

Forschungsbericht

Nr. 111

Einsatz von Immunstimulatoren als Alternative zu Leistungsförderern in der Schweinehaltung

Simone Schmitz

Stephanie Hiss

Helga Sauerwein

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2297; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Untersuchungen im Auftrag des Ministeriums für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen
Bonn, September 2003

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein

Projektbearbeiter: Dr. med. vet. Stephanie Hiss
Tierärztin Simone Schmitz

Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere
Katzenburgweg 7-9
53115 Bonn
Tel.: 0228 - 73 2804

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	2
1.1 Problemstellung und Wissensstand.....	2
1.2 Zielsetzung	5
2. Material und Methoden	6
2.1 Versuch I (Rheinbach)	6
2.2 Versuch II (Frankenforst).....	7
2.3 Versuch III (Frankenforst; „Provokationsversuch“)	8
2.4 Versuch IV (Frankenforst; Untersuchungen am Darm).....	8
2.5 Laboranalytische Untersuchungen in Blut	8
2.5.1 Parameter der unspezifischen Abwehr	9
2.5.2 Parameter der spezifischen Abwehr	10
2.5.3 Oxidativer Stress und antioxidative Kapazität	12
2.6 Immunhistochemische Untersuchungen am Darm	14
2.6.1 Anfertigen von Gefrierschnitten.....	14
2.6.2 Immunhistochemie	14
2.7 Methoden der statistischen Auswertung	16
3. Ergebnisse	17
3.1 Ergebnisse aus Versuch I	17
3.2 Ergebnisse aus Versuch II	19
3.3 Ergebnisse aus Versuch III.....	28
3.4 Ergebnisse aus Versuch IV	36
4. Diskussion	38
4.1 β -Glukan-Wirkungen auf die Mastleistung.....	38
4.2 Wirkungen von β -Glukanen auf einzelne Immunparameter	39
5. Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis	44
6. Literaturverzeichnis	45
7. Anhang	48
8. Konsequenzen für eventuelle weitere Forschungsaktivitäten	53
9. Mitteilung über evtl. schützenswerte Nutzungsrechte	54
10. Liste über Veröffentlichungen	54
11. Liste über Vorträge	54
12. Liste über Pressemitteilungen	55
13. Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen und Demonstrationen	55
14. Kurzfassung	56

1. Einleitung

1.1 Problemstellung und Wissensstand

Der Einsatz antibiotischer Leistungsförderer in der Tierhaltung stößt seitens der Verbraucher, aber auch zunehmend seitens der Wissenschaft auf immer größer werdenden Widerstand. Diese ablehnende Haltung beruht primär auf möglichen Gesundheitsrisiken, die sich für den Verbraucher ergeben könnten. Hierbei stehen nicht die Rückstände der Wirkstoffe in Produkten tierischer Herkunft im Vordergrund, sondern die Möglichkeit der Resistenzbildung bei einzelnen Keimen, die mittels horizontalen Gentransfers auch an andere, humanpathogene Erreger weitergegeben werden könnten. Damit würde die Zahl wirksamer Therapeutika eingeschränkt; schlimmstenfalls stünden gar keine Arzneimittel mehr zur Verfügung, um bestimmte Keime zu bekämpfen. Aktuell wird weltweit über eine Zunahme Penicillin-resistenter Pneumokokken und die damit verbundenen Therapieprobleme berichtet; in Deutschland erregte in diesem Zusammenhang der Fall des Schauspielers Günther Strack großes Aufsehen.

Darüber hinaus wird der Einsatz von chemischen Substanzen zum Zwecke der Leistungssteigerung generell in Frage gestellt, weil damit nur Missstände in der Haltung verdeckt würden. Auch hinsichtlich des Eintrags der Substanzen in Böden und Gewässer werden Bedenken angemeldet.

Auch in der Schweinehaltung wurde der Einsatz antibiotischer Leistungsförderer in den vergangenen Jahren immer weiter eingeschränkt. Die Europäische Gemeinschaft hat 2001 das Verbot der Verwendung von Wachstumsförderern in der Tierernährung als ein Element ihrer Strategie gegen die Bildung von Antibiotikaresistenzen definiert. Von den früher insgesamt 11 zugelassenen Leistungsförderern sind heute nur mehr vier Substanzen, davon drei für die Schweinehaltung zugelassen: Avilamycin, Flavophospholipol und Salinomycin-Natrium. Auch diese Substanzen werden ab 1. Januar 2006 verboten; für Avilamycin hat der Rat mit qualifizierter Mehrheit beschlossen, die Zulassung um 10 Jahre zu verlängern.

Zwar sind die genannten Risiken, die in Zusammenhang mit antibiotischen Leistungsförderern diskutiert werden, keineswegs unumstritten (CROMWELL, 2002). Aus der Sicht der Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung (AWT), Bonn und des Bundesverbandes für Tiergesundheit (BFT), Bonn, gibt es für die Entscheidung der EU keine stichhaltige wissenschaftliche Begründung. Diese Verbände weisen darauf hin, dass antibiotische Leistungsförderer seit Jahrzehnten als Futterzusatzstoffe gezielt vom Landwirt in der Tierhaltung zur Verbesserung der Futtermittelverwertung eingesetzt werden. Dies ist auch

von hoher Umweltrelevanz. Die Anwendung von antibiotischen Leistungsförderern unterliegt in der EU strengen Zulassungsverfahren und Verwendungsvorschriften. Bei wissenschaftlich begründeten Zweifeln an der Unbedenklichkeit sind in der Vergangenheit bereits Substanzen vom Markt genommen worden.

Unabhängig von der sachlichen Richtigkeit der von den einzelnen Interessengruppen formulierten Argumente für oder gegen den Einsatz von Fütterungsantibiotika, erfordern sowohl die gesetzlichen Rahmenbedingungen als auch die Ablehnung durch den Verbraucher eine entsprechende Anpassung in der Schweinefleischerzeugung. Die Schweiz und Schweden haben Kompletterbote für antibiotische Leistungsförderer bereits umgesetzt. Wie sich zeigt ist der Verzicht auf die erhöhten Wachstumsleistungen relativ unproblematisch, Anlass zur Sorge geben aber Beobachtungen wonach z.T. die Tiergesundheit eingeschränkt ist. In Schweden, wo das Verbot seit 1986 besteht, war zwar die Erzeugung von Schlachtschweinen nicht betroffen, bei Aufzuchtferkeln entstanden aber klinische Probleme, die zu einer gesteigerten Nachfrage für antibiotisch mediziertes Futter in therapeutischen Dosen führten. In den folgenden vier Jahren war eine Steigerung im Verbrauch von Antibiotika zu verzeichnen, bis zu 75% der Schweine waren betroffen. Danach verbesserte sich aber die Situation, was primär auf verbesserte Konditionen in der Haltung, aber auch auf den vorübergehenden Einsatz von Zinkoxid zurückgeführt wird. 1999 sollen nur mehr 5% der Ferkelerzeuger antibiotika-haltiges Futter und nur 17% Zink eingesetzt haben (WIERUP, 2001).

Um heute unter den herrschenden Vorgaben Schweine so zu halten, dass sie gesund sind und dabei vom ökonomischen Standpunkt aus effizient leisten, werden verschiedene Ansätze diskutiert. Neben Veränderungen in der Haltungsumwelt, die Verbesserung des Hygienestatus bewirken sollen (MADEC et al., 1998; JOACHIM et al., 2001), werden auch züchterische Bemühungen um einen verbesserten Immunstatus (WILKIE & MALLARD, 1999; WIMMERS et al., 2003) sowie verschiedene Futterzusätze zur Optimierung der Darmflora bzw. zur Stimulation des Immunsystems vorgeschlagen (u.a. WHITE et al., 2002; ALEXOPOULOS et al., 2001; MATSUZAKI & CHIN, 2000).

Hinsichtlich der Futterzusätze sind selbstverständlich die Vorgaben des Futtermittelrechts zu beachten; aus der Liste der zugelassenen Futterzusatzstoffe kommen derzeit primär Mikroorganismen wie Hefen und einzelne Enterococci-, *Pediococcus*-, *Bacillus*-, *Lactobacillus*-Stämme in Frage. Zwar werden diese Produkte stark beworben, für ihre Wirksamkeit finden sich aber in der wissenschaftlichen Fachliteratur nur vereinzelt Hinweise (z.B. BAUM et al., 2002; JADAMUS et al., 2002). Neben den genannten Mikroorganismen werden auch Algen-, Kräuter- Pflanzen-, Pilz- oder Hefezell-extrakte eingesetzt. Auch hier ist

bislang wenig an wissenschaftlich gesicherten Erkenntnissen zur Wirksamkeit verfügbar. Für einzelne Komponenten wie etwa Knotentang (*Ascophyllum nodosum*) sind positive Effekte auf die Wachstumsentwicklung und einzelne Immunparameter beim Schwein belegt (TURNER et al., 2002). Pflanzen- bzw. Kräuterextrakte wie z.B. aus Oregano werden aktuell v.a. im Geflügelbereich als fleischqualitätsverbessernd diskutiert (BOTSOGLOU et al., 2002).

Präparationen, die aus Hefenzellwänden bzw. auch aus Pilzen gewonnen werden und die reich an speziellen Glukose-Polymeren, den (1→3), (1→6)-β-D-Glukanen sind, erscheinen potentiell besonders geeignet den Immunstatus zu verbessern, weil hier bereits nähere Vorstellungen zum Wirkungsmechanismus entwickelt werden konnten (WILLMENT et al., 2001). Die grundlegende Struktur ist in Abbildung 1 gezeigt.

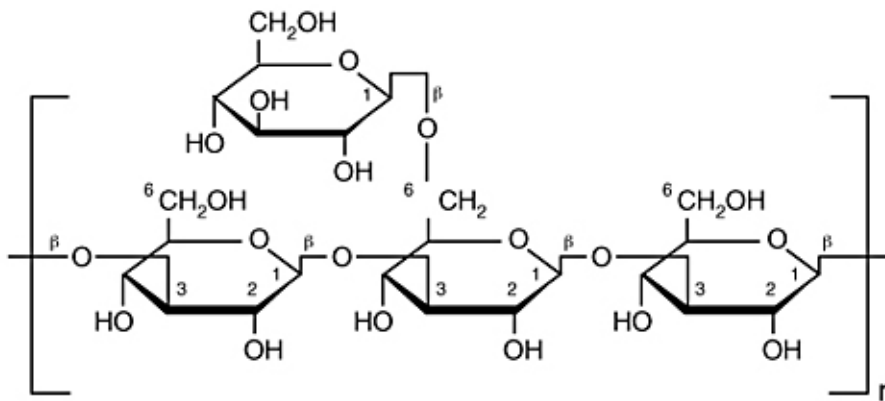


Abbildung 1: Molekularer Aufbau von β-Glukan (aus: YANAKI et al., 1983)

Die angesprochenen (1→3), (1→6)-β-D-Glukane, im Folgenden gekürzt als β-Glukane bezeichnet, werden derzeit v.a. in der Aquakultur eingesetzt. Den Berichten zufolge ist bei Gabe von β-Glukanen die Widerstandsfähigkeit der Fische gegenüber verschiedenen Pathogenen erhöht (SIWICKI et al., 1994). In Hinblick auf die immunstimulativen Wirkungen bei Säugetieren fällt auf, dass der Nachweis derartiger Effekte von β-Glukanen überwiegend auf parenterale Verabreichungsmodi beschränkt bleibt. Für die orale Applikation, die ja beim Einsatz in der Schweinehaltung vorzuziehen ist, existierten hingegen erst wenige Studien.

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es den potentiellen Nutzen von den o.g. β -Glukanen speziell bei Absetzferkeln zu untersuchen. Das Absetzen von der Muttersau bedeutet eine besondere Belastung für die Tiere, weil hier gleichzeitig die Trennung von der Mutter, die Bildung neuer Gruppen mit Rankämpfen, die Veränderung der Haltungsumwelt und, damit der Keimflora sowie eine gravierende Futterumstellung erfolgen. Das Immunsystem ist zu diesem Zeitpunkt, üblicherweise im Alter von vier Wochen, noch nicht voll funktionstüchtig. Diese Zeit ist somit als die Phase zu betrachten, in der Pathogene besonders gute Bedingungen vorfinden und die Ferkel entsprechend leicht krank werden können. Durchfallerkrankungen sind jetzt besonders häufig und ziehen oftmals auch andere Erkrankungen, etwa der Atemwege nach sich (SVENSMARK et al., 1989).

Der Einsatz von immunstimulierenden Wirkstoffen könnte daher gerade in dieser Zeit besonders geeignet sein, die Tiere zu unterstützen bis die Anpassung erfolgt ist.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten neben der Erfassung der Wachstumsentwicklung der Tiere speziell den Immunstatus zum Gegenstand um die behauptete immunstimulative Wirkung objektivieren zu können. Die Untersuchungen erfolgten in unterschiedlichen Betrieben, weil nach Hinweisen aus der Literatur der Hygienestatus des Betriebes wesentlichen Einfluss auf die Wirksamkeit von β -Glukanen haben soll: bei verbesserungsbedürftigem Status ist die Wirkung relativ besser, als unter Bedingungen, die bereits als annähernd optimal gelten können (DRITZ et al., 1995).

Die Ergebnisse werden zeigen, ob die Leistungsparameter der Tiere verbessert werden können und ob tatsächlich eine messbare Auslenkung von immunrelevanten Faktoren erfolgt. Außerdem erfolgt eine grundsätzliche Charakterisierung der mit dem Absetzen einhergehenden Veränderungen bei den einzelnen untersuchten Parametern. Praktische Fragen der Dosierung bis hin zur Überdosierung werden geprüft. Um zu testen, ob β -Glukane ihre Wirkungen möglicherweise auch über das Darm-assoziierte Lymphsystem entfalten, wurde eine Studie mit Schlachtschweinen durchgeführt, diese wurden während der Fütterung mit β -Gukanen geschlachtet und Gewebeproben aus definierten Dünndarmabschnitten entnommen und histologisch sowie immunhistochemisch untersucht. Aus der Zusammenschau der Ergebnisse ist dann die Notwendigkeit einer immunmodulatorischen Unterstützung von Schweinen beim Absetzen abzuleiten und spezifisch der diesbezügliche Nutzen von β -Glukanen zu entscheiden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuch I (Rheinbach)

Der Versuch wurde mit 75 abgesetzten Ferkeln in einem geschlossenen Betrieb (Raiffeisen, Euskirchen) durchgeführt. Bei den Ferkeln handelte es sich um Kreuzungstiere (Pi x DE bzw. BHZP), die durchschnittlich vier Wochen alt waren. Die Tiere wurden in drei Gruppen unterteilt, deren Trockenfutter (RWZ-Start M, Zusammensetzung s. Anhang, Tab. 4) 0,015 % bzw. 0,03 % β -1,3/1,6-Glukane (Antaferm, Dr. Eckel GmbH, Niederrissen; Produktbeschreibung s. Anhang, Tab. 7) enthielt. Die Aufstallung der Tiere erfolgte in Buchten (acht bzw. neun Tiere pro Bucht) mit Teilspaltenboden. Der gesamte Versuch erstreckte sich über vier Wochen, der Versuchsablauf ist in Abb. 2 dargestellt. Einen Tag nach dem Absetzen wurde bei allen Tieren eine PRRS-Impfung (Ingelvac[®] PRRS MLV, Boehringer Ingelheim) durchgeführt. Die wöchentlichen Blutentnahmen erfolgten mit 1,2 x 40 mm bzw. 1,1 x 50 mm Kanülen (Braun) und 9 ml Lithium-Heparin-Monovetten (Sarstedt) aus der Vena cava cranialis. Zu Versuchsbeginn und Versuchsende wurden alle Tiere gewogen und von allen Tieren eine Blutprobe entnommen. Bei der 2., 3. und 4. Blutentnahme wurden nur vier Tiere pro Fütterungsgruppe beprobt. Die Futteraufnahme wurde pro Bucht mittels Rückwaage der Futterreste erfasst.

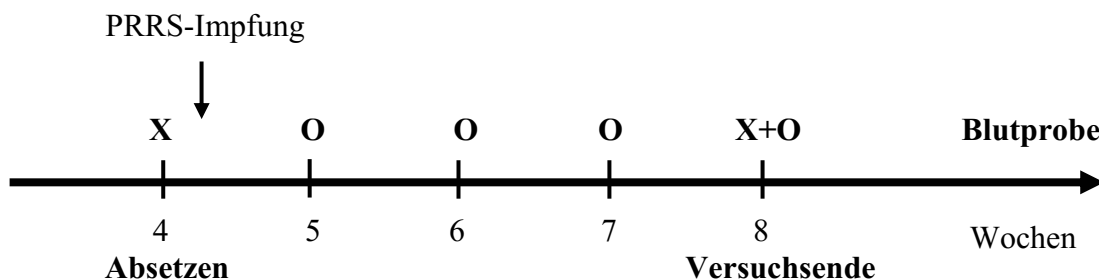


Abbildung 2: Experimentelles Design des β -Glukan-Versuches auf dem Raiffeisenhof in Rheinbach

2.2 Versuch II (Frankenforst)

Aus insgesamt drei Würfen der Kreuzung Pietrain x Deutsche Landrasse (Pi x DL) wurden 30 Ferkel für den Versuch bereitgestellt. Der Geburtstermin der Tiere variierte um maximal drei Tage. Um eine Beeinflussung der immunologischen Versuchsparameter hier so gering wie möglich zu halten, wurden keine Impfungen der Ferkel vorgenommen. Am ersten Lebenstag erhielten die Tiere eine Injektion des Macrolid-Antibiotikums Tylosin (Tylan[®], Elanco Animal Health, Indianapolis - USA) von jeweils 0,25 ml i.m.. Die Saugferkel erhielten ab dem 7. Lebenstag bis zum Umstallen ein konventionell erhältliches Alleinfuttermittel (Super-Früh, UNA-HAKRA, Hamburg; Zusammensetzung s. Anhang, Tab. 5). Beim Absetzen wiesen die Ferkel ein Alter zwischen 25 und 28 Tagen auf und wurden auf drei Gruppen mit je 10 Tieren aufgeteilt und in Buchten mit Teilspaltenboden aufgestellt. Am Tag des Umstallens begann der β -Glukan-Fütterungsversuch, wobei die Tiere der **Kontrollgruppe (KG)** über den gesamten Versuchszeitraum ein Ferkelaufzuchtfutter erhielten, das sich aus Konzentrat (TRUMPF Solo F, UNA-HAKRA, Hamburg; Zusammensetzung s. Anhang, Tab. 6) und hofeigenem Getreide (Nährstoffgehalt der Ration s. Anhang) zusammensetzte. Es wurde ad libitum angeboten. Beide **Behandlungsgruppen (BG1 und BG2)** erhielten das gleiche Futtergemisch, jedoch mit einem 0,03 %igen Zusatz eines β -1,3/1,6-Glukan-Präparates ("Antaferm-MG", Dr. Eckel GmbH, Niederzissen). Nachdem der 1. Versuch in Rheinbach Hinweise auf eine bei β -Glukan-Futterzusatz gesteigerte Futteraufnahme erbracht hatte, wurde das Futterangebot wie folgt variiert: BG1 wurde das Futter ad libitum angeboten, während BG2 restriktiv versorgt wurde. Die hierbei angebotene Futtermenge orientierte sich am aufgenommenen Futter der Kontrollgruppe in den vorangegangenen 24 Stunden. Eine Überprüfung der aufgenommenen Futtermenge wurde durch tägliches Rückwiegen der Futtertröge gewährleistet. Die Verabreichung von β -Glukan-haltigem Futter erstreckte sich über einen Zeitraum von insgesamt vier Wochen. Im Anschluss daran wurden alle drei Gruppen mit dem herkömmlichem Futter ohne jeglichen Zusatz weiterversorgt.

Die erste Blutentnahme erfolgte vor Beginn der Fütterung mit β -Glukan-haltigem Futter, um Basiswerte erstellen zu können. Die Tiere wiesen zu diesem Zeitpunkt ein Alter von durchschnittlich 19 Tagen auf. Die nachfolgenden Probenentnahmen fanden in wöchentlichem Abstand während der Fütterungsphase statt. Die letzte Blutprobe wurde ca. 2 Wochen nach Ende der β -Glukangaben entnommen; die Tiere waren im Durchschnitt zu dieser Zeit 68 Tage alt.

Für spätere Untersuchungen verschiedener Parameter wurden die heparinisierten Blutproben 20 Minuten bei 1.800 g und einer Temperatur von 8 °C zentrifugiert (Heraeus Christ GmbH, Osterode/Harz; Typ 5917), anschließend aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

2.3 Versuch III (Frankenforst; „Provokationsversuch“)

Versuchsbetrieb, -aufbau und -durchführung entsprechen dem unter Punkt 2.2 beschriebenen Versuch II. Die Geburtstermine der in diesem Versuch verwendeten Tiere unterschieden sich um maximal zwei Tage. Am Tag des Absetzens wiesen die Tiere ein Alter zwischen 29 und 31 Tagen auf. Das Fütterungsregime stimmt mit dem in Versuch II beschriebenen überein, jedoch wurde für die Fütterung nach dem Absetzen eine β -Glukankonzentration von 0,3 % gewählt. Die Tiere beider Behandlungsgruppen erhielten über insgesamt 3,5 Wochen das glukanhaltige Futter. Die Entnahme der Blutproben entspricht der obigen Beschreibung für den Versuch mit niedriger β -Glukankonzentration. Zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme hatten die Tiere ein mittleres Alter von 23 Tagen. Während der Fütterungsperiode wurden die Proben wöchentlich entnommen. Nach Ende der Fütterung erfolgte eine zweimalige Entnahme von Blutproben, wobei die letzte Entnahme ca. 2,5 Wochen nach Abschluss des Fütterungsversuchs lag. Die Tiere waren zu dieser Zeit im Durchschnitt 71 Tage alt.

2.4 Versuch IV (Frankenforst; Untersuchungen am Darm)

Möglicherweise entfalten β -Glukane auch eine direkte Wirkung am Darm, am Darm-assoziierten Lymphsystem. Um dies zu überprüfen, wurden von 17 Mastschweinen (Pi x DL) während der zwei Wochen vor der anstehenden Schlachtung 8 Tiere mit dem normalen Mastfutter, und 9 Tiere mit normalem Mastfutter, das 0,03% Antaferm enthielt, gefüttert. Die Schlachtung erfolgte bei einem Lebendgewicht von durchschnittlich 105 kg.

Zur Schlachtung wurden die Schweine frühmorgens zum Schlachthof nach Hamm transportiert. Unmittelbar nach der Schlachtung der Tiere wurde aus dem Darmtrakt das Ileum herausgetrennt, mit physiologischer Kochsalzlösung (Braun, Melsungen) gereinigt und in ca. 1-2 cm große Stücke zerlegt. Diese wurden fixiert (Tissue-Tek®, O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Zoeterwoude - Niederlande) und mittels Flüssigstickstoff eingefroren.

Bis zur Weiterverarbeitung wurden sie bei -80 °C aufbewahrt.

2.5 Laboranalytische Untersuchungen in Blut

Sind schädigende Mikroorganismen nach Überwindung der natürlichen mechanischen und chemischen Barrieren in den Organismus gelangt, werden sie mit einem zweigliedrigen Abwehrsystem konfrontiert. Zum einen sind unspezifische Schutzmechanismen wirksam, zum anderen entwickeln sich spezifische Schutzmechanismen.

Zur **unspezifischen Abwehr** gehören die zellulären Mechanismen der Phagozytose. Hierbei nehmen bestimmte weiße Blutzellen, die Phagozyten, d. h. die Makrophagen und die Neutrophilen Granulozyten, die als „fremd“ erkannten Partikel auf und machen sie

unschädlich. Die Phagozyten sind dabei auch in der Lage toxische Sauerstoffverbindungen zu bilden, die dann die Mikroorganismen durch Oxidation abtöten können. Das Bildungsvermögen für die toxischen Sauerstoffspezies wird als „respiratory burst“ bezeichnet. Die Effektivität der zellulären Abwehr ist auch von humoralen Faktoren abhängig, dazu gehört u.a. auch das Akute-Phase-Protein Haptoglobin. In den vorliegenden Untersuchungen wurden folgende Parameter der unspezifischen Abwehr erfasst: Phagozytoseaktivität, oxidativer Burst und Haptoglobin.

Zur **Spezifischen Abwehr** rechnen die nach Kontakt mit einem Antigen von bestimmten Lymphozyten gebildeten Immunglobuline, die diese Antigene binden und in der Folge unschädlich machen können. Während einer Immunreaktion vermehren sich die spezifischen Lymphozyten (Lymphozytenproliferation) um ihren Aufgaben nachkommen zu können.

Die verschiedenen Immunglobuline werden in Isotypen eingeteilt (IgG, IgM, IgA und IgE) und unterscheiden sich strukturell und funktionell. Mengenmäßig stellt IgG das Hauptimmunglobulin dar, es wird vermehrt nach weiteren Antigenkontakten gebildet. Diagnostisch können innerhalb der IgGs die gegen bestimmte Antigene gerichteten IgGs differenziert werden; die Menge spezifischer Antikörper wird i.a. als Titer angegeben. IgA ist vorwiegend lokal an Schleimhäuten als sogenannter sekretorischer Antikörper zu finden. Im menschlichen Blutserum macht IgA etwa 15-20% der gesamten Immunglobuline aus.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die Lymphozytenproliferation, die Blutserumkonzentrationen an IgG und IgA sowie die Titerhöhen eines spezifischen, gegen PRRS (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) gerichteten IgGs bestimmt.

2.5.1 Parameter der unspezifischen Abwehr

2.5.1.1 Phagozytoseaktivität und oxidativer Burst

Die Phagozytoseaktivität sowie der oxidative Burst der neutrophilen Granulozyten wurde in heparinisiertem Vollblut gemessen. Die Messungen sind auf die Versuche II und III beschränkt; dort fanden sie vor, während und nach der Fütterung mit β -Glukan-haltigem Futter statt. Die Untersuchungen umfassten jeweils drei aufeinanderfolgende Tage, wobei pro Tag drei Tiere einer jeden Gruppe beprobt wurden. Damit wurden insgesamt neun Tiere jeder Gruppe in diese Messungen miteinbezogen. Für die Untersuchungen wurden kommerziell erhältliche Testkits der Firma Orpegen Pharma, Heidelberg eingesetzt. Die Durchführung orientierte sich an den Arbeitsanweisungen der Firma Orpegen.

Hierzu wurden vor dem schon erwähnten Zentrifugieren der Blutproben jeweils 100 μ l aus den Heparin-Monovetten entnommen und in 5 ml Rundbodenröhrchen (Becton-Dickinson,

Falcon[®], Franklin Lakes, NJ - USA) überführt. Sowohl die Messung der Phagozytoseaktivität als auch des oxidativen Burst wurde in Doppelbestimmungen vorgenommen und es wurde jeweils eine Negativkontrolle, ebenfalls zweifach angesetzt, mitgeführt. Zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität wurde jeder hierzu vorgesehenen Probe eine 1:2 verdünnte Bakterien-Suspension (Orpegen) von *Escherichia coli* zugegeben. Den Positivansätzen zur Messung der Burstaktivität wurde jeweils eine unverdünnte E. coli-Suspension (Orpegen) angeboten. Die Verdünnungsstufen der Bakterien wurden in einem vorab durchgeführten Testversuch ermittelt, wobei sich bei der jeweils erwähnten Verdünnungsstufe eine Phagozytoserate von 53% - 61% und eine Burstaktivität von 57% - 61% ergab.

Analyse mittels Durchflusszytometrie

Die Analyse erfolgte mit Hilfe des FACScan[™] (Becton-Dickinson) sowie des Messprogramms CellQuest[™]. Die Messung wurde bei 488 nm durchgeführt, wobei die Zellen zur Erfassung des oxidativen Burst innerhalb von 30 Minuten und die Zellen zur Ermittlung der Phagozytoseaktivität innerhalb von 60 Minuten nach Abschluss der Testdurchführung gemessen wurden. Pro Ansatz wurden 15.000 Zellen erfasst.

Die Auswertung wurde mit dem Softwareprogramm Win MDI 2.7 vorgenommen, wodurch eine quantitative Bestimmung der Phagozytose sowie des oxidativen Burst neutrophiler Granulozyten möglich war.

2.5.1.2 Haptoglobin

Das Akute-Phase-Protein Haptoglobin wurde mittels eines kompetitiven Enzymimmunoassays (ELISA) nach der von HISS et al. (2003) entwickelten Methode bestimmt. Hierbei wurde ein Antikörper gegen porcines Haptoglobin, gewonnen aus Kaninchenserum, eingesetzt. Die untere Nachweisgrenze liegt bei diesem Test bei 0,02 µg/ml. Es wurden mit Lithium-Heparin versetzte Blutproben verwendet.

2.5.2 Parameter der spezifischen Abwehr

2.5.2.1 Immunglobulin G (IgG)

Der Parameter Immunglobulin G wurde mit Hilfe eines Enzymimmuntests (ELISA) der Firma Bethyl (Montgomery, USA) in Plasma (Lithium-Heparin) gemessen. Es handelt sich bei diesem Verfahren um einen Sandwich-ELISA unter Verwendung eines monoklonalen, affinitätsgereinigten anti-porcinen-IgG-Fc-Antikörpers aus der Ziege (Nr. E 100-104). Es wurden ausschließlich kommerziell erhältliche Reagenzien verwendet (Bethyl, Nr. E 101).

Der angegebene Messbereich liegt zwischen 7,8 und 500 ng/ml.

In einer zunächst durchgeführten Testmessung wurde die erforderliche Probenverdünnung von 1:30.000 ermittelt. IgG-Messungen wurden in den Versuchen II und III vorgenommen.

2.5.2.2 Immunglobulin A (IgA)

Immunglobulin A wurde mit einem Enzymimmuntest (ELISA) nach dem Sandwichmodell bestimmt (Bethyl). Es kam ein monoklonaler, affinitätsgereinigter anti-porciner-IgA-Antikörper aus der Ziege (Nr. E 100-102) zum Einsatz. Die benötigten Lösungen wurden ebenfalls von der Fa. Bethyl (Nr. E 101) bezogen.

Die erfassbaren Messwerte liegen in einem Bereich zwischen 16 und 1000 ng/ml.

Die vorab ermittelte Probenverdünnung wurde auf 1:3.000 festgelegt. IgA-Messungen wurden in den Versuchen II und III vorgenommen.

2.5.2.3 Lymphozytenproliferation

Um den Einfluss der β -Glukane auf die spezifische Immunabwehr einschätzen zu können, wurde in Versuch I die Proliferation von Concanavalin-A stimulierten Lymphozyten untersucht. Direkt im Anschluss an die Blutentnahme wurden die Lymphozyten unter sterilen Bedingungen aus dem Vollblut der Ferkel isoliert und angezüchtet. 5 ml Histopaque®-1077 (Sigma, Cell Culture™) wurden mit 5 ml Vollblut, zu gleichen Teilen mit RPMI-1640 Medium Modified (Sigma, Cell Culture™) verdünnt, überschichtet und 20 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Lymphozytenring, der sich in der Phase zwischen Plasma und Dichtegradient gebildet hatte, wurde entnommen und mit PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D 8537, Sigma, Cell Culture™) gewaschen. Hierfür wurden die Lymphozyten in dem genannten Puffer suspendiert, bei 100 g 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in ca. 2 ml RPMI-1640 resuspendiert und nachfolgend die Zellzahl bestimmt. 40 μ l der Zellsuspension wurde mit einem gleichen Volumen 1%iger Trypanblaulösung (Trypanblau für Mikroskopie, Merck) vermischt und in eine Neubauerzählkammer gegeben. In dieser wurden 16 Quadrate ausgezählt und auf die Zellzahl in der Lymphozytensuspension hochgerechnet. Die Zellzahl wurde mit RPMI-1640 auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Anzucht der Lymphozyten fand in Mikrotiterplatten (Micro-Platte mit Abdeckplatte, TC, steril, Greiner, Frickenhausen) unter Zusatz von 10 % Hitze-inaktiviertem fetalen Kälberserum (Fetal Bovine Serum, F 7524, Sigma, Cell Culture™) statt. Jede Probe wurde in sechs-fach Bestimmung mit und ohne T-Zell-Mitogen (5 μ g/ml Concanavalin A (L 7647, Sigma, Cell Culture™) pipettiert, wobei 50.000 Zellen pro Kavität angezüchtet wurden. Die Inkubationszeit betrug vier Tage bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die weiteren Arbeitsschritte wurden mit dem kolorimetrischen Testkit Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Den angezüchteten Lymphozyten wurden 10 μ l BrdU-Lösung je Kavität zugegeben,

woraufhin sie vier Stunden bei 37 °C inkubierten. Nach zehnminütiger Zentrifugation der Mikrotiterplatte bei 300 g wurde der Überstand abgenommen und die Platten eine Stunde bei 60 °C getrocknet. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 200 µl FixDenat pro Kavität für 30 Minuten. Im Anschluss an die Blockierung mit Blockierungsreagenz für ELISA (Boehringer, Mannheim) und die Dekantierung wurde das 100-fach verdünnte Antiserum hinzugefügt (100 µl/Kavität) und 90 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde das Substrat hinzugefügt (100 µl/Kavität) und nach 25 Minuten mit 2 M H₂SO₄ abgestoppt. Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen. Es wurde auf jeder Platte eine Hintergrundkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Der Quotient aus der Extinktion von stimulierten Zellen zu nicht-stimulierten Zellen ergibt den Lymphozytenproliferationsindex.

2.5.2.4 PRRS-Titerbestimmung

Der PRRS-Titer wurde in Versuch I im Plasma aller Tiere vor der Vakzination (1. Blutprobenentnahme) und nach der Vakzination (5. Blutprobe) in einem Labor für Veterinärdiagnostik (IVD GmbH, Hannover) mittels ELISA bestimmt.

2.5.3 Oxidativer Stress und antioxidative Kapazität

Der Begriff „oxidativer Stress“ steht generell für alle Imbalancen zwischen der Entstehung von Oxidantien und den entsprechenden Abwehrsystemen des Organismus (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Zu den wichtigsten Oxidantien zählen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen sowie schwefelhaltige Radikale. Daneben existiert eine Vielzahl anderer, als Oxidantien relevanter Substanzen.

Betroffen von oxidativem Stress sind Proteine, Lipide, Kohlenhydrate, aber auch die Nucleinsäuren, die Struktur- und Funktionsverluste erleiden können. Von besonderer Bedeutung sind die schädigenden Wirkungen an den Zellmembranen, die zu Störungen wichtiger Transport- und Kompartimentierungsfunktionen führen können. Physiologischerweise ist der Organismus zumindest teilweise in der Lage die entstandenen Radikale abzufangen und ihre schädigende Wirkung zu neutralisieren. Diese Fähigkeit wird als antioxidative Kapazität bezeichnet.

2.5.3.1 Oxidativer Stress

Aufgrund der hohen Reaktivität von freien Radikalen ist deren direkte Messung in biologischen Proben nicht möglich. Die hier verwendete Methode (ALBERTI et al., 2000) basiert auf der direkten Messung von Hydroperoxiden in biologischen Proben. Dabei wird ein relativ stabiles radikalisiertes Kation, das in Gegenwart von Alkoxy- und Peroxyradikalen aus

der Probe gebildet wird, durch Zugabe von N,N-diethyl-para-phenylendiamine (DEPPD) quantitativ erfasst.

Die Messung des oxidativen Stress erfolgte mit Hilfe des D-ROM®-Gerätes (**d**erivatives of **r**eactive **o**xxygen **m**etabolites, Callegari, Parma, Italien) bei 505 nm. Das Messprinzip beruht auf der katalytischen Eigenschaft von Übergangsmetallen, die mit Peroxiden in der Probe interagieren und damit zur Bildung freier Radikale führen. Die Peroxide fungieren dabei als Indikatoren für oxidativen Stress (CESARONE et al., 1999).

Die Messungen wurden in den Versuchen II und III im Stall unmittelbar nach der Blutentnahme in Vollblut vorgenommen, wobei die Untersuchungen insgesamt dreimalig durchgeführt wurden: vor, während und nach der Fütterungsphase. Je Untersuchung fanden die Messungen jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen statt, indem pro Tag 2 bis 3 Tiere je Gruppe beprobt wurden. Insgesamt wurde der oxidative Stress bei 8 Tieren pro Gruppe ermittelt. Die Messungen erfolgten mittels kommerziell erhältlicher Testkits (Callegari) mit je 20 µl Vollblut. Das Ergebnis der photometrischen Messung wird in Carratelli Einheiten (Carr. Units) angegeben, wobei 1 Carr. Unit = 8 mg H₂O₂ / l entspricht.

2.5.3.2 Antioxidative Kapazität

Zu den verschiedenen, indirekt erfassbaren Komponenten der Abwehrmechanismen gegenüber oxidativen Belastungen zählen zum einen die enzymatischen Systeme wie die selenhaltige Gluthationperoxidase, die Katalase oder die Superoxiddismutase. Zum anderen sind Mikronährstoffe als nicht-enzymatische Antioxidantien wie beispielsweise Vitamin C und E sowie β-Carotin von Bedeutung. Im Blut spielen Proteine mit Thiolgruppen wie z.B. Albumin oder Transferrin die größte Rolle. Diese Proteine limitieren die Entstehung von reaktiven Sauerstoffmolekülen, indem sie sog. Übergangsmetalle binden (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Für die Messung der antioxidativen Kapazität steht eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Verfügung. Neben der Quantifizierung der genannten hoch- und niedermolekularen Verbindungen bzw. Enzymaktivitäten durch zum Teil aufwändige Methoden (z.B. HPLC), existieren auch summarische Verfahren, anhand derer die gesamte integrative Wirksamkeit einer Probe, deren antioxidative Kapazität, erfasst werden soll. Ein relativ einfaches Verfahren, das auch bereits bei verschiedenen Nutztierspezies Anwendung gefunden hat, ist der sog. **TEAC-Test**. Hierbei wird die antioxidative Kapazität in Bezug auf eine Vitamin-E ähnliche Referenzsubstanz, Trolox, angegeben (**T**rolox **E**quivalent **A**ntioxidant **C**apacity). Das Testprinzip basiert auf der durch Antioxidantien induzierten Absorptionsabnahme einer spezifischen radikalischen Verbindung, ABTS (2,2'-Azinobis(3-

ethylbenzothiazolin-6-Sulfonat) innerhalb einer definierten Zeitspanne. Diese Absorptionsabnahme wird als Index für die antioxidative Kapazität verwendet (MILLER et al., 1993).

Die Messungen wurden in Serum durchgeführt. Ein Kontrollserum wurde stets mitgeführt. Der TEAC-Wert errechnete sich aus der Inhibition und der Gleichung der Troloxstandardgeraden. Der daraus ermittelte TEAC-Wert wurde anschließend einer Korrektur über das Kontrollserum nach folgender Gleichung unterzogen:

$$\frac{\text{TEAC: Probe}}{\text{TEAC: Kontrollserum}} \times \text{TEAC: Mittelwert des Kontrollserums aller Messungen}$$

2.6 Immunhistochemische Untersuchungen am Darm

2.6.1 Anfertigen von Gefrierschnitten

Die gefrorene Gewebeprobe wurde mit einem Eindeckmittel (Tissue-Tek®, O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Zoeterwoude - Niederlande) auf einen Block aufgebracht, der am Gefriermikrotom (Kryostat, Reichert-Jung, Nussloch; Institut für Anatomie, medizinische Fakultät der Universität Bonn) befestigt wurde. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 10 µm hergestellt, die auf elektrostatisch wirkende Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) gezogen wurden.

2.6.2 Immunhistochemie

Immunhistochemische Untersuchungen dienen dem Nachweis bestimmter Moleküle, hier von körpereigenen Proteinen, die als „Gewebsantigene“ mit Hilfe spezifischer Immunglobuline im histologischen Schnitt sichtbar gemacht werden. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch eine Markierung des entsprechenden Antikörpers sichtbar gemacht, wobei in dieser Arbeit eine indirekte Nachweismethode gewählt wurde. Die Antigene, die hier untersucht wurden, sind Faktoren des spezifischen Immunsystems: IgA ist als Immunglobulin bereits erwähnt worden; in den Versuchen II und III wurde es aus dem Blut quantifiziert. IgM ist das Haupt-Immunglobulin, das während der ersten Immunantwort, also bei erstmaligem Antigenkontakt produziert wird. Die weiter immunhistochemisch bestimmten Faktoren sind CD4 und CD8. Die beiden letztgenannten sind spezifische Strukturmerkmale der Oberfläche von bestimmten Subpopulationen der Lymphozyten. CD4 und CD8 sind beide typisch für die sogenannten T-Zellen: CD4 ist ein T-Zell-Rezeptor, der bestimmte Oberflächenmoleküle (MHC-Klasse-II-Moleküle) auf antigen-präsentierenden Zellen erkennt. CD8 kommt nur auf den T-Zellen vor, die abnormale oder fremde Zellen angreifen und abtöten können, das sind die sogenannten zytotoxischen T-Zellen.

Nach Herstellung der Gefrierschnitte wurden diese unmittelbar im Anschluss weiterverarbeitet. Es erfolgte zunächst eine Fixierung mit Methanol (10 min) und Aceton (1 min). Beide Lösungen wurden zuvor auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet. Nach einmaligem Waschen folgte eine Inkubation der Schnitte mit jeweils $300\text{ }\mu\text{l}$ des jeweiligen entsprechend vorverdünnten Primärantikörpers (IgA: 1:500; IgM: 1:200; CD4: 1:500; CD8: 1:800) in einer Feuchtekammer. Die genannten Konzentrationen der Antikörper waren anhand von Vorversuchen mit Verdünnungsreihen als optimal geeignet ermittelt worden. Bei den primären Antikörpern handelte es sich um monoklonale anti-porcine-Antikörper, die aus der Maus gewonnen wurden und gegen IgA, IgM, oder CD8 (Nr.: BZL03353; BZL03352; BZL01432; Biozol, Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching) bzw. CD4 (Nr.: 4515-01; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) gerichtet waren. Die Inkubation erfolgte über Nacht für durchschnittlich 16 Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Neben den Ileumproben wurden zudem als Kontrollgewebe Lymphknoten und Leber mitgeführt, ebenfalls vom Schwein stammend. Für jede der drei Gewebearten wurden Negativkontrollen angefertigt, wobei dann der primäre Antikörper durch das Verdünnungsmedium (PBS-Puffer) ersetzt wurde. Dadurch konnten eventuelle unspezifische Färbungen durch den sekundären Antikörper erfasst werden. Jeder positive und negative Nachweis wurde in einer Doppelbestimmung angesetzt. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Antikörperlösung mit Hilfe einer Saugpumpe (Miniport; Wilke & Witzel, Medizin- und Labortechnik, Hamburg) entfernt und die Schnitte dreimalig mit PBS gewaschen. Zur Unterdrückung der Aktivität der endogenen Peroxidase wurde eine in PBS unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzte 3,0 %ige H_2O_2 -Lösung in einem Volumen von $300\text{ }\mu\text{l}$ pro Schnitt eingesetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schnitten in der Feuchtekammer belassen. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden $300\text{ }\mu\text{l}$ des Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:100 in PBS auf alle Schnitte aufgebracht. Hierbei handelte es sich um einen polyklonalen, Peroxidase-konjugierten, affinitätsgereinigten Ziege-anti-Maus-Antikörper (Nr.: P 0447; Dako, Glostrup, Dänemark). Da nach Herstellerangaben eine Möglichkeit der Kreuzreaktivität mit porcinen Immunglobulinen von 4 % bestand, wurde zur Verminderung der Hintergrundfärbung der Antikörperlösung zuvor 10 % Schweineserum zugesetzt und für 30 Minuten vorinkubiert. Die Inkubationszeit auf den Gefrierschnitten betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Spülvorgang erfolgte die Enzym-Substrat-Reaktion, wobei AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol; Dako, Glostrup, Dänemark) als Substrat-Chromogen-System eingesetzt wurde. Es wurden jeweils $300\text{ }\mu\text{l}$ der gebrauchsfertigen AEC-Lösung aufgetragen und eine Inkubationszeit von 10-14 Minuten gewählt. Um die Reaktion zu beenden, wurden die Schnitte in Wasser gespült und mit Glycerin eingedeckt.

2.7 Methoden der statistischen Auswertung

Für Versuch I wurden die Daten mit dem Statistik-Programm SPSS 11.0 ausgewertet. Nach Prüfung auf Normalverteilung wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt um Unterschiede zwischen den Gruppen, bzw. innerhalb der Gruppen zwischen den Messzeitpunkten zu ermitteln.

Bei den Versuchen II, III und VI wurde für den Vergleich von Einzelmessungen zwischen den bzw. innerhalb der Gruppen ebenfalls mit SPSS 11.0 gearbeitet. Nach Prüfung auf Normalverteilung wurde entweder ein t-Test für unabhängige bzw. gepaarte Stichproben verwendet oder der nichtparametrische Test nach Mann-Whitney bzw. Wilcoxon gewählt. Alle Versuchsergebnisse sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte mit Standardabweichung oder Standardfehler ($\bar{x} \pm SD$ oder $\bar{x} \pm SEM$) dargestellt.

Für den statistischen Gesamtvergleich (Versuche II und III) wurden die Daten mit Hilfe des SAS® Systems 8e ausgewertet. Hierbei wurde als Unterprogramm das „Mixed Procedure“ gewählt, wobei zunächst anhand des AIC (Akaike's Information Criterion) die optimal geeignete Kovarianz-Struktur ermittelt wurde. Es konnte somit ein eventueller Einfluss der fixen Effekte Behandlung, Zeit sowie der Interaktion Behandlung x Zeit auf den gesamten Versuchszeitraum festgestellt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse aus Versuch I

Die Ergebnisse zur Wachstumsleistung der Tiere aus dem in Rheinbach durchgeführten Versuch sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Tägliche Lebendmassezunahmen (LMZ), Futteraufnahme (FA) und Futtermittelverwertung (FV) von abgesetzten Schweinen (Versuch I) bei Fütterung mit 0 (Kontrolle), 0,015 oder 0,03% β -Glukanen (Mittelwerte \pm SEM)

	Kontrolle	0,015% β -Glukane	0,03% β -Glukane
LMZ (g/Tag)	265 \pm 17	293 \pm 20 p = 0,51	307 \pm 22 p = 0,17
FA (g/day)	434 \pm 8	466 \pm 2 p = 0,33	501 \pm 5 p = 0,076
FV (g/g)	1,6 \pm 0.04	1.6 \pm 0.05 p = 0,8	1.6 \pm 0.02 p = 0,97

Die Gruppen wurden paarweise mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests verglichen. Die angegebenen p-Werte sind jeweils auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe bezogen.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren für die Tageszunahmen nicht signifikant, sondern lagen auf etwa gleichem Niveau im Bereich von knapp 300 g pro Tag. Für die Futteraufnahme deutete sich eine Tendenz ($p < 0,1$) zu erhöhten Werten bei den Tieren mit der höchsten hier getesteten β -Glukandosierung an. Hinsichtlich der Futtermittelverwertung war diese jedoch wieder nivelliert.

Während des Versuches zeigten die Tiere keine erkennbaren Zeichen von Gesundheitsstörungen und konnten als „gesund“ bezeichnet werden.

Hinsichtlich der Lymphozytenproliferation waren weder Gruppen- noch zeitbedingte Unterschiede zu erkennen.

Der Vergleich der Haptoglobinblutwerte zu Beginn und Ende der unterschiedlichen Fütterung erbrachte keine Hinweise auf Effekte der β -Glukane, zeigte aber deutlich, dass die Werte während des Versuches anstiegen ($p < 0,05$). Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, lagen die Werte nach der vierwöchigen Versuchsphase in allen Gruppen 4- bis 10-fach höher als die Ausgangswerte. Zusammenhänge mit der Wachstumsleistung der Tiere ergaben sich für Haptoglobin: bei Einteilung der Tiere entsprechend ihrer täglichen Zunahmen wurden bei den Tieren die höchsten Haptoglobinwerte erreicht, die am langsamsten wuchsen (Abbildung 4).

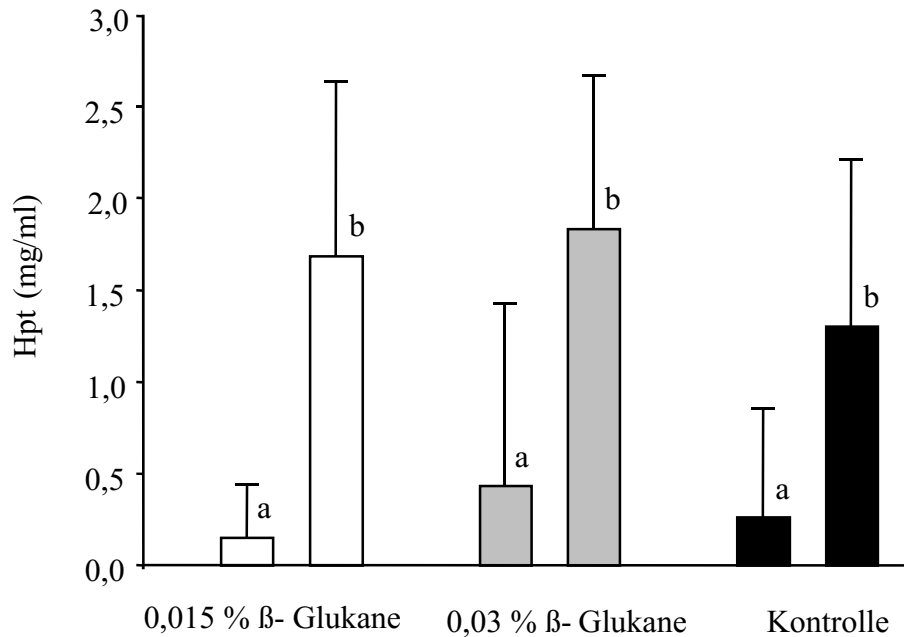


Abbildung 3: Haptoglobinblutkonzentrationen ($\bar{x} \pm SD$) bei Ferkeln aus den verschiedenen Fütterungsgruppen (Versuch I) zu Versuchsbeginn (linke Säule) und Versuchsende (rechte Säule); verschiedene Buchstaben kennzeichnen Unterschiede innerhalb der Gruppen ($p < 0,001$)

Ein ähnliches Bild ergab sich für die PRRS-Titer: auch hier lagen am Versuchsende erwartungsgemäß höhere Titer vor als zu Beginn und damit vor der PRRS-Impfung. Überraschend war aber, dass auch die nicht geimpften Tiere teilweise schon Titer hatten (27 von den insgesamt 75 Tieren). Dabei wurde auch eine Beziehung zur Wachstumsentwicklung deutlich: die Tiere, die schon vor der Impfung Titer hatten, wuchsen langsamer als die übrigen Tiere. Hinsichtlich der β -Glukangabe waren keine Effekte erkennbar: die durchschnittlichen Titerhöhen waren in allen Gruppen nicht unterschiedlich.

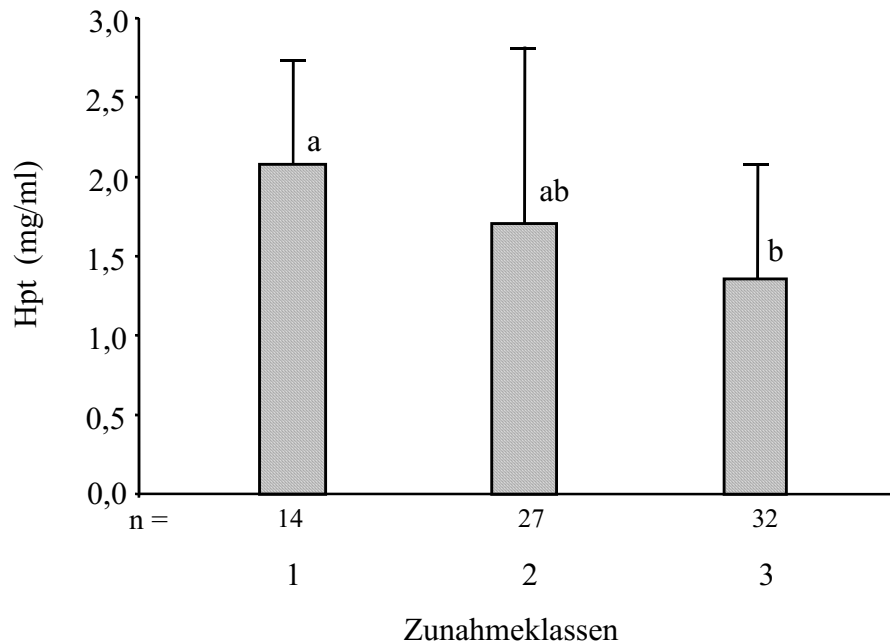


Abbildung 4: Haptoglobinkonzentrationen der Tiere aus Versuch I bei Versuchsende in Abhängigkeit von der Zunahmeklasse: Klasse 1 = 100-200 g Tageszunahme, Klasse 2 = 201-300 g, Klasse 3 = >301 g ($\xi \pm SD$); mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnete Werte unterscheiden sich ($p < 0,01$)

3.2 Ergebnisse aus Versuch II

In Versuch II, in dem nur mehr eine der beiden β -Glukan-Dosierungen aus Versuch I getestet wurde (0,03%), wurde das Spektrum der analysierten Parameter zum Immunsystem verändert: nachdem Versuch I gezeigt hatte, dass die Lymphozytenproliferation zu sehr individuell variiert, wurde dieser Parameter nicht weitergeführt. Statt dessen wurden zwei ergänzende Parameter zum unspezifischen Immunsystem, die Phagozytoseaktivität und die Burstraten mit einbezogen. Darüberhinaus wurde erstmals, in Erweiterung des ursprünglichen Antrags, auch oxidativer Stress, d.h. die Belastung mit freien Radikalen sowie die körpereigene, antioxidative Kapazität summarisch erfasst (s. Pkt. 2.5.3.1 und 2.5.3.2).

Nachdem sich in Versuch I angedeutet hatte, dass die β -Glukangabe möglicherweise stimulierend auf die Futteraufnahme wirkte, wurde dies im Versuchsdesign insofern berücksichtigt, als neben der Kontrollgruppe zwei Behandlungsgruppen gebildet wurden: beide Gruppen erhielten β -Glukan-supplementiertes Futter, einer Gruppe wurde wie in Versuch I das Futter ad libitum angeboten (= Behandlungsgruppe 1, BG 1), die andere

Gruppe erhielt ihr Futter restriktiv zudosiert und zwar gemessen an der am Vortag ermittelten Futteraufnahme der Kontrollgruppe (= Behandlungsgruppe 2, BG 2).

Während des Versuches traten bei den Tieren in der dritten Versuchswoche Durchfall- und Atemwegserkrankungen auf. Die Atemwegserkrankungen dominierten hierbei das Krankheitsbild. Diese Probleme betrafen den gesamten Bestand in Frankenforst und machten eine Behandlung nötig. Allen Tieren wurde daher zweimalig im Abstand von zwei Wochen eine Antibiotika-Injektion gegeben; die erste Behandlung erfolgte nach dem dritten Blutentnahmeterrin; die zweite nach dem fünften Termin. Hinsichtlich der mit β -Glukanen supplementierten Tiere war die Erkrankungsrate im Vergleich zu den übrigen Tieren nicht verändert; ein durch die vermutete Immunstimulation anzunehmender Schutzeffekt der β -Glukane gegenüber dem offenbar massiven Infektionsdruck war somit nicht gegeben.

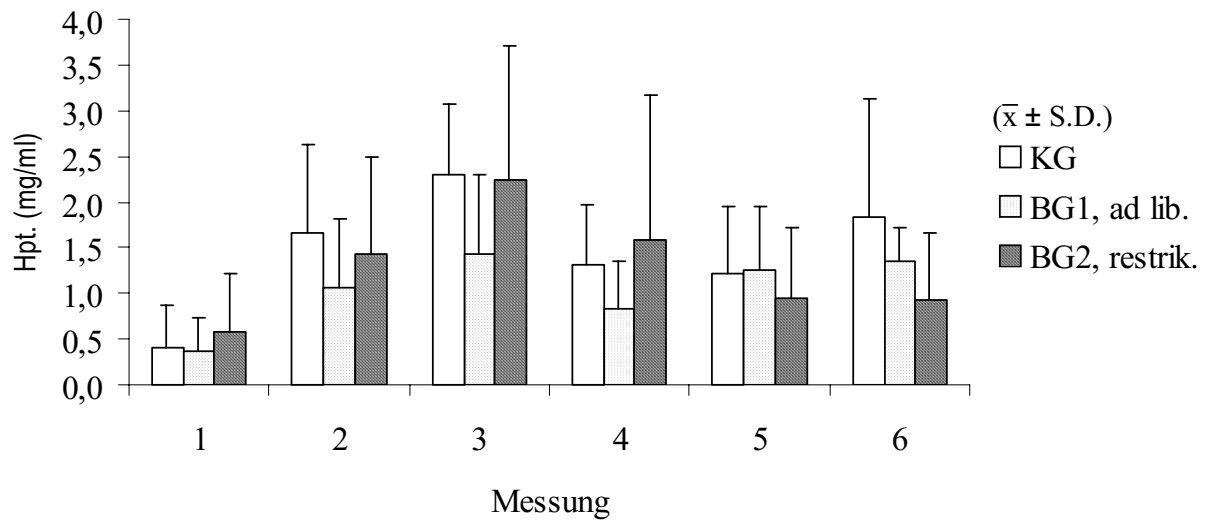
Die über den Versuch gemittelten Leistungsdaten sind in Tabelle 2 gezeigt. Die mittleren täglichen Zunahmen lagen in den beiden β -Glukan-gefütterten Gruppen eher niedriger als bei den Kontrolltieren; dies war aber, wie auch bei der (pro Bucht ermittelten) Futteraufnahme, statistisch nicht absicherbar. Da die Futteraufnahme nur per Bucht und damit pro Gruppe ermittelt werden konnte, ist ein statistischer Vergleich der Futtermittelnutzung nicht möglich.

Hinsichtlich der verschiedenen untersuchten Parameter zum Immunsystem und zu oxidativem Stress und antioxidativer Kapazität war bei allen Tieren, unabhängig von der Behandlung, die Belastung durch das Absetzen erkennbar. Alle untersuchten Parameter sind in den Abbildungen 5 – 9 b gezeigt.

Für den Parameter **Haptoglobin** (Abb. 5) war, wie schon in Versuch 1, ein inverser Zusammenhang mit der Gewichtsentwicklung sichtbar. Bei alleiniger Betrachtung der Kontrollgruppe waren nach dem Absetzen reduzierte Zuwachsraten zu verzeichnen, gleichzeitig stiegen die Haptoglobinkonzentrationen an ($r = -0,4$, $p = 0.006$). Diese Veränderung wurde durch die β -Glukangabe nicht kompensiert, hier zeigten sich analoge Konzentrationsveränderungen.

Table 2: Tägliche Lebendmassezunahmen (LMZ), Futtermittelaufnahme (FA) und Futtermittelvewertung (FV) von abgesetzten Schweinen bei Fütterung mit 0 (Kontrolle), oder 0,03% β -Glukanen (Mittelwerte \pm SEM); Futtermittelvorräte der β -Glukane ad libitum bzw. restriktiv.

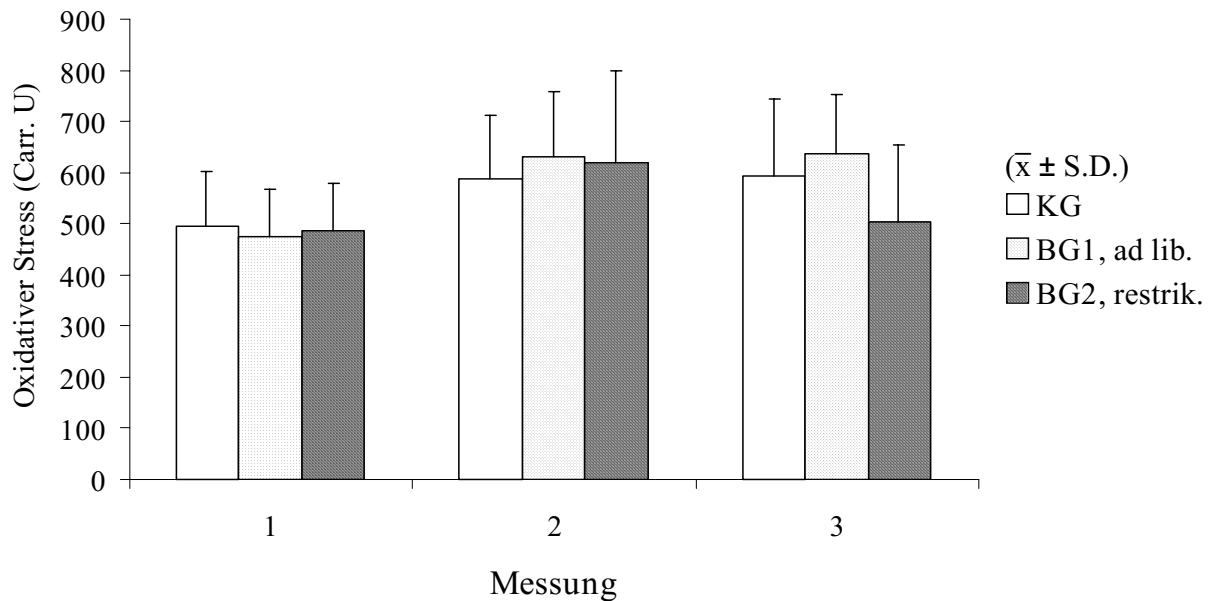
	Kontrolle	ad libitum	restriktiv, FA entsprechend der Kontrollen
LMZ (g/Tag)	428 \pm 25	375 \pm 27 p = 0,17	418 \pm 22 p = 0,78
FA (g/Tag)	693 \pm 1,5	585 \pm 1,7 p = 0,21	603 \pm 1,5 p = 0,21
FV (g/g)	1,6	1.6	1.4



Zeit x Behandlung: $p < 0,05$
 Zeit: $p < 0,05$

Abbildung 5: Haptoglobinkonzentrationen der Tiere aus Versuch II über den gesamten Versuchszeitraum;
 Futter ohne (KG) oder mit 0,03% β -Glukanen (BG1 und BG2);
 Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2);
 p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf

Bei dem Parameter „**Oxidativer Stress**“ (Abb. 6 a) waren nach dem Absetzen erhöhte Werte zu beobachten, die augenscheinlich nicht durch entsprechende Anpassungen der **antioxidativen Kapazität** (Abb. 6 b) ausgeglichen werden konnten, weil diese Werte unverändert blieben. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten für den oxidativen Stress weder in der Reaktion auf das Absetzen noch im weiteren Versuchsverlauf festgestellt werden. Für die antioxidative Kapazität ergaben sich im Vergleich der einzelnen Beprobungstermine nur bei der vierten Messung, d.h. nach dreiwöchiger β -Glukan-Supplementierung zu Ungunsten der Behandlungsgruppen Unterschiede zu den Kontrolltieren. Im statistischen Gesamtvergleich wurden Behandlung, Zeit und Zeit x Behandlung als signifikante Effektoren der antioxidativen Kapazität ermittelt ($p < 0,05$).

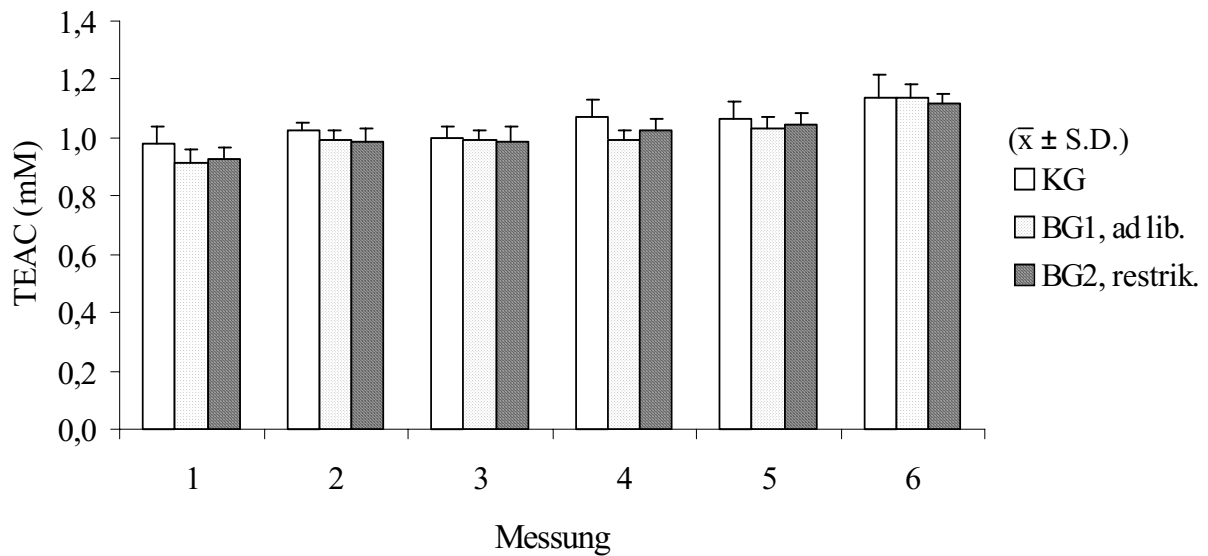


-Zeit: $p < 0,05$

Abbildung 6 a: Oxidativer Stress der Tiere aus Versuch II vor, während und nach der Fütterung;

Futter ohne (KG) oder mit 0,03% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2);

p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf



-Behandlung: $p < 0,05$
 -Zeit x Behandlung: $p < 0,05$
 -Zeit: $p < 0,05$

Abbildung 6 b: Antioxidative Kapazität der Tiere aus Versuch II über den gesamten Versuchszeitraum;

Futter ohne (KG) oder mit 0,03% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2);

p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf

Bei den **Burstraten** (Abb. 7) wurde eine Abnahme der Werte nach dem Absetzen verzeichnet, die nur bei den β -Glukan-gefütterten Tieren auch signifikant war. Bei Vergleich der Werte zwischen den Gruppen bestanden aber vor und während der Behandlung keine Unterschiede. Danach, nachdem die β -Glukane abgesetzt worden waren, waren bei den beiden vorab mit β -Glukanen behandelten Gruppen erhöhte Burstraten zu beobachten ($p < 0,05$). Im Gesamtvergleich nivellierten sich diese Unterschiede, d.h. nur die Zeit hatte hier einen Einfluss ($p < 0,05$) auf die Burstraten.

Die **Phagozytoseaktivität** (Abb. 8) war durch das Absetzen nicht verändert; Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich während der β -Glukanbehandlung, hier waren bei den Kontrolltieren jeweils höhere Werte als bei den beiden Behandlungsgruppen zu verzeichnen. Nach Absetzen der Glukane bestand dieser Unterschied aber nicht mehr; der statistische Gesamtvergleich ergab, dass weder Behandlung noch Zeit die Phagozytoseaktivität beeinflussten.

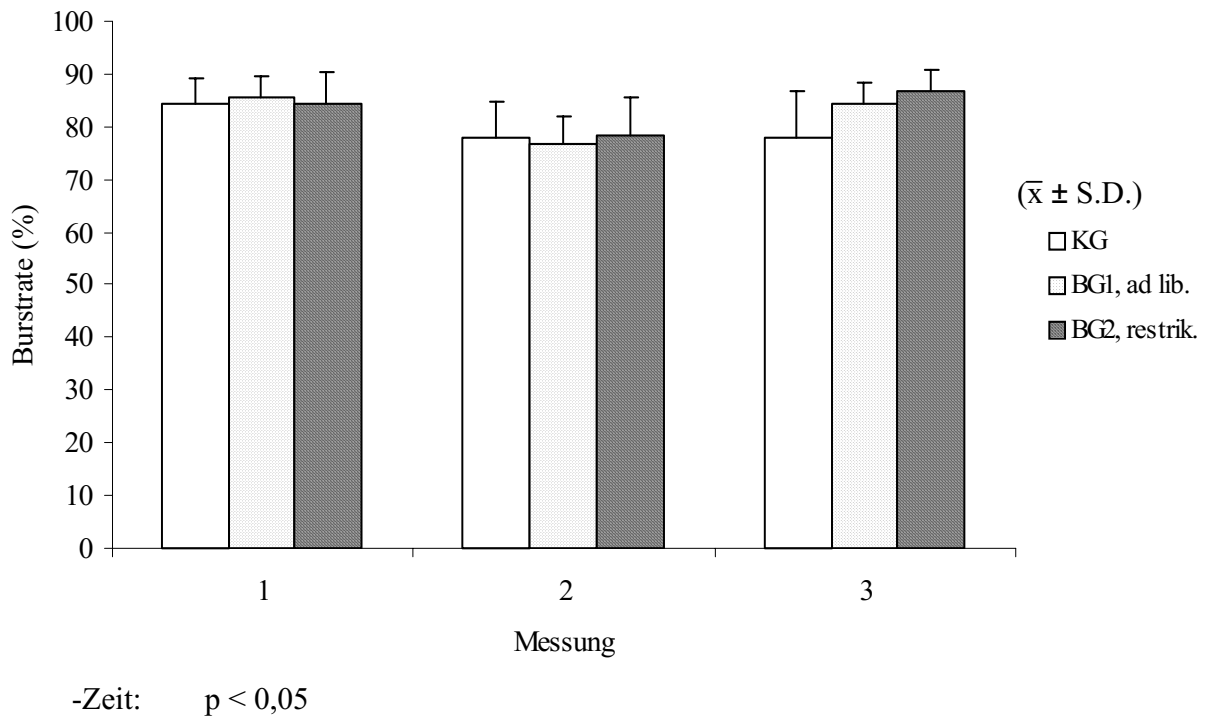


Abbildung 7: Burstrate der Tiere aus Versuch II vor, während und nach der Fütterung; Futter ohne (KG) oder mit 0,03% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2); p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf

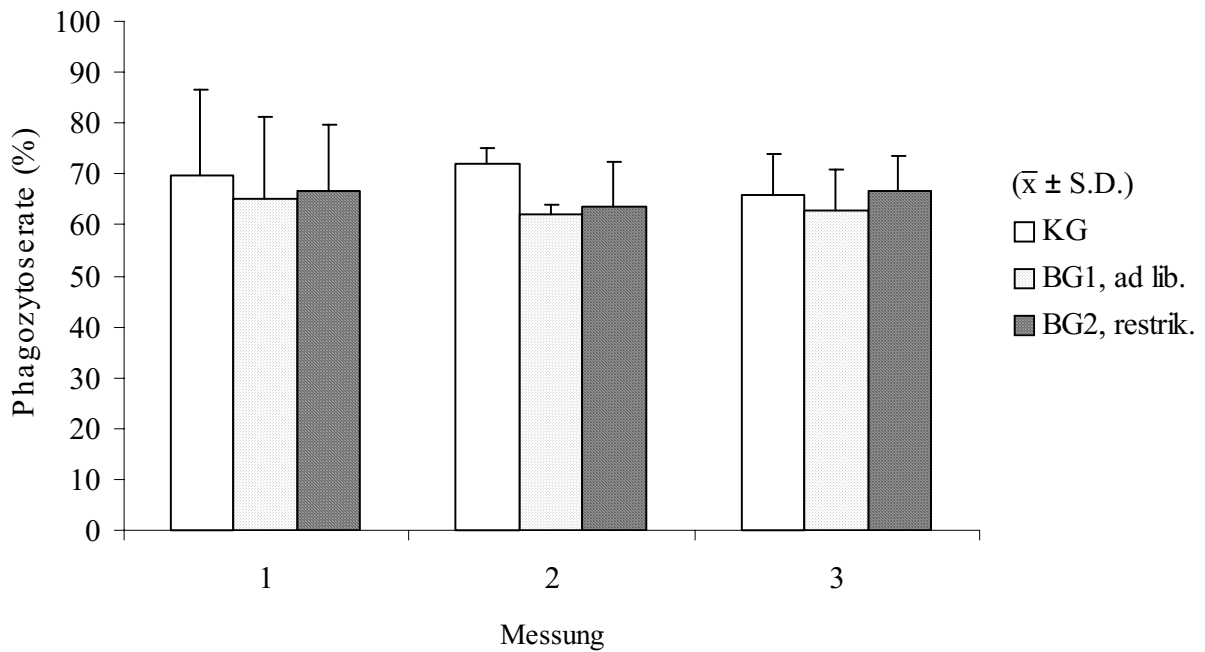
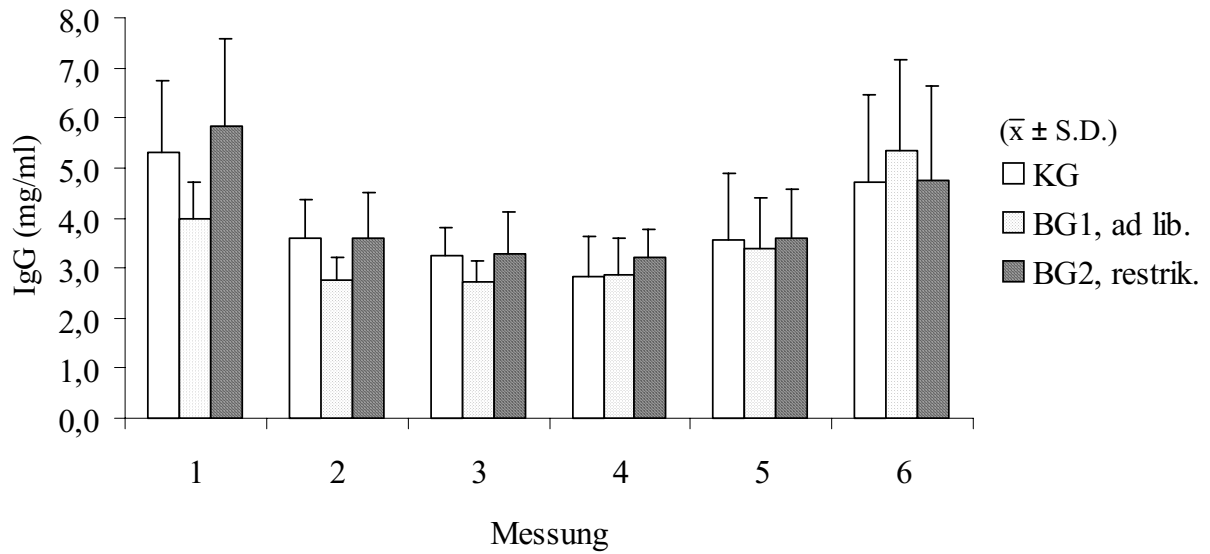


Abbildung 8: Phagozytoseaktivität der Tiere aus Versuch II vor, während und nach der Fütterung;

Futter ohne (KG) oder mit 0,03% β -Glukanen (BG1 und BG2);

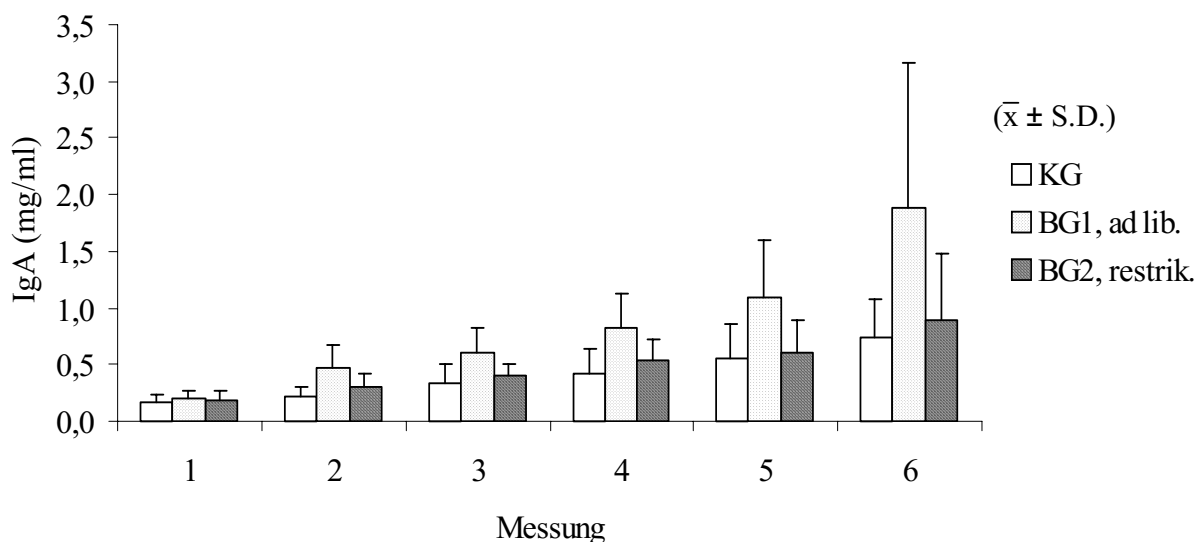
Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2)

Für die beiden Parameter des spezifischen Immunsystems, **IgG und IgA** waren charakteristische Zeitverläufe erkennbar (Abb. 9 a und b). Die IgG-Werte sanken mit dem Absetzen zunächst ab und erreichten erst bei der sechsten Messung, d.h. 2 Wochen nachdem alle Tiere das gleiche Futter erhielten, wieder die Ausgangsniveaus. Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich in der ersten, zweiten und dritten Messung; die Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden damit schon vor dem Absetzen. Im Gesamtvergleich war nur die Zeit ($p < 0,05$) signifikant. Die IgA-Blutwerte stiegen in allen Gruppen kontinuierlich an; die Tiere aus der β -Glukan gefütterten Gruppe, die das Futter ad libitum erhielt wies dabei ab dem Zeitpunkt des Absetzens über die gesamte Versuchsdauer hinweg die jeweils höchsten Werte auf. Die demgegenüber niedrigeren Werte der Kontrollgruppe und der restriktiv gefütterten Behandlungsgruppe unterschieden sich untereinander nicht. In der Zusammenschau hatten Behandlung, Zeit sowie Zeit x Behandlung Einfluss auf die IgA-Konzentration ($p < 0,05$).



-Zeit x Behandlung: $p < 0,1$
 -Zeit: $p < 0,05$

Abbildung 9 a: Immunglobulin G-Konzentrationen der Tiere aus Versuch II über den gesamten Versuchszeitraum;
 Futter ohne (KG) oder mit 0,03% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2);
 p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf



-Behandlung: $p < 0,05$
 -Zeit x Behandlung: $p < 0,05$
 -Zeit: $p < 0,05$

Abbildung 9 b: Immunglobulin A-Konzentrationen der Tiere aus Versuch II über den gesamten Versuchszeitraum;

Futter ohne (KG) oder mit 0,03% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2);

p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf

3.3 Ergebnisse aus Versuch III

In Versuch III wurde die Wirkung einer gegenüber Versuch II zehnfach-überhöhten β -Glukanzugabe in einem ansonsten analogen Versuchsdesign geprüft. Auch die untersuchten Parameter waren identisch.

In diesem Versuch blieben die Tiere durchweg gesund und zeigten keinerlei Symptome, die auf etwaige Gesundheitsstörungen gedeutet hätten.

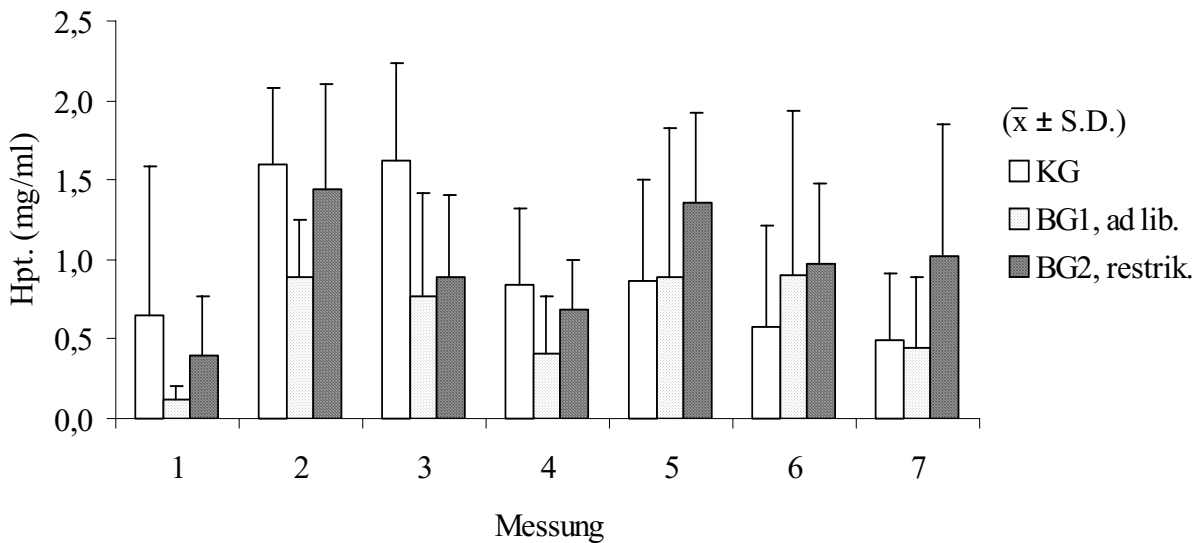
Die über den Versuch gemittelten Leistungsdaten sind in Tabelle 3 gezeigt. Die mittleren täglichen Zunahmen lagen auch hier in den beiden β -Glukan-gefütterten Gruppen eher niedriger als bei den Kontrolltieren; dies war aber, wie auch bei der (pro Bucht ermittelten) Futteraufnahme, statistisch nicht absicherbar. Da die Futteraufnahme nur per Bucht und damit pro Gruppe ermittelt werden konnte, ist ein statistischer Vergleich der Futterverwertung nicht möglich.

Table 3: Tägliche Lebendmassezunahmen (LMZ), Futteraufnahme (FA) und Futterverwertung (FV) von abgesetzten Schweinen bei Fütterung mit 0 (Kontrolle), oder 0,3% β -Glukanen (Mittelwerte \pm SEM), Futtervorlage der β -Glukane ad libitum bzw. restriktiv

	Kontrolle	0,03% β -Glukane	
		ad libitum	restriktiv, FA entsprechend der Kontrollen
LMZ (g/Tag)	439 \pm 19	402 \pm 18 p = 0,18	419 \pm 20 p = 0,51
FA (g/Tag)	742 \pm 2,2	668 \pm 1,7 p = 0,50	675 \pm 2,0 p = 0,51
FV (g/g)	1,7	1.7	1.6

Hinsichtlich der verschiedenen untersuchten Parameter zum Immunsystem und zu oxidativen Belastungen war bei allen Tieren, unabhängig von der Behandlung, die Belastung durch das Absetzen erkennbar. Alle untersuchten Parameter sind in den Abbildungen 10 bis 16 gezeigt.

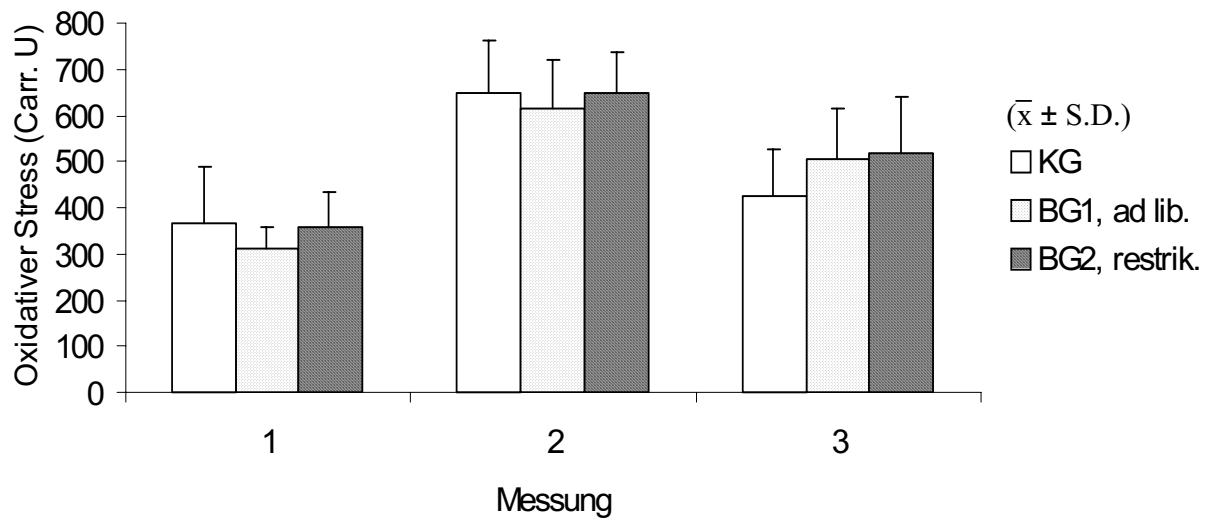
Für den Parameter **Haptoglobin** (Abb. 10) war, wie schon in den Versuchen I und II, ein inverser Zusammenhang mit der Gewichtsentwicklung sichtbar. Bei alleiniger Betrachtung der Kontrollgruppe waren nach dem Absetzen wieder reduzierte Zuwachsraten zu verzeichnen, im Mittel sanken die täglichen Zunahmen um rund 300 g/Tag, d.h. das Wachstum kam in dieser Woche zum Stillstand. Gleichzeitig stiegen die Haptoglobinkonzentrationen an ($r = -0,46$, $p = 0.003$). Diese Veränderung wurde durch die β -Glukangabe nicht kompensiert, hier zeigten sich analoge Konzentrationsveränderungen. Im weiteren Verlauf erholten sich die Tiere hinsichtlich ihrer Zunahmen; innerhalb von 2 Wochen nach dem Absetzen waren die Ausgangswerte annähernd wieder erreicht. Danach erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg. Am Ende des Versuches, als die Tiere 60 bis 70 Tage alt waren wurden mittlere Zuwachsraten von über 800 g/Tag realisiert. Die Haptoglobinwerte erreichten in der vierten Woche nach dem Absetzen wieder ihr Ausgangsniveau.



-Behandlung: $p < 0,05$
 -Zeit: $p < 0,05$

Abbildung 10: Haptoglobinkonzentrationen der Tiere aus Versuch III über den gesamten Versuchszeitraum; Futter ohne (KG) oder mit 0,3% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2); p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf

Bei dem Parameter „**Oxidativer Stress**“ (Abb. 11 a) waren wie in Versuch II nach dem Absetzen erhöhte Werte zu beobachten, die auch hier nicht durch entsprechende Anpassungen der **antioxidativen Kapazität** (Abb. 11 b) ausgeglichen werden konnten, weil diese Werte unverändert blieben. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten für den oxidativen Stress weder in der Reaktion auf das Absetzen noch im weiteren Versuchsverlauf festgestellt werden. Im statistischen Gesamtvergleich der drei vorhandenen Messungen ergab sich nur für die Zeit ein signifikanter Einfluss ($p < 0,05$). Für die antioxidative Kapazität waren im Vergleich der einzelnen Beprobungstermine bei fünf von insgesamt sieben Messungen Unterschiede zu Ungunsten der Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellbar. Im statistischen Gesamtvergleich wurden Behandlung und Zeit als signifikante Effektoren der antioxidativen Kapazität ermittelt ($p < 0,05$).

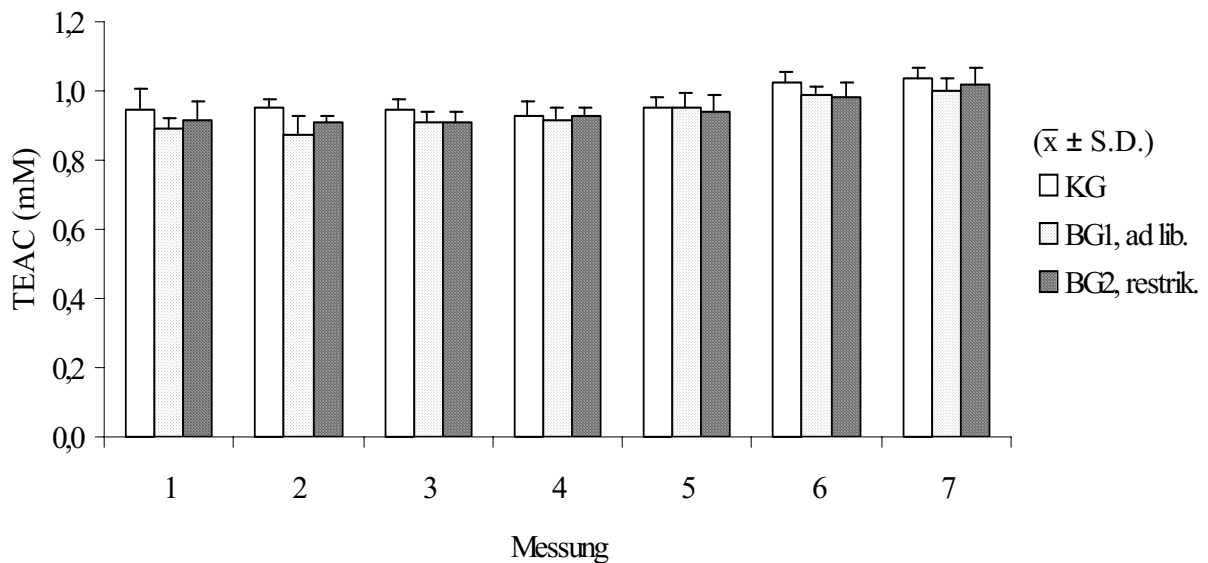


-Zeit: $p < 0,05$

Abbildung 11 a: Oxidativer Stress der Tiere aus Versuch III vor, während und nach der Fütterung;

Futter ohne (KG) oder mit 0,3% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2);

p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf



-Behandlung. $p < 0,05$
 -Zeit: $p < 0,05$

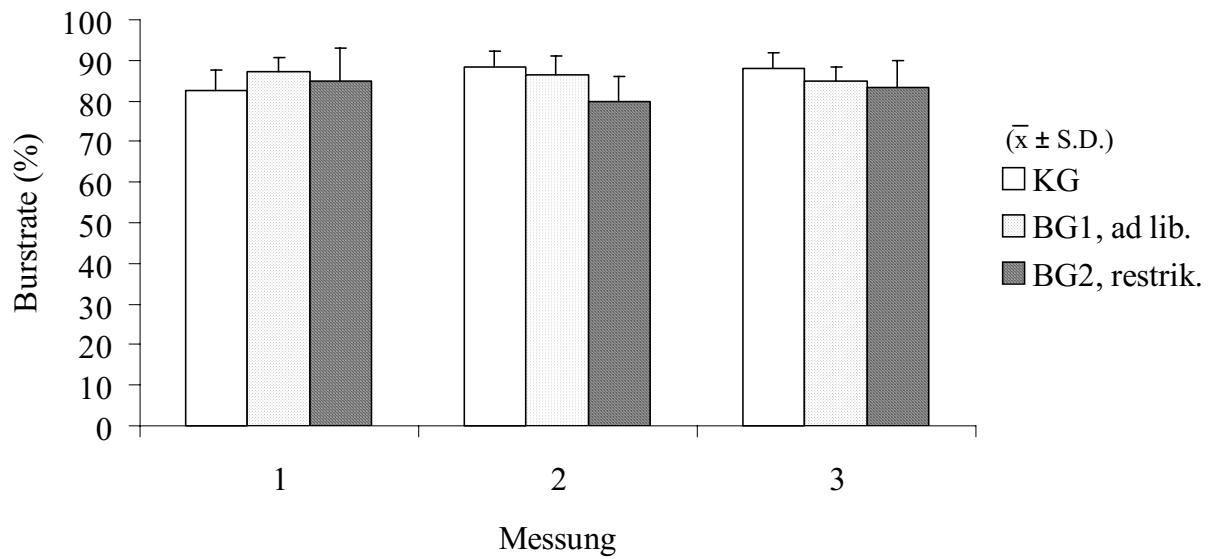
Abbildung 11 b: Antioxidative Kapazität der Tiere aus Versuch III über den gesamten Versuchszeitraum;

Futter ohne (KG) oder mit 0,3% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2);

p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf

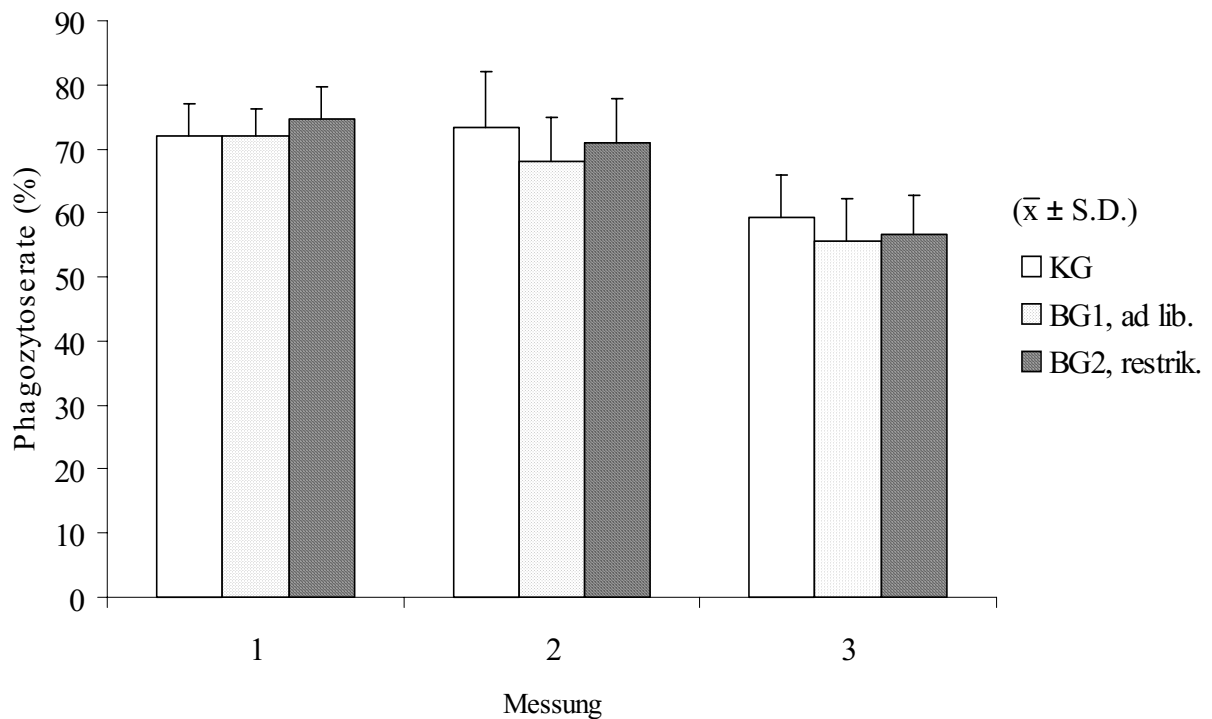
Bei den **Burstraten** (Abb. 12) deutete ($p < 0,1$) sich im Gesamtvergleich ein Effekt der Behandlung an; zwischen Zeit und Behandlung bestand eine Interaktion ($p < 0,05$). Während und nach der β -Glukangabe erschienen die Werte bei den behandelten Tieren gegenüber den Kontrollen erniedrigt; für die restriktiv gefütterten Tiere war dies in Messung zwei auch abzusichern ($p < 0,05$).

Für die **Phagozytoseaktivität** (Abb. 13) ergaben sich bei allen Gruppen abnehmende Werte mit zunehmender Versuchsdauer. Lediglich die Zeit, nicht aber die Behandlung erwies sich als diesen Parameter beeinflussender Faktor ($p < 0,05$).



-Behandlung: $p < 0,1$
 -Zeit x Behandlung: $p < 0,05$

Abbildung 12: Burstraten der Tiere aus Versuch III vor, während und nach der Fütterung; Futter ohne (KG) oder mit 0,3% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2); p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf



-Zeit: $p < 0,05$

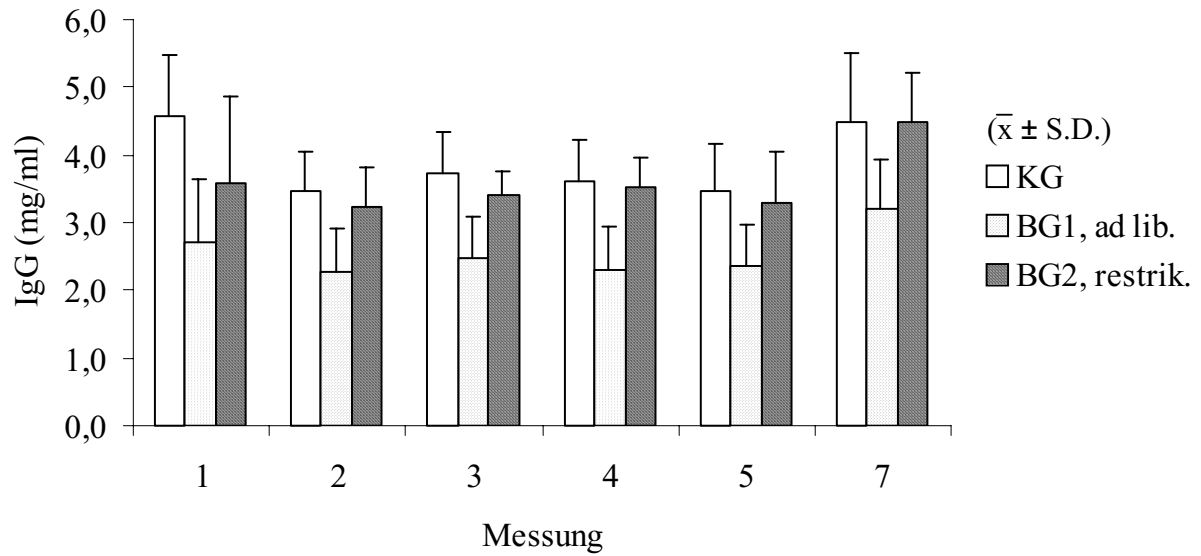
Abbildung 13: Phagozytoseaktivität der Tiere aus Versuch III vor, während und nach der Fütterung;

Futter ohne (KG) oder mit 0,3% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2);

p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf

Die **IgG-Konzentrationen** (Abb. 14) zeigten einen ähnlichen Verlauf wie in Versuch II, Zeit und Behandlung beeinflussten die Werte ($p < 0,05$). Die β -Glukan gefütterte Gruppe, die das Futter ad libitum erhielt, zeigte durchweg die niedrigsten Werte; nachdem dies auch schon vor Beginn der differenzierten Fütterung zu beobachten war, ist dies aller Wahrscheinlichkeit nicht der β -Glukan-Zulage zuzuschreiben.

Auch in Versuch III stiegen die **IgA-Werte** (Abb. 15) im Laufe des Versuches an; hier hatte die Behandlung einen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf ($p < 0,05$); die Behandlungseffekte alleine waren nicht signifikant, es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.



-Behandlung.

$p < 0,05$

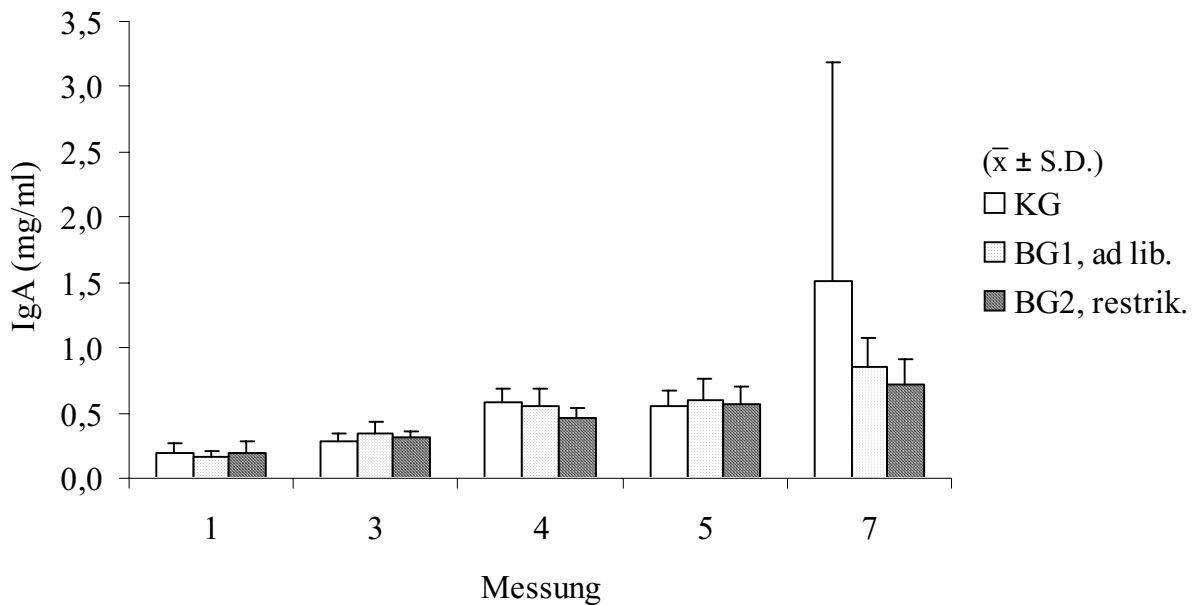
-Zeit:

$p < 0,05$

Abbildung 14: Immunglobulin G-Konzentrationen der Tiere aus Versuch III über den gesamten Versuchszeitraum;

Futter ohne (KG) oder mit 0,3% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2);

p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf



-Zeit x Behandlung: $p < 0,05$
 -Zeit: $p < 0,05$

Abbildung 15: Immunglobulin A-Konzentrationen der Tiere aus Versuch III über den gesamten Versuchszeitraum;
 Futter ohne (KG) oder mit 0,3% β -Glukanen (BG1 und BG2); Futterangebot ad libitum (KG und BG1) oder restriktiv (BG2);
 p kennzeichnet signifikante Einflüsse über den gesamten Verlauf

3.4 Ergebnisse aus Versuch IV

In Versuch IV wurden keine Blutparameter aufgezeichnet; nach zweiwöchiger Fütterung mit β -Glukanzusatz (0,03%) wurden die Tiere geschlachtet und Gewebeproben aus dem Dünndarm, speziell dem Ileum mit den dort vorhandenen Peyerschen Platten entnommen. Alter und Gewicht der Tiere entsprachen dem üblichen Status von Schlachttieren. Aus den Geweben wurden Gefrierschnitte angefertigt. Der immunhistochemische Nachweis von IgM, IgA sowie von CD4 und CD8 als Marker für T-Helferzellen bzw. zytotoxischen T-Zellen konnte etabliert werden. In den im Anhang gezeigten Abbildungen 16 ff. sind exemplarisch die Nachweise für die einzelnen Parameter, zusammen mit den entsprechenden Negativkontrollen gezeigt.

Für morphometrische Vergleiche wurden die angefertigten Kryoschnitte mit HE (Hämalaun-Eosin) gefärbt und die Länge und Breite der Zotten sowie der Durchmesser von Krypten und Lymphfollikeln über ein entsprechendes Bildverarbeitungssystem erfasst. Nach einer ersten, noch vorläufigen Übersicht unterschieden sich die β -Glukangefütterten Tiere in keinem der untersuchten Parameter von den unbehandelten Vergleichstieren. Im Gegensatz zu unserer Einschätzung der Methodendurchführbarkeit, erwiesen sich aber zahlreiche sehr intensive und umfangreiche Validierungsexperimente als nötig, um die immunhistochemischen Nachweise valide und für das vorhandene Probenmaterial optimiert durchführen zu können. Aufgrund der so entstandenen Verzögerungen stehen noch eine Versuchsreihe sowie die endgültige statistische Auswertung der Daten derzeit noch aus.

4. Diskussion

Für die einzelnen Versuche wurden verschiedene Blutparameter erfasst um eine potentielle Wirkung der β -Glukangaben auf das spezifische und das unspezifische Immunsystem zu charakterisieren. Darüber hinaus wurden erstmals Ansätze zur Erfassung oxidativer Belastungen bzw. deren Kompensation durch körpereigene Mechanismen realisiert. Zur Beurteilung der Mastleistung der Tiere wurden diese regelmäßig gewogen und die Futtermittelaufnahme aufgezeichnet.

4.1 β -Glukan-Wirkungen auf die Mastleistung

In Zusammenschau der Ergebnisse aus den Versuchen I bis III sind hinsichtlich der Mastleistung, die für den Erzeuger primär von Bedeutung ist, nur marginale bzw. keine signifikanten Effekte zu beobachten. Schon in Versuch I waren die mittleren Zuwachsraten bei 0,015 und 0,03% β -Glukanen im Futter zwar um 10 bzw. 16% höher als bei den Kontrolltieren, dies war aber nicht statistisch abzusichern. Bei einem p-Wert von 0,17 ist selbst bei der höher dosierten Gruppe nur von einer sehr schwachen Tendenz auszugehen. Für die Futtermittelaufnahme war aber bei der Tiergruppe, die 0,03% β -Glukane erhielt, tatsächlich eine Tendenz ($p < 0,1$) zu erhöhten Werten gegeben. Die Folgeversuche II und III, die diesem Aspekt durch das Futterangebot spezifisch Rechnung trug, ergab aber keinerlei unterstützende Hinweise auf einen futtermittelaufnahmesteigernden Effekt der β -Glukane. In den Versuchen II und III waren die mittleren Zuwachsraten bei den β -Glukan gefütterten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren sogar niedriger, bei den ad libitum gefütterten Tieren betrug die Zuwachsraten bei 0,03% β -Glukanen (Versuch II) 88 % der von den Kontrolltieren erreichten Werte; bei 0,3% waren es 91%. In beiden Fällen waren aber diese relativ geringeren Werte nicht signifikant.

Für die Wirksamkeit von β -Glukanen wird in der Literatur die hygienische Ausgangssituation der Tiere bzw. ihr Leistungsniveau diskutiert: DECUYPERE et al. (1998) führen einen unterschiedlichen Hygienestatus als Erklärung für die nur zum Teil wachstumsstimulativ wirksamen Effekte der β -Glukane in ihren Studien an. Demnach ist bei Tieren, die unter sehr guten hygienischen Bedingungen leben, und deren Wachstumsleistung ohnehin ihr genetisches Potential ausschöpft, mit Gabe von β -Glukanen keine weitere Steigerung der Leistung zu erwarten. Bei Tieren, die hingegen unter suboptimalen Bedingungen leben, einem „immunologischen Stress“ ausgesetzt sind, sollen β -Glukane hingegen relativ effektiver sein. Die Erklärung ist physiologischerweise durch die Verteilung der Nährstoffe auf die miteinander konkurrierenden Bereiche „Wachstum“ und „Abwehr“ begründet: beispielsweise ergibt sich überschlägig berechnet für die Immunreaktion, die bei experimentellen Infektionen

mit bestimmten Parasiten geleistet wird, ein zusätzlicher Proteinbedarf von rund 700 mg metabolisierbarem Protein pro Tag und pro kg metabolisches Körpergewicht ($\text{kg}^{0,75}$) (HOUDIJK et al., 2001). Ansatzweise bestätigt sich das o.g. Konzept zum Hygienestatus auch in unseren Versuchen: in Versuch I war der Hygienestatus relativ schlecht und die geringeren Zuwachsraten der Tiere aus Versuch I im Vergleich zu II und III deuten auch darauf hin, dass hier betriebsbedingt die immunologische Ausgangssituation unterschiedlich war. Dies wird auch durch die Checklistenhebungen in beiden Betrieben unterstützt.

Hinsichtlich der möglicherweise leistungsfördernden Wirkung von β -Glukanen ist letztlich aber aus allen hier vorgestellten Ergebnissen klar die Aussage zu treffen, dass ein solcher Effekt nicht abgesichert werden konnte. Auch die Futtermittelaufnahme wird durch β -Glukane nicht stimuliert. Allein aus dem Aspekt der Leistungsverbesserung heraus macht es demnach unabhängig vom Hygienestatus keinen Sinn β -Glukanpräparationen einzusetzen.

4.2 Wirkungen von β -Glukanen auf einzelne Immunparameter

Im Fokus der Untersuchungen stand weniger die Frage nach leistungsverbessernden Wirkungen der β -Glukane, sondern vielmehr ihre angeblich immunstimulativen bzw. immunmodulatorischen Effekte. In Versuch I ergaben sich dazu bei den dort untersuchten Parametern (Haptoglobin, PRRS-Titerhöhen und Lymphozytenproliferationsindex) keinerlei Hinweise. Hingegen war in dem auf dem Versuchsgut Frankenforst durchgeführten Versuch II entsprechend dem statistischen Gesamtvergleich ein Behandlungseffekt der β -Glukangabe bei den Parametern IgA und antioxidative Kapazität gegeben; für die IgG Konzentration gab es eine Tendenz ($p < 0,1$). Eine schlüssige Erklärung für die gegenüber der Kontrollgruppe und der restriktiv gefütterten β -Glukangruppe erhöhten IgA Werte der ad libitum gefütterten β -Glukangruppe konnte nicht gefunden werden; dass diese erhöhten Werte tatsächlich der β -Glukangabe zuzuschreiben sein könnten, erscheint angesichts der restriktiv gefütterten Gruppe, deren Futtermittelaufnahme sich nicht von der ad libitum gefütterten Gruppe unterschied, als unwahrscheinlich. Welche anderen Faktoren hier möglicherweise die IgA Sekretion beeinflusst haben könnten, bleibt daher offen. Die an den weissen Blutzellen erfassten Parameter der unspezifischen Abwehr, Phagozytoseaktivität und oxidativer Burst, zeigten punktuell im Vergleich zur Kontrollgruppe veränderte Werte. Nachdem aber bei den beiden Behandlungsgruppen aus Versuch II die Phagozytoseaktivität während der Behandlung reduziert war, und für eine immunstimulative Wirkung aber ein Anstieg der Werte zu erwarten gewesen wäre, ist hier eher von einer Suppression der unspezifischen Abwehr auszugehen, als von einer tatsächlich stimulativen Wirkung. Im statistischen Gesamtvergleich war die Behandlung bei diesen beiden Parametern nicht signifikant. Damit werden auch die

Ergebnisse von DRIETZ et al (1995), wonach kein Effekt einer β -Glukan-Gabe auf die Phagozytoseaktivität bei wachsenden Schweinen gegeben ist, bestätigt.

An dieser Stelle sei betont, dass eine Immunstimulation, bei der die Abwehrmechanismen des Körpers aktiviert werden, im Sinne der auf S. 35 angesprochenen Konkurrenz von Abwehr und Wachstum, netto eine reduzierte Wachstumsleistung nach sich ziehen müsste. Dies wird auch durch die gefundenen negativen Korrelationen zwischen den Haptoglobinblutwerten und den täglichen Zunahmen bestätigt. Die Vorstellung, dass immunstimulative Substanzen aber eher wachstumsfördernd wirken, ist damit im Widerspruch. Die zugrunde liegenden, sicherlich sehr komplexen Mechanismen sind dabei, gerade was kurz-, mittel- und langfristige Effekte einer Immunstimulation angeht, noch nicht hinreichend geklärt. Generell bleibt damit aber eine Wertung der auch hier teilweise beobachteten Auslenkung bei einzelnen Immunparametern in Hinblick auf positiv oder negativ für Tiergesundheit äusserst problematisch.

In der Literatur finden sich kaum Untersuchungen über die Effekte von (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -D-Glukanen auf einzelne Parameter des Immunsystems beim Schwein. Eindeutige Wirkungen bei Säugern sind nur aus in-vitro Versuchen mit humanen Blutzellen (z.B. ABEL & CZOP, 1992) bzw. in vivo nach peroraler Applikation bei Labornagern beschrieben (u.a. KERNODLE et al., 1998). In der schon erwähnten Arbeit von DRITZ et al. (1995) wurde der Einfluss einer Fütterung von MakroGard-S™ (β -Glukane aus *S. cerevisiae*) auf die Haptoglobinkonzentration bei abgesetzten Ferkeln untersucht. Bei einer Fütterung von 0,025 % bzw. 0,05 % β -Glukanen wurden niedrigere Haptoglobinkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden. Die Autoren erklärten die erniedrigten Haptoglobinspiegel durch eine Veränderung der Balance zwischen Interleukin-1 β (IL-1 β) und IL-1-Rezeptorantagonist zu Gunsten des Antagonisten und einer damit verbundenen verminderten IL-1 β -Synthese und -wirkung. Die eigenen Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse von DRITZ et al. nicht durchgängig: in den Versuchen I und II zeigten sich bei den β -Glukan-gefütterten Tieren keine Unterschiede der Haptoglobinwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe; in Versuch III, mit der überhöhten Glukandosierung war zwar ein Effekt der Behandlung nachweisbar, jedoch waren die Unterschiede zwischen den Gruppen zu den einzelnen Messzeitpunkten nicht kongruent (s.u.). Für die weiteren hier untersuchten Immunparameter existieren keine vergleichbaren Studien beim Schwein. Gleiches gilt für die hier erstmalig erfassten Parameter zum oxidativen Stress.

Die in Versuch III getestete Überdosierung hatte keine negativen Auswirkungen auf die Tiergesundheit und auf die Mastleistung. Es waren aber auch keine Verbesserungen gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen.

Hinsichtlich der verschiedenen Immunparameter waren Effekte der Behandlung bei Haptoglobin, IgG, und antioxidativer Kapazität zu verzeichnen. Die in Versuch II auffallend höheren IgA-Werte in der ad libitum gefütterten β -Glukangruppe waren hier nicht sichtbar. Der Zeitverlauf war aber analog. Die Effekte auf die Haptoglobinwerte waren nicht einheitlich in einer Richtung wirksam. Die β -Glukan gefütterten Tiere zeigten zumeist niedrigere Werte als die Kontrollen, z.T. aber auch relativ höhere Konzentrationen. Nachdem derartige Unterschiede aber auch schon vor Beginn der β -Glukangabe zu beobachten waren, ist dies vermutlich nicht als spezifischer Effekt der β -Glukane anzusehen. Bei IgG hatte die ad libitum gefütterte β -Glukangruppe durchweg, auch schon vor dem Absetzen, niedrigere Werte als die Kontrollgruppe; die restriktiv gefütterte Gruppe unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe. Auch in diesem Versuch waren keine Unterschiede in der Futteraufnahme zu verzeichnen, so dass hier wie schon in Versuch II für IgA eine Erklärung für die beobachteten Gruppenunterschiede fehlt.

Letztlich erscheinen die beobachteten Veränderungen bei den verschiedenen immunologischen Parametern aber insgesamt als marginal und stützen nicht das Konzept einer eindeutig immunstimulativen Wirkung von β -Glukanen als Futterzusatz. In gleicher Weise ergeben sich aus den in Versuch II aufgetretenen Gesundheitsstörungen, die sich in ihrer Häufigkeit augenscheinlich nicht zwischen den Gruppen unterschieden, keine Hinweise, wonach die β -Glukangabe die Abwehrkräfte der Tiere verbessern könnte.

Um die den Arbeiten zugrundeliegende Hypothese wonach β -Glukane als Alternative für Fütterungsantibiotika bedeutend sein könnten, abschließend anzunehmen oder abzulehnen, ist eine differenzierte Betrachtung nötig: Mit Antibiotika in niedriger Dosierung im Futter werden bzw. wurden bekanntlich Steigerung der Gewichtszunahmen um rund 10 – 15 % und eine Verminderung des Futteraufwandes um rund 5 – 6% erzielt. Dass das Ausmaß der Verbesserung dabei von der Haltung, Fütterung bzw. dem Hygienestatus abhängig ist, ist ebenfalls lange bekannt. Grundsätzlich gilt, dass der fördernde Effekt der antibiotischen Leistungsförderer umso geringer ist, je besser die Tiere gehalten sind. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich auch für die hier untersuchten β -Glukane: in Versuch I, in dem die Tiere unter suboptimalen Bedingungen standen, war zumindest in der Tendenz ($p = 0,17$) eine Verbesserung der Wachstumsleistung mit β -Glukanen feststellbar. Dabei ist auch zu betonen, dass die Futtermittelration der Tiere aus Versuch I noch Fütterungsantibiotika enthielt (40 mg

Avilamycin/kg), während auf dem zweiten Betrieb keinerlei Fütterungsantibiotika eingesetzt wurden. Dennoch waren die täglichen Zunahmen im zweiten Betrieb etwa 1,6-mal so hoch wie die im anderen Betrieb. Dies unterstreicht eindrücklich, dass die Haltungsumwelt der Tiere den weitaus größten Einflussfaktor auf die Gesundheit und Leistung der Tiere bildet. Nicht unerwähnt bleiben sollte hier jedoch auch die Antibiotika-Injektion, die die Tiere beim zweiten Betrieb, d.h. in den Versuchen II, III und IV schon am ersten Lebenstag erhielten. Damit wurden zwar keine Fütterungsantibiotika eingesetzt, der Ausgangsstatus der Tiere in hygienisch/immunologischer Hinsicht aber sicherlich gegenüber dem ersten Betrieb weiter verändert. In Hinblick auf die Frage nach Futterzusätzen wurde die Injektion hier aber als Management-Option betrachtet. Die Antibiotikainjektion mag zwar durch die Erfolge der Betriebspraxis gerechtfertigt sein, generell ist aber so keine Reduzierung des Antibiotikaeinsatzes und damit der Resistenzproblematik zu erzielen.

Um auf die Futterzusätze zur Immunstimulation zurückzukommen, bleibt insgesamt festzuhalten, dass Versuche, suboptimale Bedingungen durch solche Zusätze gleich welcher Art auszugleichen, zwar marginale Verbesserungen erbringen mögen, sie erreichen aber, wie auch hier untermauert, nie die durch entsprechende Optimierungsmaßnahmen in Management und Haltung erzielbaren Höhen.

Unabhängig von der Glukangabe zeigen alle hier vorgestellten Versuche mit Absetzferkeln, dass das Absetzen per se gravierende Veränderungen mit sich bringt und eine erhebliche Belastung der Tiere darstellt. Diese Belastungssituation war durch die Parameter Haptoglobin und oxidativer Stress besonders gut darstellbar. Zwischen beiden Parametern bestanden auch Zusammenhänge (Versuch II: $r = 0.5$, $p < 0.001$; Versuch III: $r = 0.5$, $p < 0.001$), die möglicherweise funktionale Bedeutung haben (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Aus der so dokumentierten Belastung der Tiere wird deutlich, dass alle Ansätze, den Tieren über diese Situation hinwegzuhelfen, möglichst frühzeitig einsetzen müssen. Die Applikation von potentiell immunmodulativen Substanzen erst beim Absetzen setzt nach unseren Ergebnissen offenbar zu spät ein, um die genannte Belastung zu kompensieren. Die Applikation von β -Glukanen vor dem Absetzen wurde für die Versuche zwar erwogen, konnte aber aus praktischen Gründen nicht realisiert werden. Zudem ist die tatsächliche Futteraufnahme in dieser Phase individuell sehr verschieden und schlecht quantifizierbar. Anzumerken ist hier, dass über die Dauer, die β -Glukane brauchen, um ihre Wirkung zu entfalten auch keine Erkenntnisse vorliegen. Daneben ist natürlich auch die Wirksamkeit als solche in der oralen Applikation nicht als gesichert anzusehen.

Um, wie schon oben im allgemeinen angesprochen, die Umweltbedingungen für die Tiere zu optimieren, und sie bestmöglich auf das Absetzen vorzubereiten, bietet neben dem Hygienestatus sicherlich die Unterstützung des Immunsystems einen wesentlichen Ansatzpunkt. Beim Absetzen beginnt gerade erst die Bildung körpereigener Antikörper und das Ferkel ist im Wesentlichen noch auf die durch die Kolostralmilch aufgenommenen maternalen Antikörper angewiesen. Eine optimale Versorgung mit Kolostrum ist hier sicher ein zentraler Punkt; darüber hinaus sollte auch die Qualität des Kolostrums berücksichtigt werden. Nach Versuchen bei Zuchtstuten kann der Antikörpergehalt der Milch durch Immunstimulatoren verbessert werden. KRAKOWSKI et al. (1999) beschreiben erhöhte IgG und IgM-Spiegel im Kolostrum von β -Glukan stimulierten Stuten; die β -Glukane wurden hier allerdings auch als intramuskuläre Injektion verabreicht. Weiterführende Forschungsarbeiten sollten daher den Gedanken, bereits am Muttertier die Grundlagen für einen optimalen Start der Jungtiere zu legen, näher untersuchen. Darüber hinaus erscheint aber auch die gezielte Stimulation des Immunsystems der Saugferkel als eine Möglichkeit den Absetz-Stress aufzufangen. Hier sind aber aus den o.g. Gründen Injektionen gegenüber oral verabreichten immunstimulativen Futterzusätzen vermutlich vorzuziehen und entsprechend auszutesten.

5. Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis

Die hier erarbeiteten Ergebnisse zeigten, dass es zwar in einigen Parametern des unspezifischen und des spezifischen Abwehrsystems mit der β -Glukanbehandlung Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gab, angesichts des Gesundheitsstaus der Tiere sowie deren Mastleistung ergeben sich aber keine messbaren Vorteile. Aus dem Vergleich der beiden unterschiedlichen Betriebe, auf denen die Versuche durchgeführt wurden, zeigt sich, dass die Haltungsumwelt der Tiere die weitaus größte Rolle für die Gesundheit und Leistung der Tiere spielt. Diese Effekte können z.B. auch nicht durch die als wirksam anerkannten Fütterungsantibiotika ausgeglichen werden. Auch wenn vereinzelt positive Effekte von β -Glukanen, zumindest in der Tendenz erkennbar waren, ist die Größenordnung solcher Verbesserungen nicht vergleichbar mit den durch optimierte Management- und Haltungsbedingungen erzielbaren Effekten. Die Frage ob β -Glukane als Alternative zu Fütterungsantibiotika gelten können, ist also hinfällig. Optimierungsstrategien in der Ferkelaufzucht und -mast sollten daher keinesfalls einzelne Futterzusatzstoffe zum Gegenstand haben, sondern sehr viel mehr im Rahmen von umfassenden Konzepten auf die Haltung zielen. Zwar ist auch bei einer Überdosierung der β -Glukane nach unseren Ergebnissen nicht zu erwarten, dass die Tiere beeinträchtigt wären, nachdem aber kein eindeutiger Nutzen aus dem Einsatz der β -Glukane gezeigt werden konnte, ist der zusätzliche Kostenaufwand auch bei bestimmungsgemäßem Gebrauch nicht gerechtfertigt.

Unsere Ergebnisse haben unabhängig von der β -Glukanbehandlung gezeigt, dass das Absetzen eine deutlich messbare Belastung der Ferkel bedeutet. Im Rahmen von umfassenderen Konzepten zur Minimierung dieser Belastungen werden zukünftig auch alternative Absetzverfahren zu bedenken und zu untersuchen sein. Um die Versorgung der Ferkel mit Antikörpern aus der Muttermilch in Menge und Qualität möglichst optimal zu gestalten, bilden immunstimulatorische Behandlungen der Muttersau einen interessanten Forschungsansatz. Ebenso bietet die Stimulation des Immunsystems anhand von leicht und sicher zu dosierenden Injektionen direkt beim Saugferkel möglicherweise eine sinnvolle Alternative bzw. Ergänzung. Bis dazu aber hinreichend Ergebnisse verfügbar sind, und sicherlich auch danach, bleibt für die Praxis das Bemühen um optimale Haltungsbedingungen im Vordergrund.

6. Literaturverzeichnis

ABEL G. & CZOP J.K. (1992). Stimulation of human monocyte beta-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and Il-1. *International Journal of Immunopharmacology* **14 (8)**, 1363-1373.

ALBERTI A., BOLOGNINI L. & MACCIANTELLI D. (2000). The radical cation of N,N-Diethyl-paraphenyldiamine: a possible indicator of oxidation stress in biological samples. *Research Chemical Intermedicine* **26**, 253-267.

ALEXOPOULOS C., KARAGIANNIDIS A., KRITAS S.K., BOSCO C., GEO & KYRIAKIS S.C. (2001). Field evaluation of a bioregulator containing live *Bacillus cereus* spores on health status and performance of their litters. *Journal of Veterinary Medicine and Physiological Pathological Clinical Medicine* **48 (3)**, 137-145.

BAUM B., LIEBLER- TENORIO E.M., ENSS M.L., POHLENZ J.F. & BREVERS G. (2002). *Saccharomyces boulardii* and *bacillus cereus* var. *Toyoi* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. *Zeitschrift für Gatsroenterologie* **40(5)**, 277-284.

BOTSOGLOU N.A., CHRISTAKI E., FLETOURIS D.J., FLOROU-PANERI P. & SPAIS A.B. (2002). The effect of dietary organo essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science* **62 (2)**, 259-265.

CESARONE M.R., BELCARO G., CARRATELLI M., CORNELLI U., DE SANCTIS M.T., INCANDELA L., BARSOTTI A., TERRANOVA R. & NICOLAIDES A. (1999). A simple test to monitor oxidative stress. *International Angiology* **18 (2)**, 127-130.

CROMWELL G.L. (2002). Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology* **13 (1)**, 7-27.

DECUYPERE N., DIERICK N. & BODDEZ S. (1998). The potentials for immunostimulatory substances (β -1,3/1,6 glucans) in pig nutrition. *Journal of Animal and Feed Sciences* **7**, 259-265.

DRITZ S.S., SHI J., KIELIAN T.L., GOODBAND R.D., NELSSON J.L., TOKACH M.D., CHENGAPPA M.M., SMITH J.E. & BLECHA F. (1995). Influence of dietary beta-glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to streptococcus suis infection in weanling pigs. *Journal of Animal Science* **73**, 3341-3350.

HALLIWELL B. & GUTTERIDGE J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol 3th ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HISS S., KNURA-DESZCZKA S., REGULA G., HENNIES M., GYMNICH S., PETERSEN B. & SAUERWEIN H. (2003). Development of an enzyme immuno assay for the determination of porcine haptoglobin in various body fluids: testing the significance of meat juice measurements for quality monitoring programs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , .

- HISS S. & SAUERWEIN H. (2003). Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation and haptoglobin plasma concentrations in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **87**, 1-11.
- HOUDIJK J.G., JESSOP N.S. & KYRIAZAKIS I. (2001). Nutrient partitioning between reproduction and immune functions in animals. *Proceedings of the Nutrition Society* **60(4)**, 515-525.
- JADAMUS A., VAHJEN W., SCHAFFER K. & SIMON O. (2002). Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **86 (1-2)**, 42-45.
- JOACHIM A., DULMER N., DAUDSCHIES A. & ROEPSTROFF A. (2001). Occurrence of helminths in pig fattening units with different management systems in Northern Germany. *Veterinary Parasitology* **96 (2)**, 135-146.
- KERNODLE D.S., GATES H. & KAISER A.B. (1998). Prophylactic anti-infective activity of poly-[1-6]-beta-D-glucopyranose glucan in a guinea pig model of staphylococcal wound infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 545-549.
- KRAKOWSKI L., KRZYZANOWSKI J., WRONA Z. & SIWICKI A.K. (1999). The effect of nonspecific immunostimulation of pregnant mares with 1,3/1,6 glucan and levamisole on the immunoglobulins levels in colostrum, selected indices of nonspecific cellular and humoral immunity in foals in neonatal and postnatal period. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **68**, 1-11.
- MADEC F., BRIDOUX N., BOUNAIX S. & JESTIN A. (1998). Measurement of digestive disorders in piglet and related risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* **35 (1)**, 53-72.
- MATSUZAKI T. & CHIN J. (2000). Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunology and Cell Biology* **78 (1)**, 67-73.
- MILLER N.J., RICE-EVANS C., DAVIES M.J., GOPINATHAN V. & MILNER A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* **84 (4)**, 407-412.
- SIWICKI A.K., ANDERSON D.P. & RUMSEY G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **41 (1-2)**, 125-139.
- SVENSMARK B., NIELSEN K., WILLEBERG P. & JORSAL S.E. (1989). Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. II. Post-weaning diarrhoea. *Acta Veterinaria Scandinavica* **30 (1)**, 55-62.
- TURNER J.L., DRITZ S.S., HIGGINS J.J. & MINTON J.E. (2002). Effect of *Ascophyllum nodosum* extract on growth performance and immune function of young pigs challenged with *Salmonella typhimurium*. *Journal of Animal Science* **80 (7)**, 1947-1953.

WHITE L.A., NEWMAN M.C., CROMWELL G.L. & LINDEMANN M.D. (2002). Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *Journal of Animal Science* **80**, 2619-2628.

WIERUP M. (2001). The Swedish experience of the year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health disease prevention, productivity and usage of antimicrobial. *Microbial Drug Resistance* **7 (2)**, 183-190.

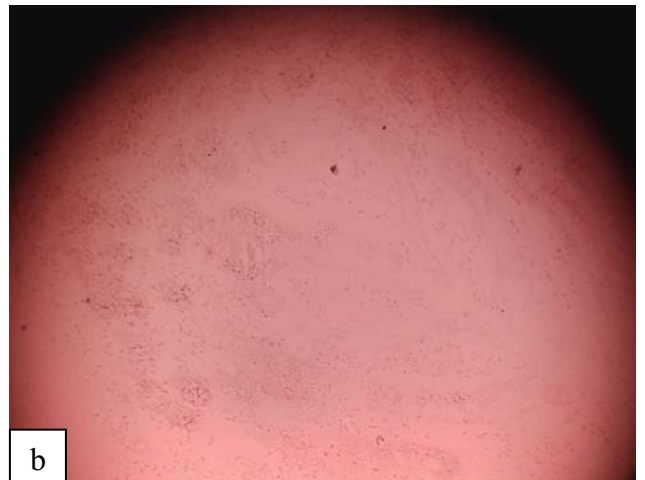
WILKIE B. & MALLARD B. (1999). Selection for high immune response: an alternative to animal health maintenance? *Veterinary Immunology and Immunopathology* **72 (1-2)**, 231-235.

WILLMENT J.A., GORDON S. & BROWN G.D. (2001). Characterization of the human β -glucan receptors and its alternative spliced isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* **276 (47)**, 43818-43823.

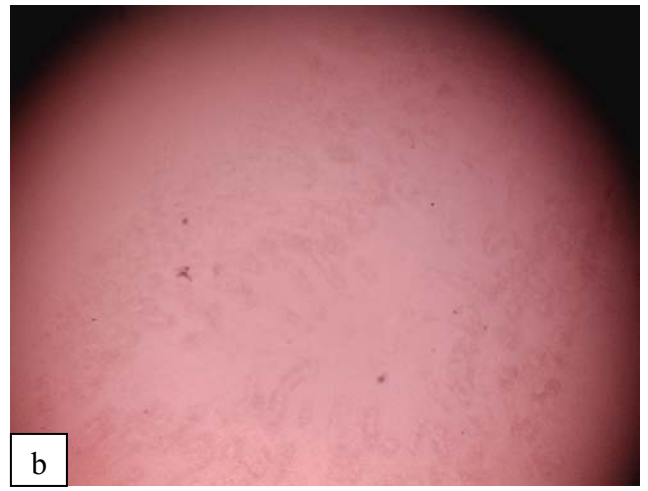
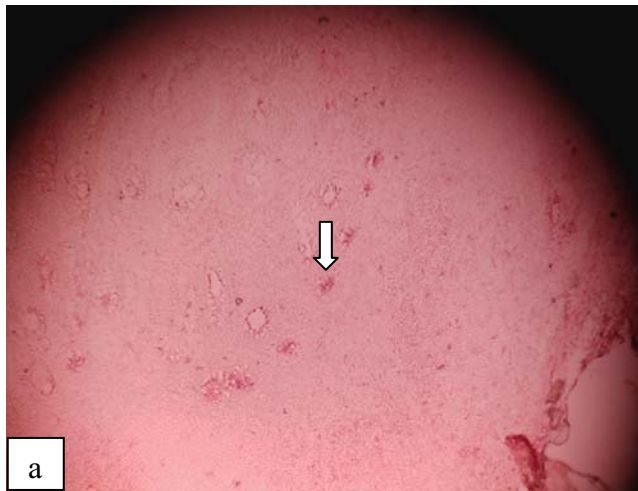
WIMMERS K., MEKCHAY S., SCHELLANDER K. & PONSUKSILI S. (2003). Molecular characterization of the pig C3 gene and association with complement activity. *Immunogenetics* **54(10)**, 714-724.

YANAKI T., ITO W., TABATA K., KOJIMA T., NORISUYE T., TAKANO N. & FUJITA H. (1983). Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. *Biophysical Chemistry* **17(4)**, 337-342.

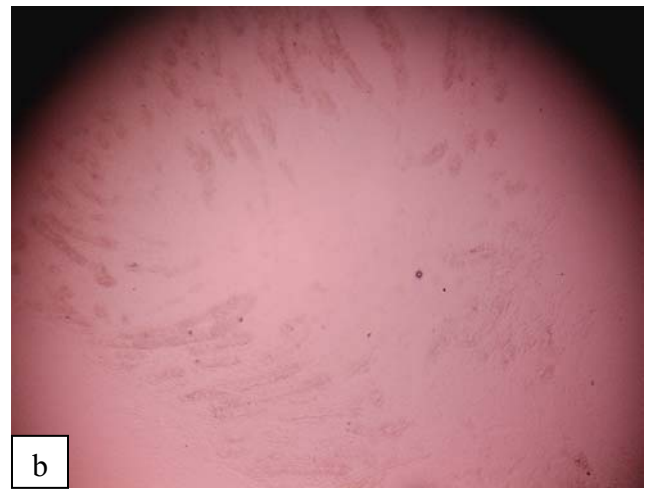
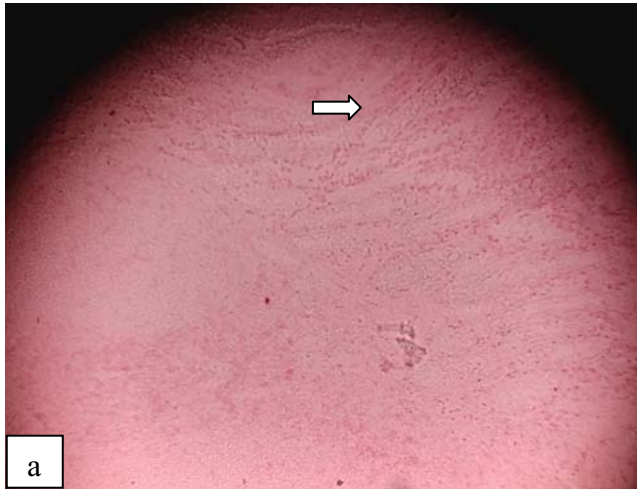
7. Anhang



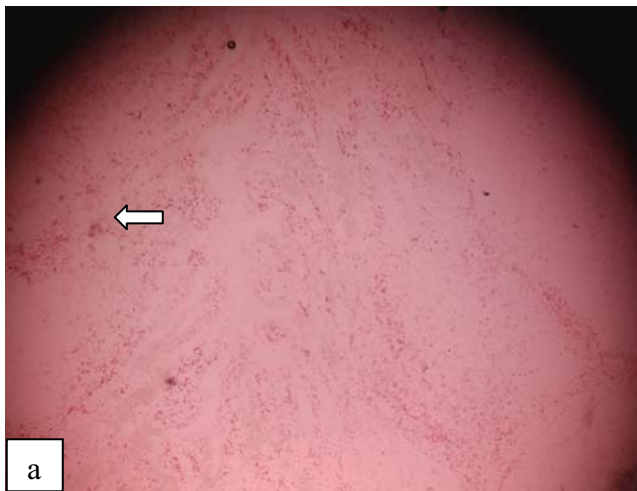
Abbildungen 16a und 16b: Gefrierschnitte des Ileums; Nachweis von IgA in einer Verdünnung von 1:400; Positiv (a) und negative (b) Kontrolle; Der Pfeil kennzeichnet die Kryptenregion.
a-b: Vergrößerung: 10x



Abbildungen 17a und 17b: Gefrierschnitte des Ileums; Nachweis von IgM in einer Verdünnung von 1:200; Positiv (a) und negative (b) Kontrolle; Der Pfeil kennzeichnet die Kryptenregion.
a: Vergrößerung: 10x; b: Vergrößerung: 5x



Abbildungen 18a und 18b: Gefrierschnitte des Ileums; Nachweis von CD4 in einer Verdünnung von 1:400; Positiv (a) und negative (b) Kontrolle; Der Pfeil kennzeichnet den Zottenbereich.
a: Vergrößerung: 10x; b: Vergrößerung: 5x



Abbildungen 19a und 19b: Gefrierschnitte des Ileums; Nachweis von CD8 in einer Verdünnung von 1:800; Positiv (a) und negative (b) Kontrolle; Der Pfeil kennzeichnet den Zottenbereich.
a-b: Vergrößerung: 5x

Table 4: Zusammensetzung des Futters aus dem Fütterungsversuch I mit Absatzferkeln nach Herstellerangaben

RWZ-Start M

Raiffeisen Waren-Zentrale Rhein-Main, Köln

Ferkelaufzuchtfutter I (Alleinfutter) mit Adsorbat-Komplex

Gehalt an Inhaltsstoffen:

19,5 % Rohprotein	1,3 % Lysin	4,5 % Rohfaser
5,1 % Rohfett	6,2 % Rohasche	0,8 % Calcium
0,6 % Phosphor	0,25 % Natrium	14,0 MJ ME/kg

Zusatzstoffe je kg Mischfutter:

16000 IE Vitamin A, 2000 IE Vitamin D3, 100 mg Vitamin E, 40 mg Avilamycin, 165 mg Kupfer, Propionsäure, 500 ITU 3-Phytase, Ameisensäure $1 \cdot 10^9$ KBE/kg Bacillus cereus, Ethoxyquin

Table 5: Zusammensetzung des Futters für Saugferkel aus Versuch II und III (nach Herstellerangaben)

<u>Alleinfuttermittel für Saugferkel</u>			
<u>Inhaltsstoffe</u>		<u>Zusatzstoffe je kg</u>	
19,00 %	Rohprotein	25.000 I.E.	Vitamin A
7,20 %	Rohfett	2.000 I.E.	Vitamin D3
3,60 %	Rohfaser	120 mg	Vitamin E
5,50 %	Rohasche	160 mg	Kupfer
1,45 %	Lysin	220 mg	Zink
0,63 %	Calcium	0,45 mg	Selen
0,53 %	Phosphor	500 FTU	3-Phytase
0,20 %	Natrium	232 FXU	(w) Xylanase
		24 FBG	1,3-1,4 Beta-Glucanase
		13,5 KNU	Alpha-Amylase
		$1,3 \times 10^9$ KBE	Bacillus licheniformis und Bacillus subtilis (1:1)
			Calciumformiat
			Ameisensäure
			Orthophosphorsäure
			Citronensäure
			BHT

Tabelle 6: Zusammensetzung des Futters für abgesetzte Ferkel aus Versuch II und III
(nach Herstellerangaben)

<u>Konzentrat zur Mischung eines Ferkelaufzuchtfeeders</u>	
<u>Inhaltsstoffe</u>	<u>Zusatzstoffe</u>
42,00 % Rohprotein	110.000 I.E. Vitamin A
4,50 % Lysin	9.500 I.E. Vitamin D3
2,50 % Rohfasser	500 mg Vitamin E
3,00 % Rohfaser	28 mg Vitamin K3
17,00 % Rohasche	200 mg Vitamin C
3,80 % Calcium	15 mg Vitamin B1
1,85 % Phosphor	45 mg Vitamin B2
0,90 % Natrium	25 mg Vitamin B6
	200 mcg Vitamin B12
	530 mcg Biotin
	112 mg Ca-Pantothemat
	165 mg Nicotinsäure
	2.000 mg Cholinchlorid
	830 mg Kupfer
	1.130 mg Zink
	1.300 mg Eisen
	750 mg Mangan
	12,5 mg Jod
	2,0 mg Selen
	190 mg Tylosinphosphat
	4 x 10 ⁹ KBE Toyocerin

Tabelle 7: Produktbeschreibung der β -Glukane, die in den Fütterungsversuchen I-IV eingesetzt wurden

D A T E N B L A T T

A N T A - F E R M M G

Allgemeines:	ANTA-FERM MG ist ein natürlicher Extrakt der Zellwände von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Das Produkt wurde speziell aufbereitet, um einen hohen Anteil an 1,3- β Glucanen in der Polysaccharidfraktion zu erhalten. Der Anteil der β -Glucane beträgt mindestens 25 %.
Physikalische Form und Farbe:	grau-braunes Pulver nicht hygroskopisch,
Siebanalyse (Partikelgröße durch ein 20 mesh Sieb):	100 %
1,3; 1,6- β -Glucangehalt:	25 - 30 %
Asche:	5 % max.
Trockensubstanz:	95 % max.
pH-Wert (2 % Lösung)	5,8- 6,8
Dosierung:	250 – 500 g/ Tonne Alleinfuttermittel
Geruch, Geschmack:	Hefetypisch
Löslichkeit:	wasserunlöslich
Molmasse:	ca. 100 kDa
Futtermittelrechtliche Einstufung:	Hefe extrahiert
Lagerung:	Kühl und trocken
Haltbarkeit:	Bei entsprechenden Lagerbedingungen 12 Monate haltbar.
Vertrieb/Hergestellt für:	Dr. Eckel GmbH Bausenbergweg 7 56651 Niederzissen

8. Konsequenzen für eventuelle weitere Forschungsaktivitäten

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Fütterung von β -Glukanen bei Absetzferkeln lediglich marginale Effekte auf einige Parameter des Immunsystems hatte. Auf den Gesundheitszustand und die Leistung waren keine Effekte zu beobachten. Damit ist der Einsatz von β -Glukanen in den hier untersuchten Formen (Dosierungen, Präparat und orale Applikation) in der Ferkelaufzucht nicht gerechtfertigt. Weitere Untersuchungen zu diesen Substanzen erscheinen daher auch nicht als interessant.

Der Vergleich der Ergebnisse und Leistungsdaten aus den beiden unterschiedlichen Versuchsbetrieben hat gezeigt, dass die Bedeutung der Haltungsumwelt absolut dominierend ist und demgegenüber die Bemühungen durch einzelne Futterzusätze, einschließlich der „klassischen Fütterungsantibiotika“ die Leistung und Tiergesundheit zu verbessern, höchstens minimale Erfolge bringen. Um die Haltung entsprechend zu optimieren, haben sich Checklisten-Systeme zur Schwachstellenanalyse bewährt. Damit ist in der Schweinehaltung sicherlich ein Status quo zu realisieren, der als eine Art „Gold-Standard“ für die heutigen Bedingungen gelten kann. Dennoch bleiben einige prozessbedingte Belastungen für die Tiere bestehen; als sehr wesentlich ist die Belastung durch das Absetzen zu bewerten. Anhand unserer Untersuchungen konnten wir die Parameter, die diese Belastungen zeigen, identifizieren. Damit ist eine Objektivierbarkeit möglich. Weiter erbrachte der Vergleich der einzelnen untersuchten **Parameter** wichtige Hinweise, welche davon **zur Charakterisierung des Immunstatus beim Schwein** sinnvoll einzusetzen sind. Dabei sind auch die Aspekte des analytischen Aufwandes und der Kosten wesentlich. Als geeignet erscheinen besonders die Parameter, die möglichst geringe individuelle Schwankungen aufweisen. Die an Blutzellen durchgeführten Untersuchungen sind hier weniger gut zu bewerten; hingegen erwies sich die Messung der Immunglobuline IgG und IgA als diesbezüglich geeignet, sie sind aber kostenintensiv. Für Haptoglobin bestätigte sich die Aussagekraft und Praktikabilität des Parameters. Ein neu in die Studien aufgenommenen Aspekt, der **oxidative Stress**, erwies sich hierbei auch als ein sehr einfach zu messender Parameter, der gesundheitliche Belastungen zuverlässig und sensitiv aufzeigt. Derzeit ist aber der Kostenaufwand für diese Messungen zu hoch; **eigene Weiterentwicklungen** könnten hier aber **wesentliche Einsparungen** bringen.

Nachdem, wie schon angesprochen, die Belastung von Ferkeln durch das Absetzen bei den derzeit üblichen Aufzuchtverfahren nicht zu umgehen ist, sollten sich weiterführende Untersuchungen auf die Verbesserung der Ausgangssituation der Tiere konzentrieren. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Einsatz immunstimulativer Fütterungszusätze erst mit dem Absetzen möglicherweise zu spät erfolgt: selbst wenn die Substanzen wirksam sind, kommt die Wirkung für die Kompensation der Belastungen nicht rechtzeitig. Weil aber eine

Zufütterung derartiger Substanzen während der Säugephase aus praktischen Gründen kaum durchführbar ist, sollten weiterführende Untersuchungen auf die Optimierung des Immunstatus bei der Muttersau und damit der Kolostrumqualität zielen.

Mit dem hier erarbeiteten Wissen um geeignete Parameter zur Charakterisierung des Immunstatus inklusive der eigenen **methodischen Expertise** könnten solche Untersuchungen weitergeführt werden.

9. Mitteilung über evtl. schützenswerte Nutzungsrechte

- entfällt -

10. Liste über Veröffentlichungen

HISS S., SAUERWEIN H. (2003): Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs.

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition **87**: S. 1-11

SCHMITZ S, HISS S, SAUERWEIN H (2003): Influence of dietary β -glucan on various parameters of immune defense and on oxidative stress in pigs.

Proceedings of the Society of Nutrition Physiology **12** S. 72

HISS S; LIPPERHEIDE C; SAUERWEIN H (2001): Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin concentrations in blood of weaned pigs.

Proceedings of the Society of Nutrition Physiology **10** S.156

11. Liste über Vorträge

SCHMITZ S: β -Glukanzusatz im Schweinefutter: positive Effekte auf das Immunsystem?

Physiologie Kolloquium, Physiologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, 11.02.2003

SCHMITZ S, HISS S, SAUERWEIN H (2003): Influence of dietary β -glucan on various parameters of immune defense and on oxidative stress in pigs

57. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie vom 19-21.03.2003 in Göttingen

SCHMITZ S; SAUERWEIN H (2002): Untersuchungen zur immunmodulativen Wirkung von β -1,3/1,6-Glukanen beim Schwein

Vortragstagung der DGfZ und GfT am 18./19.09.2002 in Halle

HISS S. (2001) : Einfluß eines β -Glucan Futterzusatzes auf immunologische Parameter und Leistungsparameter beim Absatzferkel.
6. Dr. Eckel-Fachseminar, 30./31.10.2001 in Bad Neuenahr

SCHMITZ S., HISS S., SAUERWEIN H. (2003): Relationships between Haptoglobin and oxidative status in weanling piglets
Animal Welfare & Acute phase proteins, Segovia

12. Liste über Pressemitteilungen

- entfällt -

13. Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen und Demonstrationen

Eurotier Hannover 2002: Posterpräsentation zu den Forschungsaktivitäten des Instituts mit Berücksichtigung des hier untersuchten Themas

HISS S; LIPPERHEIDE C; SAUERWEIN H (2001): Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin concentrations in blood of weaned pigs

55. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie vom 06.-08.03.2001 in Göttingen

SCHMITZ S, HISS S, SAUERWEIN H (2003): Influence of dietary β -glucan on various parameters of immune defense and on oxidative stress in pigs

57. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie vom 19-21.03.2003 in Göttingen

14. Kurzfassung

Vor dem Hintergrund der zu erwartenden fortschreitenden legislativen Einschränkungen beim Einsatz von sogenannten Fütterungsantibiotika, werden sogenannte Immunstimulatoren als Futterzusätze zunehmend diskutiert. (1→3), (1→6)- β -D-Glukane, Polysaccharide, die in der Zellwand von u.a. Hefen vorkommen, werden in diesem Zusammenhang als der Tiergesundheit und Leistung förderlich beworben. Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war die Prüfung des Einsatzes von diesen β -Glukanen bei Absatzferkeln in Hinblick auf verschiedene Parameter des spezifischen und des unspezifischen Immunsystems sowie auf oxidativen Stress in wöchentlich gezogenen Blutproben. Tiergesundheit und Gewichtsentwicklung wurden ebenfalls aufgezeichnet. Erste Hinweise auf die Futteraufnahme stimulierende Effekte der verwendeten β -Glukanpräparation konnten in den Folgeversuchen nicht bestätigt werden. Die Gewichtsentwicklung der β -Glukan-behandelten Tiere unterschied sich nicht signifikant von denen der unbehandelten Kontrollen. In zwei Versuchen wurden Tendenzen ($p < 0,2$) zu veränderten Zuwachsraten festgestellt, die aber in einem Fall erhöht, im anderen Fall erniedrigt waren. Hinsichtlich der verschiedenen untersuchten immunologischen Parameter bzw. des oxidativen Stress konnten vereinzelt der Glukanbehandlung zuzuschreibende Auslenkungen beobachtet werden: die Konzentration an Immunglobin-G sowie die antioxidative Kapazität waren in zwei von drei Untersuchungen betroffen, der sogenannte oxidative Burst, der die Reaktivität einer Reaktion der neutrophilen Granulozyten kennzeichnet, war in einer Studie, bei der eine Überdosierung der Glukane getestet wurde, reduziert. Insgesamt hatte die Überdosierung keine negativen, aber auch keine positiven Effekte auf Leistung und Gesundheit. Für das sekretierte Immunglobin-A ergab sich in einer Studie mit bestimmungsgemäßer Glukandosierung ein stimulativer Effekt der β -Glukanbehandlung. Zur Tiergesundheit ergaben sich keine sichtbaren Effekte der Glukangaben; während der in einem Versuch auftretenden Atemwegs- und Durchfallerkrankungen konnte kein schützender Einfluss der Glukanfütterung festgestellt werden.

Angesichts der unterschiedlichen Wachstumsleistung der Tiere aus den beiden, anhand von Checklisten zum Hygienestatus charakterisierten Betrieben wird deutlich, dass die Haltungsumwelt in jedem Fall die Leistung weitaus stärker beeinflusst, als dies durch β -Glukane, aber auch durch Fütterungsantibiotika erzielt werden kann.

Unabhängig von der Glukan-Behandlung konnte die durch das Absetzen entstehende Belastung der Tiere anhand der Blutparameter sehr gut objektiviert werden. Künftige Forschungsansätze sollten darauf zielen, diese Belastungen zu minimieren. Hierzu sollte nicht erst während des Absetzens sondern schon früher, möglicherweise schon beim Muttertier, angesetzt werden.