Res. Vet. Sci. 42, 287-293

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2006):

Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Ausgewählte Zoonosen im Jahr 2005: Durch Lebensmittel übertragbare bakterielle gastrointestinale Infektionen, Epid. Bull. 41.

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2007):

*Salmonella*-Enteritidis-Erkrankungen - Bericht zu einem Ausbruch in vier Kindergärten, Epid. Bull. 3.

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2009):

Salmonellose (Salmonellen-Gastroenteritis) RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte.

ROLFE, R. D. (2000):

The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health.

J. Nutr. 130, 396S-402S

ROLLE, M. u. A. MAYR (2002):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

Enke Verlag, Stuttgart

ROTH, F. X. u. T. ETTLE (2005):

Organische Säuren: Alternative zu antibiotischen Leistungsförderern.

Tagungsband 4. BOKU-Symposium Tierernährung: Tierernährung ohne antibiotische Leistungsförderer [www.dlwt.boku.at/tte.html](http://www.dlwt.boku.at/tte.html),

SALANITRO, J. P., I. G. BLAKE u. P. A. MUIRHEAD (1974):

Studies on the cecal microflora of commercial broiler chickens.

Appl. Microbiol. 28, 439-447

- SALMINEN, S., E. ISOLAURI u. E. SALMINEN (1996):  
Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges.  
Antonie Van Leeuwenhoek 70, 347-358
- SALMINEN, S., A. V. WRIGHT, L. MORELLI, P. MARTEAU, D. BRASSART, W. M. D. VOS, R. FONDÉN, M. SAXELIN, K. COLLINS, G. MOGENSEN, S.-E. BIRKELAND u. T. MATTILA-SANDHOLM (1998):  
Demonstration of safety of probiotics - a review.  
Int. J. Food Microbiol. 44, 93-106
- SAVAGE, D. C. (1977):  
Microbial ecology of the gastrointestinal tract.  
Annu. Rev. Microbiol. 31, 107-133
- SCHIFFRIN, E. J., D. BRASSART, A. L. SERVIN, F. ROCHAT u. A. DONNET-HUGHES (1997):  
Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection.  
Am .J. Clin. Nutr. 66, 515S-520S
- SCHROEDER, B., C. WINCKLER, K. FAILING u. G. BREVES (2004):  
Studies on the time course of the effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on electrolyte transport in pig jejunum.  
Dig. Dis. Sci. 49, 1311-1317
- SCHROEDER, B., S. DUNCKER, S. BARTH, R. BAUERFEIND, A. D. GRUBER, S. DEPPENMEIER u. G. BREVES (2006):  
Preventive Effects of the Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 on Acute Secretory Diarrhea in a Pig Model of Intestinal Infection.  
Dig. Dis. Sci. 51, 724-731
- SCHULTZ, S. G., R. ZALUSKY u. A. E. GASS, JR. (1964):  
Ion Transport in Isolated Rabbit Ileum. 3. Chloride Fluxes.  
J. Gen. Physiol. 48, 375-378
- SEAMON, K. B., W. PADGETT u. J. W. DALY (1981):  
Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 78, 3363-3367
- SELBITZ, H.-J., S. SPRINGER, T. LINDNER, R. HOLUBEK, L. LAUTERBACH u. H. RÜDIGER (2006):  
Immunprophylaxe von Salmonelleninfektionen und Salmonellosen der Tiere.  
Tierärztl. Prax. 34 (G), 126-131

SHANAHAN, F. (2002):

The host-microbe interface within the gut.  
Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 16, 915-931

SIMMERING, R. u. M. BLAUT (2001):

Pro- and prebiotics--the tasty guardian angels?  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 55, 19-28

SMIRNOV, A., R. PEREZ, E. AMIT-ROMACH, D. SKLAN u. Z. UNI (2005):

Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promotor supplementation.  
J. Nutr. 135, 187-192

SMITH, H. W. (1965):

The development of the flora of the alimentary tract in young animals.  
J. Path. Bact. 90, 495-513

SOERJADI, A. S., R. RUFNER, G. H. SNOEYENBOS u. O. M. WEINACK (1982):

Adherence of salmonellae and native gut microflora to the gastrointestinal mucosa of chicks.  
Avian Dis. 26, 576-584

SOERJADI, A. S., S. M. STEHMAN, G. H. SNOEYENBOS, O. M. WEINACK u. C. F. SMYSER (1981):

Some measurements of protection against paratyphoid Salmonella and Escherichia coli by competitive exclusion chickens.  
Avian Dis. 25, 706-712

SPANHAAK, S., R. HAVENAAR u. G. SCHAAFSMA (1998):

The effect of consumption of milk fermented by Lactobacillus casei strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans.  
Eur. J. Clin. Nutr. 52, 899-907

SULLIVAN, A. u. C. E. NORD (2002a):

The place of probiotics in human intestinal infections.  
Int. J. Antimicrob. Agents. 20, 313-319

SULLIVAN, A. u. C. E. NORD (2002a):

Probiotics in human infections.  
J. Antimicrob. Chemother. 50, 625-627

SAUTER, S. N., J. BENYACOU, K. ALLENSPACH, F. GASCHEN, E. ONTSOUKA, G. REUTELER, C. CAVADIN, R. KNORR u. J. W. BLUM (2006):

Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhoea treated with an elimination diet.  
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl) 90, 269-277

USSING, H. H. (1949):

The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.  
Acta Physiol. Scand. 17, 1-37

USSING, H. H. u. K. ZERAHN (1951):

Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.  
Acta Physiol. Scand. 23, 110-127

VAHJEN, W., D. TARAS u. O. SIMON (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, 1-7

VAN IMMERSEEL, F., F. BOYEN, I. GANTOIS, L. TIMBERMONT, L. BOHEZ, F. PASMANS, F. HAESEBROUCK u. R. DUCATELLE (2005):

Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of Salmonella in poultry.  
Poult. Sci. 84, 1851-1856

VAN IMMERSEEL, F., J. D. BUCK, F. PASMANS, L. BOHEZ, F. BOYEN, F. HAESEBROUCK u. R. DUCATELLE (2004c):

Intermittent long-term shedding and induction of carrier animals after infection of chickens early post-hatch with a low and a high dose of *Salmonella* Enteritidis.  
Poult. Sci. 83, 1911-1916

VAN IMMERSEEL, F., J. B. RUSSELL, M. D. FLYTHE, I. GANTOIS, L.

TIMBERMONT, F. PASMANS, F. HAESEBROUCK u. R. DUCATELLE (2006):

The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy.  
Avian Pathol. 35, 182-188

VO\_1003/2005 Verordnung (EG) Nr. 1003/2005 der Kommission vom 30. Juni 2005 zur Durchführung der Verordnung (EG) 2160/2003 hinsichtlich eines Gemeinschaftsziels zur Senkung der Prävalenz bestimmter Salmonella-Serotypen bei Zuchtherden von Gallus gallus und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2160/2003.

VO\_1091/2005 Verordnung (EG) Nr. 1091/2005 der Kommission vom 12. Juli 2005 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 hinsichtlich der Bestimmungen über die Anwendung von spezifischen Bekämpfungsmethoden im Rahmen der nationalen Programme zur Bekämpfung von Salmonellen.

VO\_1831/2003 Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung.

VO\_2001/82/EG Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Tierarzneimittel.

VO\_2160/2003 Verordnung (EG) Nr 2160 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern.

WATKINS, B. A. u. B. F. MILLER (1983):  
Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks.  
Poult Sci. 62, 1772-1779

WINCKLER, C., B. SCHROEDER u. G. BREVES (1998):  
Effects of *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus* var. *caron* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on epithelial transport functions in pig jejunum.  
Z. Gastroenterol. Suppl. 1, 30-37

WRAY, C. u. R. H. DAVIES (2000):  
Competitive exclusion--an alternative to antibiotics.  
Vet. J. 159, 107-108

YOUNG, R. J. u. S. HUFFMAN (2003):  
Probiotic use in children.  
J. Pediatr. Health Care 17, 277-283

ZACCONI, C., G. SCOLARI, D. FRAIOLI u. P. G. SARRA (1999):  
Colonisation of chicken intestinal tract by *Lactobacillus salivarius* A23 strain.  
Annali di Microbiologia ed Enzimologia 49, 103-115

ZOETENDAL, E. G., A. D. AKKERMANS u. W. M. DE VOS (1998):  
Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria.  
Appl. Environ. Microbiol. 68, 124-137

## 8 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt...

...Herrn Prof. Dr. Gerhard Breves für die Bereitstellung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die kompetente Betreuung.

...unseren Projektpartnern Dr. Armin Müller und Dr. Ilka Schröder der Firma Lohmann Animal Health, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

...den unersetzbaren Ussing-Feen Marion, Marion und Kerstin, ohne deren Hilfe und witzige Geschichten mancher Tag im „Keller“ sehr lang geworden wäre.

...den immer einsatzbereiten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktorandinnen und Doktoranden der Geflügelklinik für die Unterstützung bei der Aufzucht und Sektion der Küken und den bakteriologischen Untersuchungen.

...meinen wunderbaren Kolleginnen Steffi, Maria, Inga, Nina, Nina, Lisa und Hanna und besonders meinen Freundinnen Katha und Susi für die großartige Zeit im Doktorandenbüro und die vielen außerdienstlichen Aktionen. Danke auch an Mirja, Alexandra und Anja, dass ihr euch immer Zeit für meine (vor allem statistischen) Problemchen genommen habt.

...allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Physiologischen Institutes für die tolle Unterstützung.

...meinen Ex-Kolleginnen Dr. Gesche, Dr. Diana, Dr. Jenny, Dr. Manuela und Dr. Meike – jetzt hab ich's auch geschafft!

...dem unvergleichlichen Hunderudel und vor allem Yasmin und Charis für die tollen Ausflüge auf die Bult bei Wind und Wetter.

## Danksagung

---

...vor allem aber meiner fantastischen Familie und meinem Freund Jens, die mich immer unterstützt, aufgebaut, abgelenkt, bekocht, motiviert, finanziert, umsorgt und geliebt haben.

**DANKE!**