

**Auswirkungen einer verlängerten
Säugezeit auf die humorale
Immunantwort von Ferkeln im
ökologischen Landbau**

Tanja Pollmüller

München 2009

Aus dem
Veterinärwissenschaftlichen Department,
Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung
der Tierärztlichen Fakultät München
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand : Prof. Dr. M. H. Erhard

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. M. H. Erhard

**Auswirkungen einer verlängerten Säugezeit auf die humorale
Immunantwort von Ferkeln im ökologischen Landbau**

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät München
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Tanja Pollmüller

aus Ahlen

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Erhard

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Heinritzi

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

*Meinen Eltern und meiner Schwester
in Liebe und Dankbarkeit*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Immunologie	3
2.1.1. Allgemeines	3
2.2. Immunglobuline beim Schwein	3
2.3. Die Immunität des neugeborenen Ferkels	4
2.4. Absorption von Immunglobulinen im Darm bei neugeborenen Ferkeln	4
2.5. Eigensynthese von Immunglobulinen und der Einfluss vom Absetzzeitpunkt auf das Immunsystem von Ferkeln	6
2.6. Einflüsse auf Immunreaktionen	7
2.7. Immunglobulin Y	8
2.7.1. Eigenschaften IgY	8
2.7.2. Immunisierung von Schweinen mit IgY	9
2.8. Ovalbumin	9
2.8.1. Eigenschaften Ovalbumin	9
2.8.2. Immunisierung von Schweinen mit Ovalbumin	9
2.9. Bedeutung und Einfluss von Adjuvantien	10
2.10. Einfluss der Laktation auf den Body-Condition-Index (BCI) von Muttersauen . . .	10
2.11. Das Gesäuge der Sau	11
3. Tiere, Material und Methoden	12
3.1. Haltung und Fütterung	12
3.1.1. Sauen	12
3.1.2. Ferkel	16
3.2. Routinemassnahmen	17

3.3. Versuchsanordnung	17
3.4. Bildliche Darstellung des Body-Condition-Index (BCI) und der Gesäugeleisten . .	17
3.5. Immunisierungen	18
3.6. Blutentnahme	18
3.7. Bestimmung der Immunglobuline	18
3.7.1. Schwein-Gesamt-IgG	19
3.7.2. Anti-OvA-IgG	20
3.7.3. Anti-Huhn-IgY-IgG	20
3.8. Formeln zur Berechnung der Antikörpertiter	21
3.9. Statistik	22
3.10. Versuchsanzeige	23
4. Ergebnisse	24
4.1. Gesamt-IgG	24
4.1.1. Transfer von maternalem IgG von der Sau auf die Ferkel	24
4.1.2. Verlauf der Gesamt-IgG-Konzentration der Ferkel	27
4.2. Anti-OvA-IgG	32
4.2.1. Transfer maternalen Anti-OvA-IgG-Antikörper von der Sau auf die Ferkel .	32
4.2.2. Verlauf der Anti-OvA-IgG-Titer der Ferkel	36
4.3. Anti-IgY-IgG	40
4.3.1. Verlauf der Anti-IgY-IgG-Titer der Ferkel	40
4.4. Qualitätskontrolle ELISA	45
4.5. Bildliche Darstellung der Sauen	45
4.5.1. Rötung der Sauengesäuge	46
4.5.2. Schwellung der Sauengesäuge	47
4.5.3. Verletzung der Sauengesäuge	48
4.5.4. Body-Condition-Index (BCI) der Sauen	49
5. Diskussion	50
5.1. Beurteilung des Immunstatus von Ferkeln in Abhängigkeit vom Absetzzeitpunkt .	50
5.1.1. Beurteilung des Immunstatus anhand der Gesamt-IgG-Konzentration . .	50
5.1.2. Beurteilung des Immunstatus anhand des Anti-OvA-IgG-Titers	52
5.1.3. Beurteilung des Immunstatus anhand des Anti-IgY-IgG-Titers	53

5.1.4. Beurteilung des Transfers von maternalen Antikörpern	54
5.1.5. Schlussfolgerung	55
5.2. Beurteilung des Body-Condition-Index (BCI) und der Gesäugeleisten	55
5.2.1. Beurteilung der Rötung der Sauengesäuge	56
5.2.2. Beurteilung der Schwellung der Sauengesäuge	56
5.2.3. Beurteilung der Verletzung der Sauengesäuge	56
5.2.4. Beurteilung des BCI	56
5.2.5. Schlussfolgerungen aus den bildlichen Sauendarstellungen	56
6. Zusammenfassung	58
7. Summary	60
Literaturverzeichnis	62
Abbildungsverzeichnis	68
Tabellenverzeichnis	70

Abkürzungsverzeichnis

a.p.	ante partum
B	Boosterung
BCI	Body Condition Index
bidest.	bidestillatus
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
IgG	Immunglobulin G
IgY	Immunglobulin Y
i.m.	intramuskulär
I	Immunisierung
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
OvA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PLGA MS	poly(D,L-lactide-co-glycolide)microspheres
PMWS	Porcines Multisystemic Wasting Syndrome
p.n.	post natum
p.p.	post partum
s.c.	subcutan
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TMB	Tetramethylbenzidin

1. Einleitung

Das Absetzen von Ferkeln von ihrem Muttertier beinhaltet einige Stressfaktoren, die sich negativ auf die Immunabwehr auswirken können. Es fehlt der bis dahin bestehende Sozialkontakt zur Mutter. Hinzu kommen Stress durch den Transport in einen anderen Stall und die Nahrungsumstellung. Zusätzlich herrscht in den neuen Ställen ein veränderter Keimdruck. Die Anfälligkeit der Ferkel für Erkrankungen ist in diesem Zeitraum also besonders hoch.

Die Ferkel erhalten nur durch das Kolostrum in den ersten Lebensstunden maternale Antikörper, die die passive Immunität gewährleisten. Diese passive Immunität zeichnet sich unter anderem nach Kolostrum-Aufnahme durch eine hohe Immunglobulin G (IgG)-Konzentration im Blut der Ferkel aus. Diese Antikörper nehmen in den ersten Wochen rapide ab (LANG, 2004).

Die Produktion eigener Immunglobuline befindet sich zum Absetzzeitpunkt jedoch erst am Beginn und die passive Immunität ist an ihrem Tiefpunkt hinsichtlich der IgG-Konzentrationen im Plasma. Es entsteht eine immunologische Lücke. Dem hinzu kommen die oben genannten Stressfaktoren rund um den Absetzzeitpunkt.

Im Jahr 2006 wurde die Tierschutz-Nutztierhaltungs-Verordnung hinsichtlich des Absetzzeitpunktes geändert. Laut Abschnitt 4 §22 dürfen Ferkel erst im Alter von über vier Wochen abgesetzt werden. Nur unter bestimmten Voraussetzungen dürfen sie früher abgesetzt werden.

Im ökologischen Landbau müssen Ferkel mindestens 40 Tage mit natürlicher Milch ernährt werden, das Mindestabsetzalter beträgt also 40 Tage. Zudem gibt es weitreichende Einschränkungen bei den Futtermitteln für Ferkel. Die im herkömmlichen Landbau üblichen Unterstücker im Futter dürfen im ökologischen Landbau nicht eingesetzt werden. Es gilt das Verbot von

Wachstums- und Leistungsförderern sowie Hormonen außer zur Einzeltiertherapie. Die präventive Verwendung chemisch-synthetischer allopathischer Arzneimittel ist im ökologischen Landbau verboten. Vorrang haben hier Phytotherapie, Homöopathie und Spurenelemente vor chemisch-synthetischen Tierarzneimitteln und Antibiotika. Nach mehr als drei Behandlungen gilt ein Vermarktungsverbot für das Bio-Fleisch. Gesetzliche Wartezeiten müssen verdoppelt werden und betragen mindestens 48 Stunden.

Durch diese strengeren Richtlinien als in der konventionellen Schweinhaltung stehen in der ökologischen Ferkelerzeugung die Landwirte vor zusätzlichen Schwierigkeiten. Obwohl die Anzahl lebend geborener Ferkel pro Wurf vergleichbar mit der konventionellen Haltung (Absetzzeitpunkt Tag 21 oder 28 p.n.) ist, fällt die Leistung bei der Anzahl der aufgezogenen Ferkel meist schlechter aus (LÖSER, 2007).

Ziel der Untersuchung ist es, die Auswirkungen einer verlängerten Säugezeit auf das humorale Immunsystem von Ferkeln zu untersuchen.

Die Förderung des Projektes erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE); Bundesprogramm ökologischer Landbau.

2. Literaturübersicht

2.1. Immunologie

2.1.1. Allgemeines

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, Infektionserreger wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten abzuwehren. Die Immunabwehr wird in ein angeborenes, nicht-adaptives und in ein erworbenes, adaptives Immunsystem eingeteilt. Die Lymphozyten sind Bestandteil des erworbenen Abwehrmechanismus. Die Lymphozyten werden in T- und B-Lymphozyten unterteilt. Die Immunantwort von B-Lymphozyten ist humoral und adaptiv. Nach Antigenstimulation bilden sie hochspezifische Glycoproteine, die so genannten Immunglobuline oder Antikörper (GÖBEL und KASPERS, 2004).

2.2. Immunglobuline beim Schwein

Schweine besitzen laut CURTIS und BOURNE (1971) drei Immunglobulinklassen: IgG, IgA, IgM. BARRIGA und INGALLS (1984) beobachteten im Zusammenhang mit *Ascaris suum*-Infektionen das Vorkommen von IgE-ähnlichen Antikörpern. ZIKAN et al. (1983) beschreiben in ihrer Arbeit das Vorhandensein von IgD in Schweineserum und Milzzell-Lysat. Gene für IgD wurden von ZHAO et al. (2002) nachgewiesen. Das IgG beim Schwein wird in mehrere Subklassen, die verschiedene biologische Aktivitäten zeigen, unterteilt: IgG1a, IgG1b, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgG5 und IgG6 (BUTLER und BROWN, 1994; KACSKOVICS et al., 1994; BUTLER et al., 2006/1; BUTLER und WERTZ, 2006/2). IgG ist das dominante Serum-Immunglobulin (TIZARD, 2008). Beim Schwein ist als Serumkonzentration ein Richtwert für IgG von 17-28 mg/ml angegeben (JUNGI, 2000).

2.3. Die Immunität des neugeborenen Ferkels

Die histologische Struktur der Placenta vom Schwein ist vom epitheliochorialem Typ. Das Chorionepithel ist mit dem intakten Uterusepithel in Kontakt. Bei diesem Typ von Plazenta ist keine Passage von Immunglobulinmolekülen möglich. Durch die Geburt werden die Ferkel aus der sterilen Umgebung des Uterus mit einer an Mikroorganismen reichen Umwelt konfrontiert (ROOKE und BLAND, 2002; TIZARD, 2008; SALMON et al., 2009). Die Nachkommen werden von dem Muttertier ausschließlich durch das Kolostrum mit Antikörpern versorgt (BRAMBELL, 1969; PORTER, 1969), es sei denn es liegt ein Plazentadefekt vor. Dann können Immunglobuline im Serum von noch nicht geborenen Ferkeln nachgewiesen werden (SETCAVAGE und KIM, 1976). Die Zusammensetzung der Milch der Muttersauen variiert stark im Laufe des Laktationsprozesses. Im Kolostrum ist die Konzentration von IgG am höchsten, in der späteren Milch die Konzentration von IgA (CHIDLOW und PORTER, 1977; BUTLER et al., 2006/1). Laut STALLJOHANN (2006) gibt es Korrelationen zwischen Antikörpergehalten des Kolostrums und dem Serumtiter der Ferkel.

2.4. Absorption von Immunglobulinen im Darm bei neugeborenen Ferkeln

Die Aufnahme des IgG durch den Ferkeldarm erfolgt durch Pinozytose der Epithelzellen. Die Permeabilität ist am höchsten nach der Geburt und sinkt nach sechs Stunden. Nach 24 Stunden hat die Absorption ein sehr niedriges Level (ROOKE et al., 2003; TIZARD, 2008). Die Fähigkeit der Neugeborenen die Antikörper intakt zu absorbieren ist auch laut BRAMBELL (1969) nach einigen Stunden beendet und die Antikörper werden stattdessen verdaut.

Das gesamte IgG im Kolostrum hat seinen Ursprung im Serum der Sau. Erst das IgG aus der Milch wird zu 70% im Gesäugegewebe gebildet (BOURNE und CURTIS, 1973). BOURNE (1973) untersuchte außerdem die Immunglobulinkonzentrationen im Serum, Kolostrum und in der Milch (s. Tab. 1).

Tabelle 1.: IgG-Konzentrationen (mg/ml) nach BOURNE (1973)

Probe	IgG
Serum (Schwein)	18,3
Serum (laktierende Sau)	24,3
Kolostrum	61,8
Milch (24 Std.)	11,8
Milch (2 Tage)	8,2
Milch (3-7 Tage)	1,9
Milch (8-35 Tage)	1,4

BUTLER et al. (1981) untersuchten die Lokalisation der Aufnahme von Immunglobulinen im Ileum von neugeborenen Ferkeln. Sie stellten fest, dass das Villusepithel eine wichtige Rolle bei der Absorption von kolostralem IgG spielt. Dagegen wurde kein IgG in der Kryptenregion nachgewiesen.

Wenn das Ferkel 24 Stunden alt ist, variiert die IgG-Konzentration im Serum von 18,7-39,0 mg/ml und sinkt dann bis zu einem Minimum von 6,3 mg/ml an Tag 36-40 p.n. (BOURNE, 1973). Zu einem Absetzzeitpunkt von 5-6 Wochen erreicht die Serum-IgG-Konzentration also ihr niedrigstes Level (BOURNE, 1973). Laut FRENYO et al. (1980) ist 24 Stunden nach der Geburt die IgG-Konzentration mit $39,5 \pm 1,5$ mg/ml im Serum am höchsten - der niedrigste Level ($8,9 \pm 0,6$ mg/ml) wird mit einem Alter von 4 Wochen (s. Tab. 2) erreicht. In einem aktuellerem Artikel beschreiben MARTIN et al. (2005) die niedrigste IgG-Serum-Konzentration zur Geburt ($<0,06$ mg/ml), ihren Höhepunkt am 2. oder 3. Tag p.n. (>40 mg/ml) und den Tiefpunkt in einem Alter von 8 Wochen (ca. 9 mg/ml). Laut LANG (2004) ergibt sich für Tag 3 p.n. eine gemittelte Serum-IgG-Konzentration von $16,3 \pm 0,9$ mg/ml. Danach kommt es zu einem signifikantem Abfall der IgG-Konzentration bis zum 20. Lebenstag ($5,6 \pm 0,4$ mg/ml). Am 23. Lebenstag konnte eine nahezu unveränderte Serum-IgG-Konzentration festgestellt werden. Bis zum 35. Lebenstag fiel die Konzentration nochmals signifikant auf $4,6 \pm 0,2$ mg/ml ab. Bei drei weiteren Blutprobenentnahmen am 49., 63. und 77. Lebenstag konnte ein signifikanter Anstieg der Serum-IgG-Konzentrationen auf $8,9 \pm 0,5$ mg/ml ermittelt werden.

JENSEN et al. (2001) stellten fest, dass Schweine- und Rinderkolostrum Faktoren beinhalten, die die intestinale Endozytose und enzymatische Kapazität in neugeborenen Ferkeln stimulieren, ganz im Gegensatz zu Schweineplasma oder Milch. Dies ergab sich durch die Messungen von einem bovinen Serum Albumin als Marker in den oben genannten 4 verschiedenen

Fütterungen.

Tabelle 2.: Veränderungen der Durchschnitts-IgG-Konzentration (mg/ml) im Serum von Ferkeln von der Geburt bis zu einem Alter von 10 Wochen (FRENYO et al., 1980)

Zeit (Wochen)	Mittelwert	Standardfehler des Mittelwerts (SEM)	n
1	20,92	1,09	34
2	14,11	1,04	33
3	9,72	0,86	31
4	8,92	0,59	31
5	9,57	0,71	27
6	12,71	1,09	25
7	14,63	1,12	24
8	17,83	1,44	26
9	21,53	1,90	22
10	21,84	1,93	27

2.5. Eigensynthese von Immunglobulinen und der Einfluss vom Absetzzeitpunkt auf das Immunsystem von Ferkeln

Laut BLECHA et al. (1983) hat ein Absetzzeitpunkt von unter fünf Wochen p.n. einen schlechten Einfluss auf die zelluläre Immunität von Ferkeln. Die mit zwei bis vier Wochen abgesetzten Ferkel zeigten eine geringere zelluläre Immunantwort auf den Phytohemagglutinin-Haut-Test als die Ferkel, die mit fünf Wochen abgesetzt wurden. Das Ergebnis von der nicht abgesetzten Kontrollgruppe und den nach fünf Wochen abgesetzten war nicht signifikant unterschiedlich.

Die Halbwertszeit von absorbiertem IgG im Schweineserum variiert zwischen 6,5 und 22,5 Tagen. Die ersten 2-3 Wochen trägt die eigene IgG-Produktion wenig zum Serum-IgG-Level des Ferkels bei (CURTIS und BOURNE, 1973). Die Periode von der späten Trächtigkeit bis zum Absetzen ist deshalb ein kritisches Fenster, wenn das adaptive Immunsystem sich entwickelt und den Schutz der passiven Immunität ersetzt (BUTLER et al., 2006; BUTLER und SINKORA, 2007). Bei dreimaliger intramuskulärer Injektion der Sau vor der Geburt mit einem Pferde-Milz-Eisen-Antigen und Freund' Adjuvans fand BOURNE (1973) heraus, dass spezifische Antikörper gebildet werden. In der spezifischen IgG-Fraktion stiegen die Werte vom Serum der Sau (0,3

mg/ml), über das Kolostrum (0,8 mg/ml) bis zur Milch (1,9 mg/ml) hin an.

BROWN et al. (1961) fanden heraus, dass durch das Kolostrum erworbene Antikörper bis sechs Wochen nach der Geburt im Blutstrom des Neugeborenen persistieren - ohne Unterschied zwischen noch nicht abgesetzten und mit zwei Wochen abgesetzten Ferkeln. Die Ferkel produzieren aktiv Antikörper (in Anwesenheit von Kolostrum-erworbenen Antikörpern gegen das selbe Bakterium) in einem Alter zwischen 4 und 5 Wochen. Ferkel, die schon mit 2 Wochen abgesetzt werden, produzieren mit 3 Wochen Antikörper. HAYE und KORNEGAY (1979) beobachteten nach einer Infektion mit unterschiedlichen Antigenen bei den bei der Sau verbleibenden Ferkeln höhere Antikörpertiter als bei den früh abgesetzten Wurfgeschwistern.

HOERLEIN (1957) forschte über den Einfluß von Kolostrum auf die Antikörperbildung in Ferkeln. Dabei ergab sich, dass kolostrumfrei aufgezogene Ferkel bis zur 8. Lebenswoche keine Immunantwort gegenüber den vier angewandten Antigenen (Brucella abortis bacterin, gewaschene Schaferythrozyten, Rinderserum und 20%ige Eiweißlösung, jeweils 3 und 6 Wochen p.n. i.v. injiziert) vorwiesen, während kolostral versorgte in der dritten Lebenswoche reagierten. Sein Experiment zeigte außerdem, dass Antikörperbildung tatsächlich niedriger in solchen Ferkeln ist, die „immunisiertes“ Kolostrum erhielten im Vergleich zu den Ferkeln, die normales Kolostrum erhielten.

DE ARRIBA et al. (2002) wiesen nach, dass der IgG-Antikörpertiter signifikant nach einer Immunisierung mit einem Virus steigt. Eine Immunisierung der Sau gegen Bordetella pertussis während der Trächtigkeit ruft Bordetella pertussis-spezifische IgG-Antikörper im Kolostrum und im Serum der Sau hervor. Die Ferkel dieser immunisierten Sauen hatten eine signifikante Konzentration von spezifischen IgG im Serum (ELAHI et al., 2006).

2.6. Einflüsse auf Immunreaktionen

Eine Ursache der Erkrankungen von Schweinen nach dem Absetzen der Ferkel liegt laut PIRRON (2001) vor allem im gehäuften Auftreten von Stressoren in dieser Altersgruppe. Die Ausschüttung von Katecholaminen unter Stresseinwirkungen spielt für das Überleben und die Verbreitung von Erregern eine wichtige Rolle. Z.B. bewirkt Adrenalin durch die Steigerung der Magensäureproduktion ein Absenken des pH-Wertes im Magen. Dadurch wird ein günstiges Überlebensmilieu für Salmonellen geschaffen. Ein streßinduzierter Corticoidanstieg senkt die Aktivität der Leukozyten, Makrophagen und Plasmazellen, wodurch ein Eindringen von Erre-

gern erleichtert wird (PIRRON, 2001).

Laut DENNIS (2002) wirkten sich mehrere einzuhalten Regeln in der Schweinehaltung negativ auf das Vorkommen von dem Porcinen Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) aus. Unter anderen Massnahmen waren folgende Aspekte zu berücksichtigen:

- Futterwechsel nie innerhalb von einer Woche nach Umstallung
- allmählicher Futterwechsel
- zwischen den Gruppen Ställe reinigen, desinfizieren und leer stehen lassen
- Rein-Raus-Verfahren

Diese Art der Haltung verbesserte die Gesundheit der Schweine spürbar. Es wurden nicht nur die Sterblichkeit und die Zahl der klinischen Fälle von PMWS reduziert, sondern das Wachstum der Ferkel übertraf sogar die Leistungen, die vor dem Ausbruch von PMWS erzielt worden waren.

KELLEY et al. (1982) konnten zeigen, dass ein Hypothermie hervorrufender Kältestressor von 21°C die Absorption von kolostralen Antikörpern in Ferkeln nicht beeinträchtigt. Hingegen zeigen Sauen, die vor der Geburt Hitze ausgesetzt wurden, eine Tendenz zu niedrigeren IgG-Konzentrationen im Kolostrum und in der Milch 24-48 Stunden nach der Geburt. Dadurch ergibt sich ein niedriger Serum-IgG-Gehalt ihrer Ferkel für die ersten 20 Tage p.n. (MACHADO-NETO et al., 1987).

Schlussfolgernd haben Stress, Futterwechsel und eine Änderung des Keimmilieus einen negativen Einfluss auf die Immunreaktion von Ferkeln.

2.7. Immunglobulin Y

2.7.1. Eigenschaften IgY

Immunglobulin Y, (IgY), ist eine Klasse von Immunglobulinen bei Vögeln.

IgY ist in Hühnern wie das IgG der Säuger aus zwei leichten und zwei schweren Ketten aufgebaut. Strukturell unterscheiden sich beide Immunglobulinklassen vor allem in den schweren Ketten, die bei IgY größer sind als bei IgG. Die leichten Ketten von IgY sind etwas kleiner im Vergleich zu IgG. Das Molekulargewicht von IgY (über 190 kDa) ist höher als das von IgG (SCHADE et al., 2001). Laut HIGGINS und WARR (1993) ist das IgY hingegen dem IgE der Säuger sehr ähnlich.

2.7.2. Immunisierung von Schweinen mit IgY

TORCHE et al. (2006) verabreichten Schweinen unter anderem IgY, welches mit PLGA MS- (poly(D,L-lactide-co-glycolide)microspheres) beladen wurde. Weil großes Interesse an der Entwicklung von mukosalen Impfstrategien besteht, wurde für diesen Zweck PLGA MS entwickelt, um die löslichen Antigene zu verkapseln. Dabei wurden die gesamten IgY-spezifische Antikörper ohne Klassifizierung nach einer einfachen intramuskulären Immunisierung im Serum der Schweine gemessen. Bei den Untersuchungen kam heraus, dass die totalen anti-IgY-Immunglobuline ca. bis zum 30. Tag nach der Immunisierung mit freiem IgY stark ansteigen und danach langsamer abfallen und die Injektion von freiem IgY eine höhere Immunglobulinantwort auslöst, als das verkapselte IgY.

2.8. Ovalbumin

2.8.1. Eigenschaften Ovalbumin

Ovalbumin, (OvA), ist im Hühnerei zu ca. 54% in den Eiklarproteinen enthalten. Ovalbumin ist ein Glykoprotein mit einer relativen Molekülmasse von 46.000 und einem isoelektrischen Punkt von pH 4,5-4,8 (WIESNER und RIBBECK, 2000).

2.8.2. Immunisierung von Schweinen mit Ovalbumin

In zwei verschiedenen Experimenten fanden MILLER et al. (1994) heraus, dass nach einer Immunisierung mit OvA ein Anstieg von Anti-OvA-IgG folgt, welcher nach einer sekundären Immunisierung nach 2 Wochen weiter steigt.

Auch bei der Fütterung von Sauen mit OvA findet laut TELEMO et al. (1991) ein Übergang von Antigen und Antikörper über das Kolostrum in die zu säugenden Ferkel statt. Bei der Versuchsgruppe, bei der den Muttersauen während der Gestation und Laktation OvA verabreicht wurde, fällt im Serum der Ferkel der Anti-OvA-IgG-Titer konstant während des Saugens und der Absetzperiode (Absetzen nach 3 Wochen p.n.). Die Ferkel der Versuchsgruppe, bei der den Muttersauen nur während der Laktation OvA oral verabreicht wurde, starteten die IgG-Antikörperproduktion gegen OvA bevor sie abgesetzt wurden und zeigten einen rapiden Anstieg als Antwort auf das Absetzen der Ferkel.

2.9. Bedeutung und Einfluss von Adjuvantien

Adjuvantien werden in der Medizin Impfstoffen zugesetzt. Es handelt sich bei Adjuvantien um Stoffe, die die normale Immunantwort verstärken können und Antikörpertiter erhöhen (SCHIJNS, 2000; VAN DER VEN, 2002; KENNETH et al., 2007; BENNECKE, 2008). Dieses geschieht auf verschiedene Wirkungsweisen.

Zum Beispiel wird beim Aluminiumhydroxid die Aufarbeitung des Antigens so beeinflusst, dass es in wirksamerer Form präsentiert wird. Indem das Antigen in solch einen unlöslichen Stoff eingebunden wird, wird die Abbaugeschwindigkeit des Antigens verändert, folglich entsteht ein Depot, welches nur langsam aufgelöst wird. Dadurch kann die Halbwertszeit des Antigens im Körper um ein Vielfaches verlängert und die Immunantwort durch den verlängerten Kontakt verstärkt werden (VAN DER VEN, 2002).

Aluminiumhydroxid ist ein unlösliches, gelartiges Präzipitat der Salze. Dieses Adjuvans besteht aus mikroskopisch kleinen Partikeln mit einer Größe von 100-1000 nm. Das Immunogen wird durch elektrostatische Interaktion im vorgeformten Gel oder während der Gelbildung in situ gebunden (COX und COULTER, 1997; VAN DER VEN, 2002).

GOTO et al. (1997) verglichen die Wirkung von vier Adjuvantien. Dazu wurden die vier zu untersuchenden Adjuvantien jeweils mit OvA oder Tetanus Toxoid (TT) injiziert sowie das lösliche OvA und TT separat (ohne Adjuvans). Hierbei war Aluminiumhydroxid-Suspension in der Adjuvans-Aktivität beim OvA an zweiter Stelle. Ab dem 8. Tag nach der Injektion zeigten die mit Adjuvans und OvA gespritzten Schweine eine höhere ELISA-Einheit in ihrer IgG-Antikörperantwort als ohne Adjuvans. Folglich beeinflussen Adjuvantien die Immunantwort auf Antigene in diesem Falle auf OvA- positiv.

2.10. Einfluss der Laktation auf den Body-Condition-Index (BCI) von Muttersauen

Sauen sind während der Laktation in der Lage die Mängel in der Energie und Proteinversorgung, innerhalb gewisser Grenzen, durch den Abbau von Körpersubstanz auszugleichen. Die Mobilisationsfähigkeit aus den Körperreserven erschöpft sich aber mit fortschreitender Laktation, so dass der Ernährungseinfluss auf die Milchproduktion mit zunehmender Laktationsdauer steigt (RAMANAU, 2004). Laut der Projektergebnisse von FRÜH (2007) bestand keine Korrela-

tion zwischen dem BCI und dem Alter der Ferkel, also der Säugedauer, bzw. der Gruppengröße des Gruppensäugens. Der Nährzustand der Sauen ist also weniger eine Frage der Dauer der Säugeperiode als ein Hinweis auf das Fütterungsmanagement.

2.11. Das Gesäuge der Sau

An Euterhaut und Zitze kommen Verletzungen in Form von Quetsch-, Riss-, Biss- und Stichwunden unterschiedlicher Größe und Ausdehnung vor. Häufigste Ursache von Verletzungen sind Ferkelbisse, aber auch nicht tiergerechte Stalleinrichtungen können verantwortlich sein. Letztlich können sich die Sauen die Verletzungen auch durch ihre Klauenschuhe selbst beibringen (IBEN, 2003). Adspektorisch sollte bei der Sau unter anderem auf Hautrötung als Entzündungszeichen und auf hervortretende Knoten (Schwellungen) als Symptome von abszedierender Mastitis oder Aktinomykose geachtet werden (PLONAIT, 2004). Auch laut JACKSON (2006) kann sich bei Schweinen bald nach dem Abferkeln eine schwere Mastitis (unter anderem ersichtlich durch Rötung und Schwellung des Gesäuges) durch eine Klebsiella-Infektion entwickeln, andere Erreger wie *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* können für ähnliche Symptome verantwortlich sein.

3. Tiere, Material und Methoden

Die Förderung des Projektes erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE); Bundesprogramm ökologischer Landbau. Für die Studie wurden 36 weibliche Hülsenberger Euroc Schweine inklusive 6 Reservetiere von dem Institut für ökologischen Landbau in Trenthorst des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) für 3 Durchgänge bereitgestellt, von denen 2 Durchgänge immunologisch begleitet wurden. Pro Sauenwurf wurden 8 Ferkel mittleren Gewichts in den Versuch miteinbezogen.

3.1. Haltung und Fütterung

3.1.1. Sauen

Die zu deckenden und tragenden Sauen wurden in Freilandhaltung gehalten (s. Abb.1). Die Versuche betrafen die zweite und dritte Laktation der Sauen. Im Sommer hatten die Sauen eine Grünfläche und im Winter eine befestigte Betonfläche als Auslauf. In beiden Haltungssystemen kamen Großpellets (Biolandmühle Meyerhof zu Bakum, Melle; Zusammensetzung s. Tab. 3 im Anhang) als Futtermittel zum Einsatz, die mit einem Düngestreuer verteilt wurden (s. Abb. 2). Pro tragende Sau wurden 2 kg Futter und Silo ad libitum gefüttert. Ab dem 81. Tag der Trächtigkeit wurde die Ration pro Sau auf 3,5 kg heraufgesetzt. Hygienisch einwandfreies Wasser wurde durch Tankwagen zugeführt. Für das Komfortverhalten war jederzeit eine Suhle zu erreichen. Als Unterschlupf dienten mehrere mit Stroh eingestreute Hütten. Eine Woche vor der Geburt wurden sie in Heku-Abferkelbuchten mit einem ständig verfügbarem Auslauf umgestallt (s. Abb. 3). Hier wurde unter Beobachtung und medizinischer Betreuung abgeferkelt. Nach 7-tägiger Anfütterung von 3 auf 8 kg Pellets/Sau/Tag wurde bis zum Ende der Säugezeit gefüttert. Ca. 2 Wochen p.p. wurden die säugenden Sauen mit ihren Ferkeln in Gruppensäugebuchten in 3er Gruppen (evtl. in 2er Gruppen, wenn es nicht anders möglich war) umgestallt.

Diese bestanden aus einem Ferkelbereich, Sauenfressbereich, Sauenliegeabteil und einem Auslauf (s. Abb. 4). Zum Absetzen wurden die Sauen wieder von dem Gruppensäugestall auf die Weide bzw. zur Winterstallung umgestellt.



Abbildung 1.: Sauen in der Freilandhaltung, Foto: Ralf Bussemas, Trenthorst



Abbildung 2.: Fütterung der Sauen, Foto: Ralf Bussemas, Trenthorst



Abbildung 3.: Ausläufe der Abferkelstallungen, Foto: Ralf Bussemas, Trenthorst



Abbildung 4.: Ausläufe der Gruppensäugestallungen, Foto: Ralf Bussemas, Trenthorst

3.1.2. Ferkel

Am nach dem Absetzen folgenden Wochenbeginn wurden die Ferkel in den Aufzuchtstall mit Außenklima und Auslauf eingestallt (s. Abb. 5). Die festen Gruppen aus dem Gruppensäugen blieben dabei bestehen. Gefüttert wurden diese mit 6 mm Prestarter-Pellets ad libitum. Ab dem 30. Tag p.n. wurde Aufzuchtfutter eingemischt (Zusammensetzung s. Tab. 5 im Anhang). In allen Stallungen und Ausläufen wurde Stroh als Einstreu verwendet. Die Wasserversorgung wurde ad libitum gewährleistet.

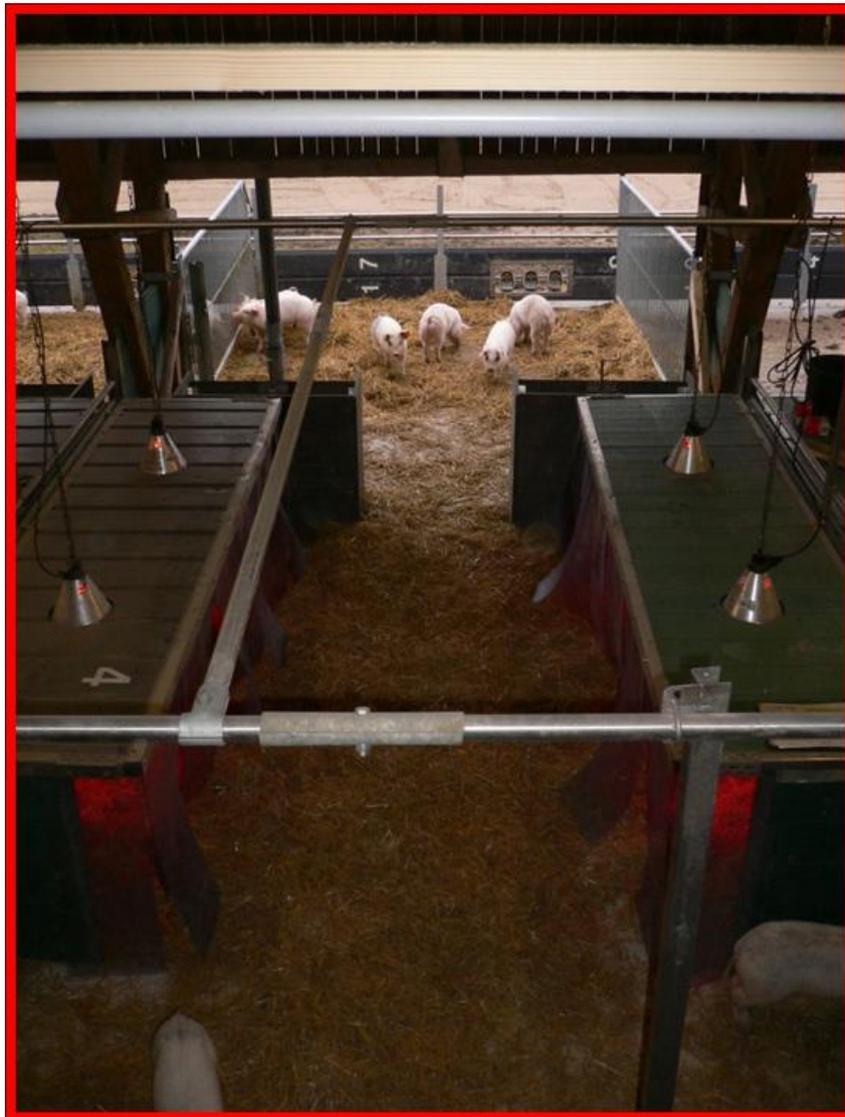


Abbildung 5.: Aufzuchtstallungen der Ferkel, Foto: Ralf Bussemas, Trenthorst

3.2. Routinemassnahmen

Drei Mal jährlich wurde eine Bestandsimpfung der Sauen gegen Parvovirose und Rotlauf durchgeführt. Sechs und zwei Wochen a.p. wurden die Sauen gegen E. Coli und Clostridien mit 4 ml eines Handelsimpfstoffs (Clostricol, IDT) geimpft. Die Ferkel erhielten innerhalb der ersten 24 Stunden Eisen (Bioweyxin® FeVit+B₁₂, Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn) oral und am Tag 14 p.n. 2 ml Eisen i.m. Kastriert wurden sie innerhalb der ersten 7 Lebenstage. Außerdem wurden sie am Tag 7 und Tag 21 p.n. gegen Mycoplasmen (Stellamune® Mycoplasma, Pfizer, Karlsruhe) s.c. mit 2 ml in die Kniefalte geimpft. Mit der Umstallung der Ferkel zum Gruppensäugen 14 Tage p.n. wurden ihnen Ohrmarken zur Identifizierung eingezogen.

3.3. Versuchsanordnung

Die 2 Durchgänge mit jeweils 36 Sauen wurden getrennt beurteilt und eingeteilt. Von 18 Sauen wurden die Ferkel früh abgesetzt (Tag 42 p.n.). Die Ferkel der anderen 18 Sauen wurden spät (Tag 63 p.n.) abgesetzt. Diese 2 Gruppen wurden nochmals in Untergruppen aufgeteilt: die Ferkel von jeweils 9 Sauen wurden früh immunisiert (Tag 42 p.n.) die Ferkel der anderen 9 Sauen spät (Tag 63 p.n.).

3.4. Bildliche Darstellung des Body-Condition-Index (BCI) und der Gesäugeleisten

Um den Ernährungszustand und den Gesundheitsstatus des Gesäuges der Muttertiere nicht außer Acht zu lassen, wurden an den Tagen 3, 42 und 63 p.p. (Tag 63 p.p. nur bei den spät-abgesetzten) Fotos gemacht. Durch ein Foto von caudal wird der BCI nach dem Körperkonditionsbeurteilungsschema von BILKEI und BÖLCSKEI (1993) bestimmt. Durch jeweils ein Foto von der linken und rechten Seite des gesamten Gesäuges wurden die Rötung, die Schwellung und eventuelle Verletzungen beurteilt. Diese Parameter wurden in folgende 4 Abstufungen eingeteilt:

1 = kein/e

2 = geringgradig

3 = mittelgradig

4 = hochgradig

Die Beurteilung wurde verblindet von 5 verschiedenen erfahrenen Tierärzten vorgenommen. Der Mittelwert aus diesen Bewertungen wurde für die Statistik verwendet. Hierbei wurden die früh abgesetzten Sauen (Tag 42 p.p.) gegen die spät abgesetzten Sauen (Tag 63 p.p.) aufgeführt. Es wurden nur die Fotos der dritten Laktation bewertet.

3.5. Immunisierungen

Genauere Bezeichnungen, Firmen und deren Herkunftsort von Chemikalien, Reagenzien, Materialien, Geräten und Programmen werden im Anhang aufgeführt. Die Immunisierungslösung für die Ferkel bestand aus 0,5 mg IgY vom Haushuhn, 0,5 mg OvA und 4 mg $\text{Al}(\text{OH})_2 \cdot \text{xH}_2\text{O}$. Diese Bestandteile wurden in 1 ml PBS gemischt und vor jeder Injektion gut geschüttelt. Die Injektion mit 0,4 ml/ Tier an Tag 42/63 und Tag 63/84 p.n. erfolgte i.m. hinter dem Ohr am Übergang von behaarter zu unbehaarter Haut. Die Impfung der Muttertiere mit 1 ml/ Tier erfolgte 6 und 2 Wochen a.p. an der gleichen Injektionsstelle. Diese enthielt 0,5 mg OvA und 4 mg $\text{Al}(\text{OH})_2 \cdot \text{xH}_2\text{O}$ in 1 ml PBS gelöst.

3.6. Blutentnahme

Die Blutentnahmen bei den Ferkeln erfolgten aus der Vena cava cranialis an den Tagen 7, 42, 49, 63, 70, 84 und 91 p.n. Bis zum Tag 49 p.n. wurden die Ferkel auf den Rücken gelegt und von einem Helfer fixiert. Dabei wurde besonders auf die gestreckte Kopf-Halslage geachtet, um eine sichere Punktion durchführen zu können. Bei den weiteren Probengewinnungen ab dem 63. Tag p.n. wurden die Blutentnahmen aufgrund der Größe der Tiere mit Hilfe einer Oberkieferschlinge durchgeführt. Für die Plasmagewinnung wurden 9 ml Lithium-Heparin-Monovetten[®] verwendet. Das Blut wurde sofort gekühlt und im Labor bei 4 °C für 10 Minuten bei 3500 g zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Messung eingefroren.

3.7. Bestimmung der Immunglobuline

Die Immunglobulinbestimmung erfolgte mittels ELISA. Die für den ELISA benötigten Puffer und Lösungen sind im Anhang aufgeführt, ebenso wie die Geräte und Antikörper. Ein Plasmapool

der Schweine wurde als Qualitätskontrolle auf jeder Platte mitgemessen.

3.7.1. Schwein-Gesamt-IgG

Eine 96-F-Loch-Mikrotiterplatte aus Polystrol wurde mit Kaninchen-anti-Schwein-IgG beschichtet (2 µg Antikörper pro ml Beschichtungspuffer). Hierzu wurden 100 µl in jede Kavität der Platte pipettiert. Anschließend wurde die Platte bei 4 °C über Nacht inkubiert und nachfolgend gewaschen. Gelatine wurde in einer Konzentration von 0,5% in PBS pH 7,2 gelöst. In jede Kavität wurden 200 µl dieser Lösung einpipettiert, um die freien Bindungsstellen der Platte in jeder Vertiefung zu blockieren. Dazu wurde die Platte für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgte wiederum vor dem nächsten Schritt ein Waschvorgang.

Der im folgendem nur noch als Waschvorgang bezeichnete Schritt beinhaltete viermaliges Waschen der Platten mit PBS-Tween in einem mechanischen Waschgerät (Firma s. Tab. 7 im Anhang) und anschließendem Ausklopfen auf Zellstoff zur Entfernung von Flüssigkeitsresten. Die Plasmaproben der Schweine wurden mit 100 µl PBS-Tween im Verhältnis 1:5000 verdünnt und in die oberste Kavität einer jeden Spalte der Mikrotiterplatte aufgetragen. Daraufhin wurde in jeder Spalte eine zweierlogarithmische Verdünnungsreihe angelegt, so dass am Ende jede Vertiefung mit 50 µl beschickt war. Als Standard wurde in Spalte 6 porcines IgG in einer Anfangskonzentration von 3 µg/ml aufgetragen und ebenfalls in zweierlogarithmischen Schritten verdünnt. Spalte 1 diente als Leerwert und wurde mit 50 µl PBS-Tween pro Kavität gefüllt. Anschließend folgte eine Stunde Inkubation bei 37 °C. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde in jede Kavität 100 µl eines an Peroxidase gekoppelten Kaninchen-anti-Schwein-IgG-Konjugats in einer Konzentration von 1:100000 (in PBS-Tween) pipettiert. Die Platten wurden erneut für eine Stunde inkubiert. Nach dem Waschvorgang wurden in jede Kavität der Platte 100 µl der Substratlösung (Zusammensetzung s. Tab. 6 im Anhang) pipettiert und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl einer einmolaren Schwefelsäure wurde die Enzymreaktion gestoppt- durch den niedrigen pH-Wert schlägt die Farbe von blau nach gelb um. Die Intensität der Gelbfärbung war proportional zum IgG-Gehalt der Probe und konnte photometrisch bei 450 nm mittels ELISA-Readers gemessen werden. Mit Hilfe eines Computerprogramms (MikroWin, Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath) wurde anhand der Standardkurve die IgG-Konzentration der Proben errechnet.

3.7.2. Anti-OvA-IgG

Anfangs findet eine Beschichtung der Platte mit 100 µl des 2 µg OvA/ ml pro Kavität und eine Inkubierung bei 4 °C über Nacht statt. Anschließend wurde die Platte mit einem mechanischen Waschgerät gewaschen. Blockiert wurden die freien Bindungsstellen daraufhin mit 200 µl einer 0,5%igen Gelatine pro Kavität und einer Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Plasmaproben 1:5 mit PBS-Tween verdünnt und mit je 100 µl in die oberste Kavität einer jeden Spalte aufgetragen. Spalte 1 diente als Leerwert und wurde mit 50 µl PBS-Tween pro Kavität gefüllt und in Spalte 6 befand sich der interne Standard und in Spalte 7 der POOL in einer Verdünnung 1:5. Nachdem eine zweierlogarithmische Verdünnungsreihe dieser Spalten angelegt wurde, fand wieder eine Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C statt. Vor dem nächsten Schritt erfolgte erneut ein Waschvorgang. Das Konjugat, ein an Peroxidase gekoppeltes Kaninchen-anti-Schwein-IgG, wurde dann mit einer Konzentration von 1:20.000 mit jeweils 100 µl auf die Kavitäten pipettiert und erneut 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Auf den nächsten Waschvorgang folgte das Pipettieren von je 100 µl in die Kavitäten von warmem TMB-Substrat und ein 10-minütiges Belassen der Platte in absoluter Dunkelheit. Mit je 50 µl einer einmolaren Schwefelsäure wurde die Enzymreaktion in den Kavitäten gestoppt. Der Anti-OvA-IgG-Gehalt der Probe war proportional zur Gelbfärbung und wurde photometrisch bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 595 nm mittels eines ELISA-Readers gemessen. Mit Hilfe mehrerer Formeln wurde der Anti-OvA-IgG-Titer der Proben bei einer Extinktion von 0,7 errechnet.

3.7.3. Anti-Huhn-IgY-IgG

Beim ersten Schritt der Beschichtung wurde eine Menge von 100 µl des 2 µg/ml Huhn-IgY in die Kavitäten pipettiert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit einem mechanischen Waschgerät gewaschen. Blockiert wurden die freien Bindungsstellen daraufhin mit 200 µl einer 0,5%igen Gelatine pro Kavität und einer Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde das Plasma der geboosterten Tiere 1:10 und das der ungeimpften oder einmal geimpften 1:5 mit PBS-Tween verdünnt und mit je 100 µl in die oberste Kavität einer jeden Spalte aufgetragen. Spalte 1 diente als Leerwert und wurde mit 50 µl PBS-Tween pro Kavität gefüllt und in Spalte 6 befand sich der interne Standard und in Spalte 7 der POOL in einer Verdünnung 1:5 oder 1:10. Nachdem eine zweierlogarithmische

Verdünnungsreihe dieser Spalten angelegt wurde, fand wieder eine Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C statt. Vor dem nächsten Schritt erfolgte erneut ein Waschvorgang. Das Konjugat, ein an Peroxidase gekoppeltes Ziegen-anti-Schwein-IgG, wurde dann mit einer Konzentration von 1:80.000 mit jeweils 100 µl in die Kavitäten pipettiert und erneut 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Auf den nächsten Waschvorgang folgte das Pipettieren von je 100 µl in die Kavitäten von warmem Tetramethylbenzidin- (TMB) Substrat und ein 10-minütiges Belassen der Platte in absoluter Dunkelheit. Mit je 50 µl einer einmolaren Schwefelsäure wurde die Enzymreaktion in den Kavitäten gestoppt. Der IgG-Gehalt der Probe war proportional zur Gelbfärbung und wurde photometrisch bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 595 nm mittels eines ELISA-Readers gemessen. Mit Hilfe mehrerer Formeln wurde der Anti-IgY-IgG-Titer der Proben bei einer Extinktion von 0,7 errechnet.

3.8. Formeln zur Berechnung der Antikörpertiter

Um von den gemessenen Extinktionen zu den für die Abbildungen geeigneten Titern zu gelangen, waren einige Zwischenschritte nötig. Als erstes musste man sich für eine geeignete optische Dichte, bei der die Titer abgelesen werden, entscheiden. Hierzu wurde eine Kurve aus den jeweiligen Titern (x-Achse) und den gemessenen Extinktionen (y-Achse) gebildet. Die Stelle dieser Kurve, die am steilsten in ihrer Steigung ist und noch möglichst niedrige Titer mit einschließt wurde bei den Anti-IgY-IgG und Anti-OvA-IgG-Titern bei 0,7 festgelegt. Auf den Mikrotiterplatten wurden die Extinktionen der Plasmaproben in verschiedenen Verdünnungsstufen gemessen. Die gemessenen Extinktionen wurden zunächst vom Blank subtrahiert. Zur Berechnung der Titer wurde folgende Formel $t=x-(a-L)/(H-L)$ genutzt. Es wurde die Verdünnungsstufe errechnet, mit der die optimale Dichte (in unserem Falle 0,7) erreicht wurde:

x= Verdünnungsstufe unter der optimale Dichte

a= Optimale Dichte (0,7)

L= Extinktion unter der optimalen Dichte

H= Extinktion über der optimalen Dichte

Mit einer 2. Formel $E=bx2^t$ wird zu dem Ergebnis t der ersten Formel die logarithmische Verdünnung (x2) sowie die Vorverdünnung (b) eingerechnet. Die logarithmischen Verdünnun-

gen sind die Verdünnungen, die in den Kavitäten vertikal unter der ersten Kavität pipettiert wurden. Die Vorverdünnung wurde durch mehrere Testdurchläufe bei den Anti-IgY-IgG-Messungen bei den ungeimpften und einmalig geimpften Tieren auf 1:5, bei den geimpften auf 1:10, und bei den Anti-OvA-IgG-Messungen auf 1:5 festgelegt. Um die natürliche Schwankungen der einzelnen Platten zu korrigieren, wurden die E-Werte der 2. Formel mit einem Korrekturfaktor multipliziert. Dieser ergab sich aus dem Mittelwert der einzelnen Standards (t) aller Platten dividiert durch den Standard der zu messenden Platte. Der interne Standard war eine Plasmaprobe gepoolt aus zufällig ausgewählten Ferkeln, die auf jeder Platte wie die Einzelproben der Ferkel mitgemessen wurde. Diese korrigierten E-Werte wurden dann logarithmisch für die Abbildungen genutzt. Für die Qualitätskontrolle wurde auf jeder Platte zusätzlich ein Pool mitgemessen, der ebenso aus zufällig gewählten Ferkelproben bestand.

3.9. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte deskriptiv mittels der Computer-Software Microsoft Excel[®] 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und schließlich mittels SigmaStat[®] 3.01 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Es wurden zwei verschiedene Auswertungsvarianten verwendet. Bei der ersten Variante gingen alle Einzelwerte der Ferkel in die Statistik ein. Hiermit wurden die Parameter Anti-OvA-IgG und Anti-IgY-IgG ausgewertet. Da beim Parameter „Gesamt-IgG“ deutliche maternale Einflüsse sichtbar waren, wurde mit Poolwerten eines Wurfs die Statistik durchgeführt. Hierzu wurden von den Einzelwerten der Ferkel eines Wurfs der Median berechnet. Es wurden die zu untersuchenden Größen 'Gesamt-IgG', Anti-OvA-IgG und Anti-IgY-IgG in Abhängigkeit des Immunisierungszeitpunktes (früh=Tag 42 / spät=Tag 63) mittels Student's t-Test bzw. Mann-Whitney Rangsummentest im Falle nicht-normalverteilter Daten untersucht. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner 5% angesehen. Höhere Signifikanzniveaus als $p < 0,01$ wurden nicht gesondert angegeben. Die Anzahl der Würfe, bzw. der Ferkel, d.h. die Stichprobenanzahl, wurde als 'n' angegeben. Da meistens die Daten nicht-normalverteilt vorlagen, erfolgt die Darstellung der jeweiligen Werte als Boxplot. Die Abbildungen wurden mittels der Computer-Software SigmaPlot[®] 9.01 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) erstellt.

3.10. Versuchsanzeige

Der Versuch wurde gemäß dem Tierschutzgesetz bei der Landesregierung Schleswig Holstein angezeigt (Aktenzeichen V 362-72241.123-7).

4. Ergebnisse

Um die Auswirkungen der verlängerten Säugezeit auf das Immunsystem von Ferkeln im ökologischen Landbau zu untersuchen, wurden Ferkel zu 2 verschiedenen Zeitpunkten (Tag 42 p.n./ Tag 63 p.n.) von ihrer Muttersau getrennt (weiße und graue Boxen). Die Ferkel wurden mit den beiden Antigenen IgY und OvA immunisiert. Die Muttersauen wurden nur mit OvA immunisiert. Die Anti-OvA-Antikörper konnten über das Kolostrum von der Mutter durch die Ferkel aufgenommen werden. An zwei verschiedenen Zeitpunkten (Tag 42 p.n./ Tag 63 p.n.) wurden die Ferkel immunisiert (I) und 21 Tage später mit dem gleichen Impfstoff geboostert (B).

4.1. Gesamt-IgG

4.1.1. Transfer von maternalem IgG von der Sau auf die Ferkel

Bei den früh- und spät abgesetzten Ferkeln der zweiten und dritten Laktation ergaben sich keine Korrelationen zwischen den Gesamt-IgG-Konzentrationen der Ferkel an Tag 7 p.n. und den Sauen an Tag 3 p.n. (s. Abb. 6 und 7). Die Korrelationswerte lagen in der zweiten Laktation bei $r=0,10$ und $p=0,59$ und in der dritten Laktation bei $r=0,19$ und $p=0,29$.

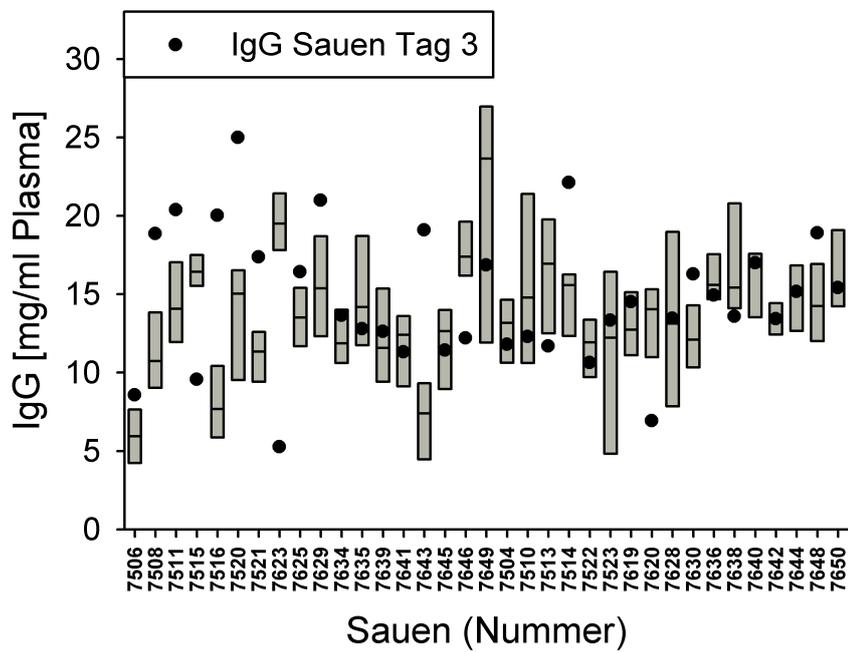


Abbildung 6.: **Zweite Laktation:** Gesamt-IgG-Konzentrationen der Ferkel an Tag 7 p.n. und der Muttersauen an Tag 3 p.p. An diesen Tagen wurde den Ferkeln und den Muttersauen Blut entnommen und die Gesamt-IgG-Konzentration im Plasma mittels ELISA bestimmt.

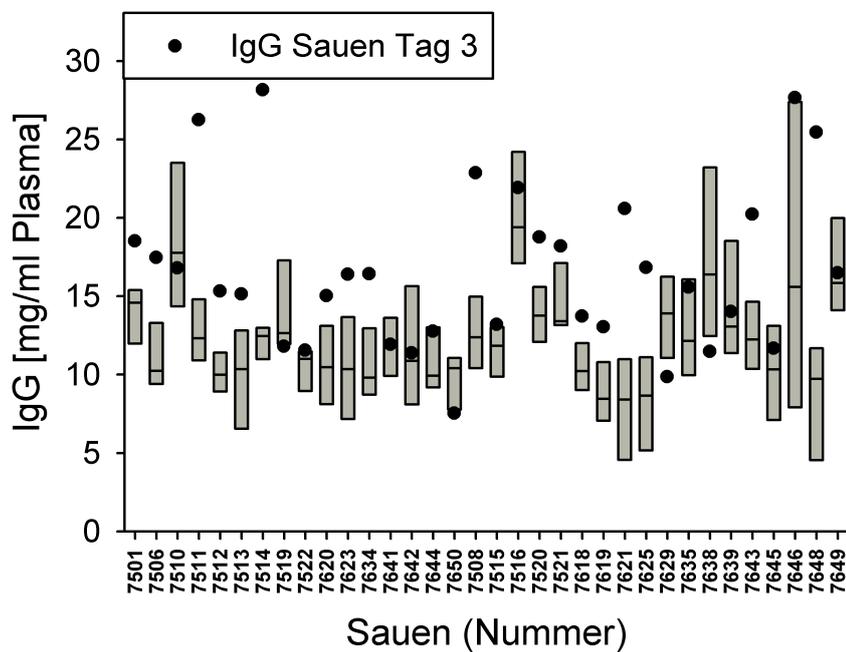


Abbildung 7.: **Dritte Laktation:** Gesamt-IgG-Konzentrationen der Ferkel an Tag 7 p.n. und der Muttersauen an Tag 3 p.p. An diesen Tagen wurde den Ferkeln und den Muttersauen Blut entnommen und die Gesamt-IgG-Konzentration im Plasma mittels ELISA bestimmt.

4.1.2. Verlauf der Gesamt-IgG-Konzentration der Ferkel

In der Gruppe der früh immunisierten Ferkel in der zweiten Laktation konnte bei den spät abgesetzten Ferkel eine höhere IgG-Konzentration an Tag 7 gemessen werden, obwohl sich die Behandlung der Ferkel zu diesem Zeitpunkt nicht unterschied (s. Abb. 8). Nur in der zweiten Laktation konnte bei den früh- und spät immunisierten Ferkeln an Tag 49 p.n. für die früh abgesetzten eine signifikant höhere IgG-Konzentration nachgewiesen werden (s. Abb. 8 und 9). Hingegen konnte in der dritten Laktation an Tag 63 und 70 p.n. bei den früh immunisierten und früh abgesetzten Ferkeln eine signifikant höhere IgG-Konzentration gemessen werden (s. Abb. 10). Eine signifikant höhere IgG-Konzentration wiesen die früh abgesetzten und spät immunisierten Ferkel an Tag 42 p.n. in der dritten Laktation auf (s. Abb. 11). An den Tagen 84 und 91 p.n. gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den früh- und spät abgesetzten Ferkeln bezüglich der IgG-Konzentration. Insgesamt traten signifikant höhere IgG-Werte bei den früh abgesetzten Ferkelwürfen auf. Die IgG-Konzentration ist in der zweiten und dritten Laktation bei Erstkontakt mit der Immunisierung bei den spät immunisierten Ferkeln höher.

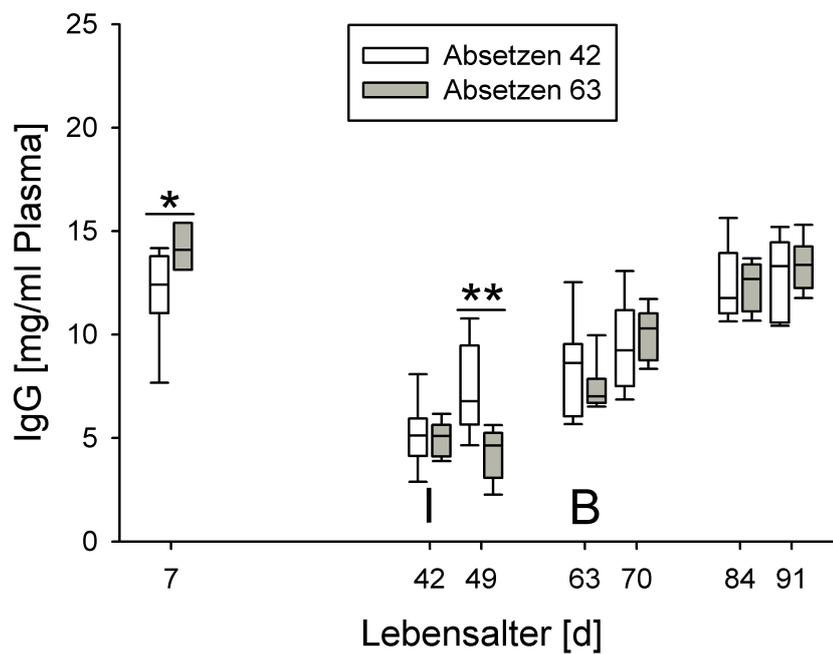


Abbildung 8.: **Zweite Laktation:** Alle Ferkel wurden mit den Antigenen OVA und IgY früh immunisiert (I) und drei Wochen später geboostert (B). Eine Gruppe von Ferkeln wurde früh (Tag 42), die andere Gruppe spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und die Gesamt-IgG-Konzentration im Plasma mittels ELISA bestimmt. (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; n = 8 - 9; */**: p < 0,05/1; Student's t-Test bzw. Mann-Whitney Rangsummentest.)

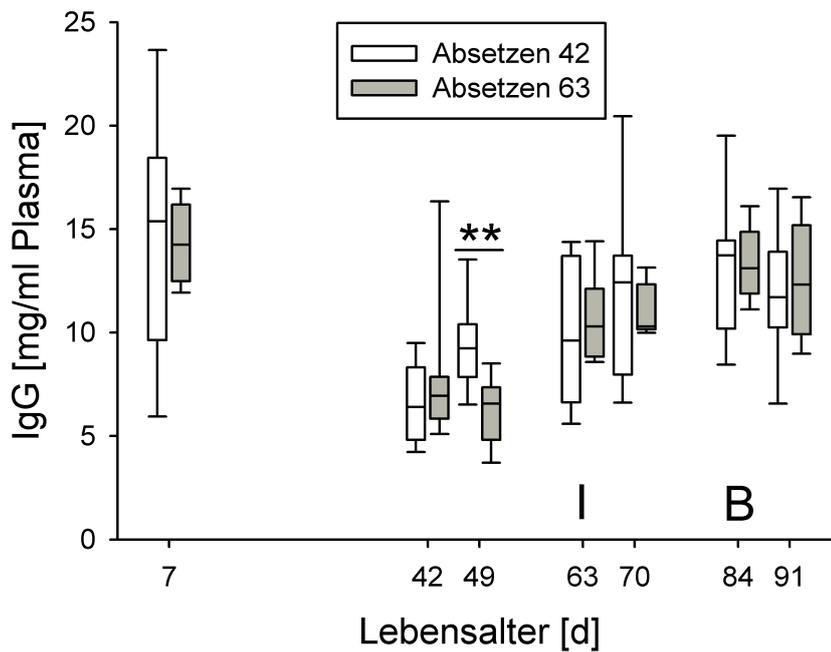


Abbildung 9.: **Zweite Laktation:** Alle Ferkel wurden mit den Antigenen OVA und IgY spät immunisiert (I) und drei Wochen später geboostert (B). Eine Gruppe von Ferkeln wurde früh (Tag 42), die andere Gruppe spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und die Gesamt-IgG-Konzentration im Plasma mittels ELISA bestimmt. (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; n = 8 - 9; */**): p < 0,05/1; Student's t-Test bzw. Mann-Whitney Rangsummentest.)

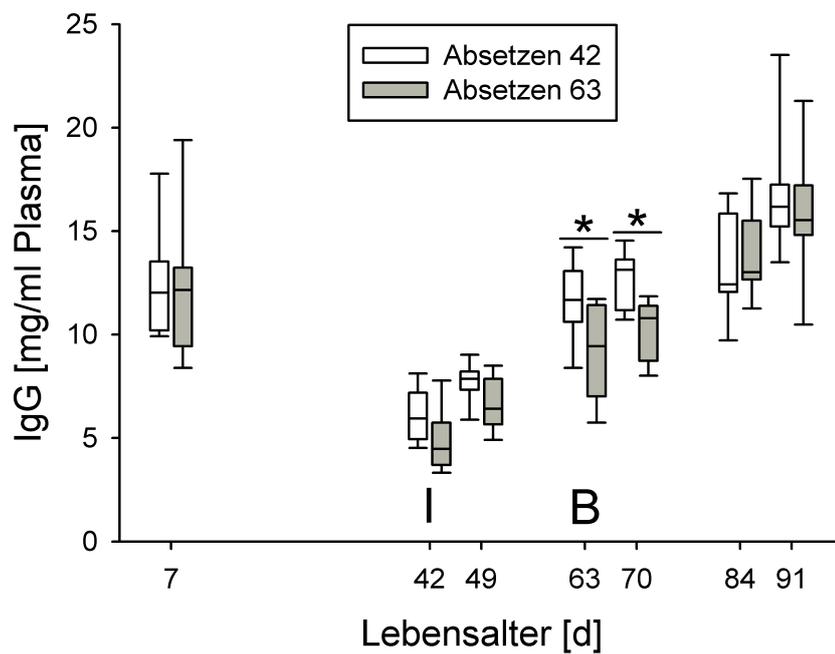


Abbildung 10.: **Dritte Laktation:** Alle Ferkel wurden mit den Antigenen OVA und IgY früh immunisiert (I) und drei Wochen später geboostert (B). Eine Gruppe von Ferkeln wurde früh (Tag 42), die andere Gruppe spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und die Gesamt-IgG-Konzentration im Plasma mittels ELISA bestimmt. (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; $n = 7 - 9$; *: $p < 0,05$; Student's t-Test bzw. Mann-Whitney Rangsummentest.)

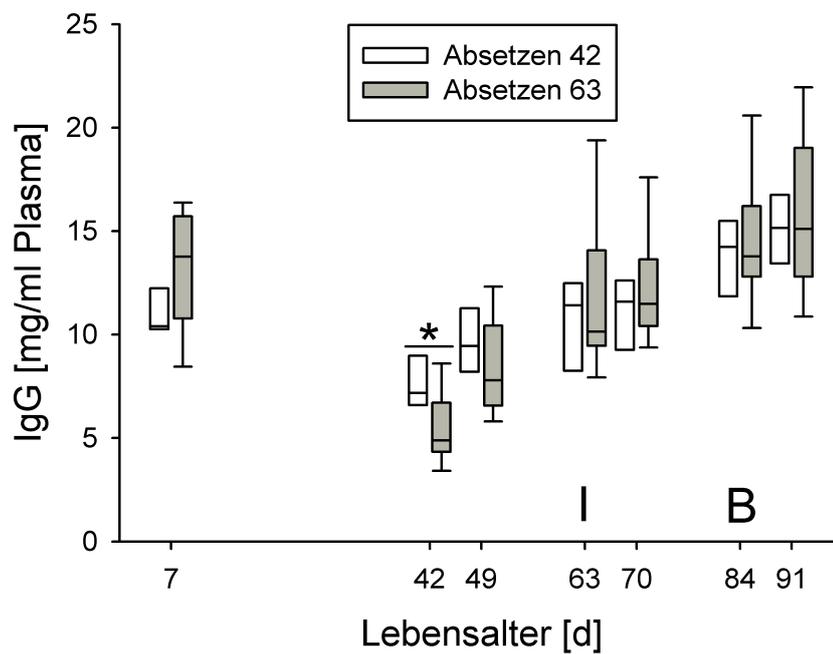


Abbildung 11.: **Dritte Laktation:** Alle Ferkel wurden mit den Antigenen OVA und IgY spät immunisiert (I) und drei Wochen später geboostert (B). Eine Gruppe von Ferkeln wurde früh (Tag 42), die andere Gruppe spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und die Gesamt-IgG-Konzentration im Plasma mittels ELISA bestimmt. (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; $n = 7 - 9$; *: $p < 0,05$; Student's t-Test bzw. Mann-Whitney Rangsummentest.)

4.2. Anti-OvA-IgG

4.2.1. Transfer maternalen Anti-OvA-IgG-Antikörper von der Sau auf die Ferkel

Es gab signifikante Korrelationen zwischen den Antikörpertitern der Ferkel gegen OvA an Tag 7 p.n. und den Sauen an Tag 3 p.p. in der zweiten Laktation bei den früh- und den spät abgesetzten Ferkeln und in der dritten Laktation bei den früh abgesetzten Ferkeln (s. Abb. 12, 13 und 14). Bei den spät abgesetzten Ferkeln der dritten Laktation ergab sich keine signifikante Korrelation (s. Abb. 15), es sei denn, die beiden Ausreißer werden ausgeschlossen, dann ergibt sich eine Signifikanz von $r=0,78$ und $p<0,0001$.

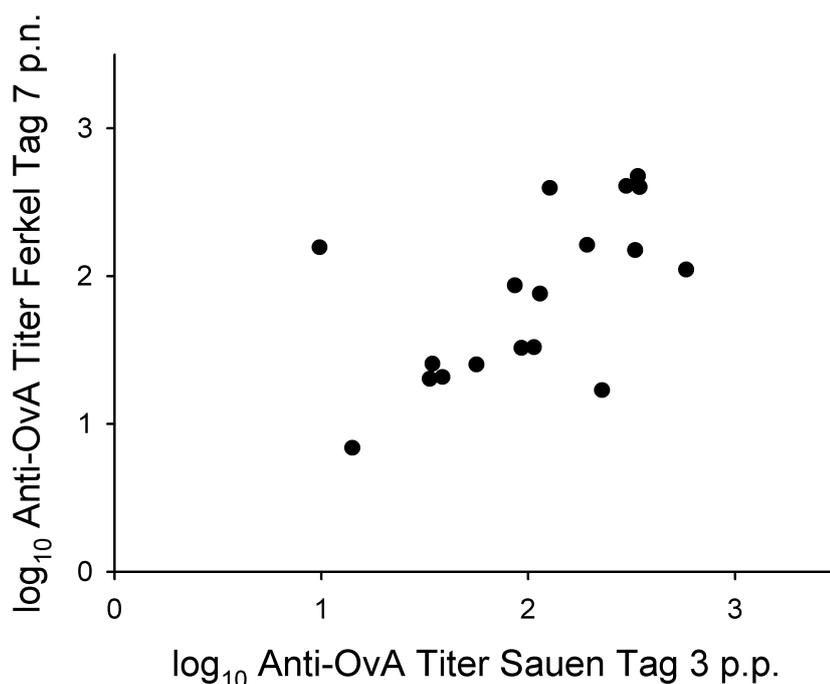


Abbildung 12.: **Zweite Laktation:** Diese Ferkel wurden früh an Tag 42 p.n. abgesetzt. An Tag 3 p.p. wurde der Sau Blut entnommen, an Tag 7 p.n. wurde den Ferkeln Blut entnommen. Es wurde der Anti-OvA-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt. (Dargestellt sind die Medianwerte aus acht Ferkeln pro Wurf; $n=18$; $r=0,58$, $p=0,01$).

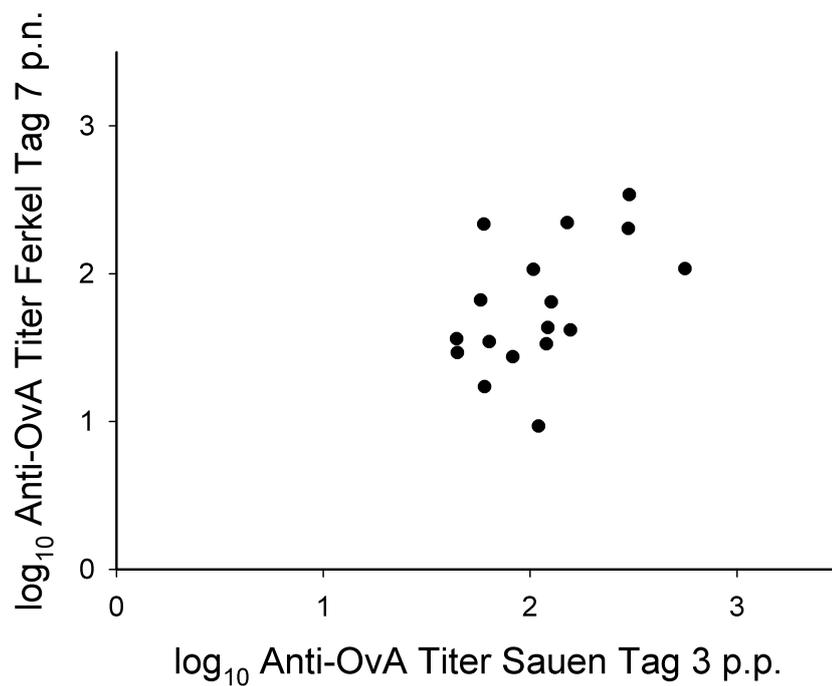


Abbildung 13.: **Zweite Laktation:** Diese Ferkel wurden spät an Tag 63 p.n. abgesetzt. An Tag 3 p.p. wurde der Sau Blut entnommen, an Tag 7 p.n. wurde den Ferkeln Blut entnommen. Es wurde der Anti-OvA-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt. (Dargestellt sind die Medianwerte aus acht Ferkeln pro Wurf; n=17; r=0,50, p=0,04).

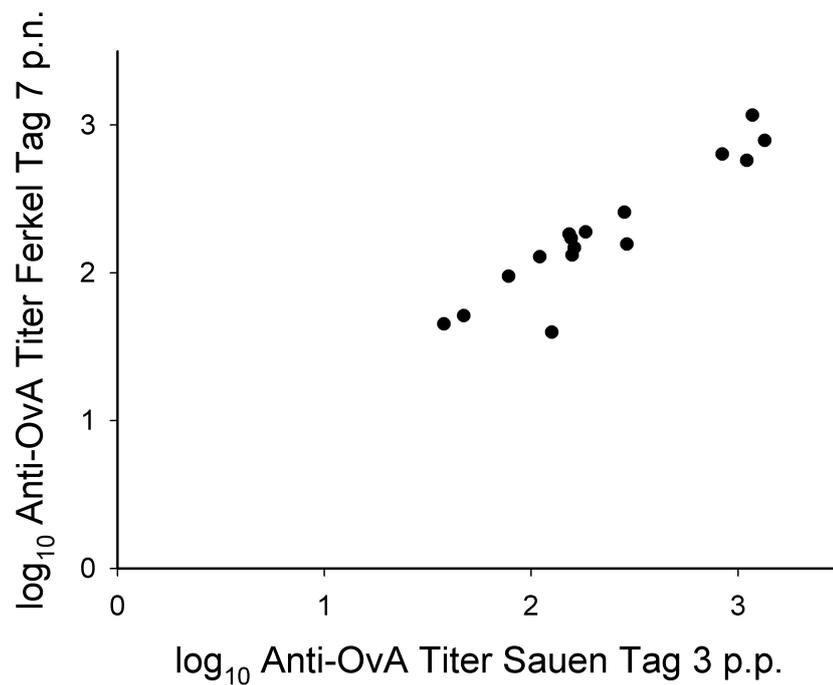


Abbildung 14.: **Dritte Laktation:** Diese Ferkel wurden früh an Tag 42 p.n. abgesetzt. An Tag 3 p.p. wurde der Sau Blut entnommen, an Tag 7 p.n. wurde den Ferkeln Blut entnommen. Es wurde der Anti-OvA-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt. (Dargestellt sind die Medianwerte aus acht Ferkeln pro Wurf; n=16; r=0,94, p<0,0001).

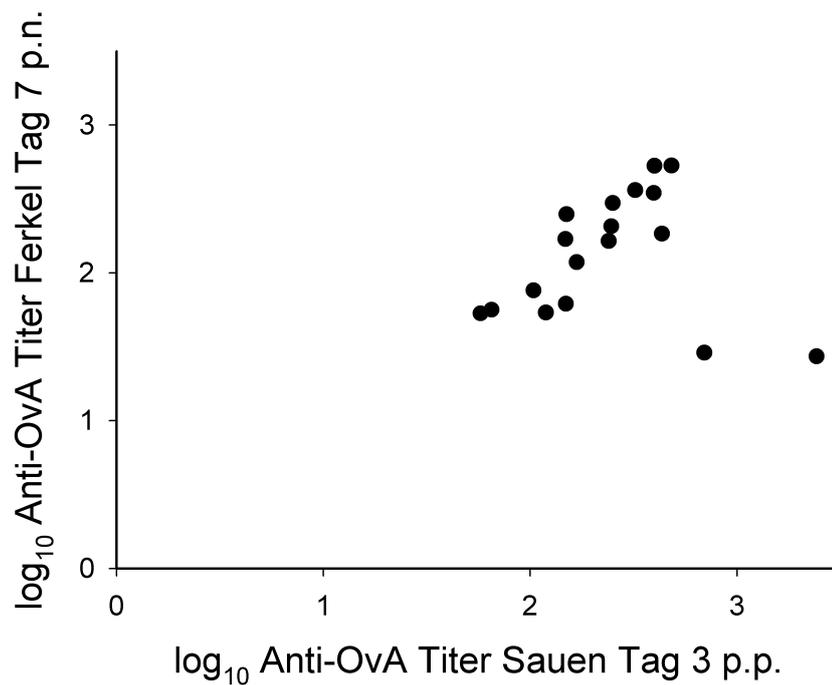


Abbildung 15.: **Dritte Laktation:** Diese Ferkel wurden spät an Tag 63 p.n. abgesetzt. An Tag 3 p.p. wurde der Sau Blut entnommen, an Tag 7 p.n. wurde den Ferkeln Blut entnommen. Es wurde der Anti-OvA-IgG-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt (Dargestellt sind die Medianwerte aus acht Ferkeln pro Wurf; $n=18$; $r=0,06$, $p=0,80$). Wenn die beiden Ausreißer ausgeschlossen werden, ergibt sich eine Signifikanz von $r=0,78$ und $p<0,0001$.

4.2.2. Verlauf der Anti-OvA-IgG-Titer der Ferkel

Bei den früh immunisierten Gruppen der zweiten Laktation an Tag 49 und 63 p.n. lag der Anti-OvA-Titer bei den früh abgesetzten Ferkeln höher (s. Abb. 16). Bei den spät immunisierten Ferkeln in der gleichen Laktation gab es bis auf an Tag 63, 70 und 84 p.n. durchweg signifikante höhere Anti-OvA-Titer bei den früh abgesetzten Ferkeln (s. Abb. 17). An Tag 70 p.n. in der dritten Laktation bei den früh immunisierten Ferkeln ist bei den früh abgesetzten ein signifikant höherer Anti-OvA-Titer ersichtlich. Umgekehrt ist dieser Titer an Tag 84 und 91 p.n. bei den spät abgesetzten signifikant höher (s. Abb. 18). In der Gruppe der spät immunisierten Ferkel in der dritten Laktation hält sich bis auf die zwei letzten Blutungstage (84 und 91 p.n.) eine Signifikanz im Anti-OvA-Titer für die Frühabsetzer (s. Abb. 19).

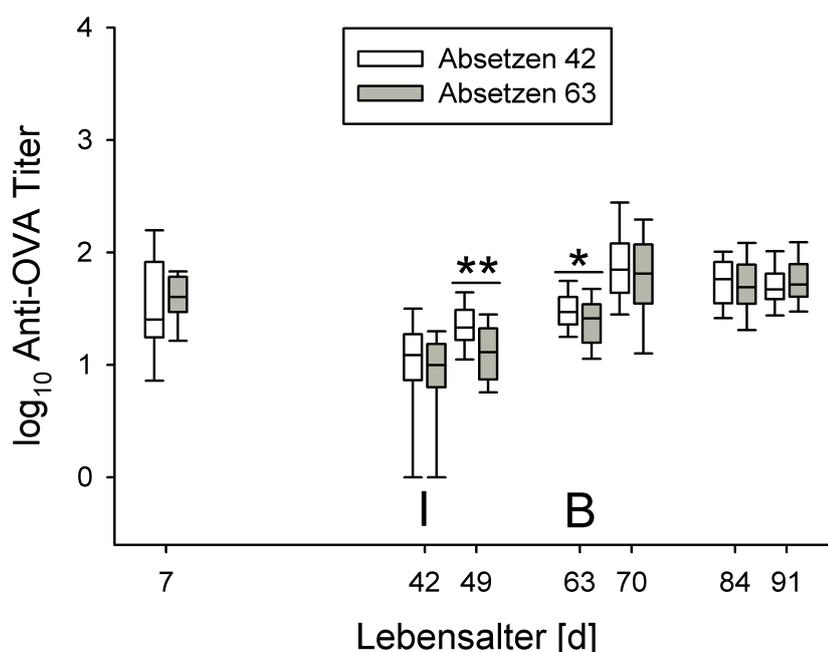


Abbildung 16.: **Zweite Laktation:** Alle Ferkel wurden mit OVA am Tag 42 immunisiert (I) und am Tag 63 geboostert (B). Maternale Antikörper waren durch Sauen-Immunsierung vorhanden. Die Ferkelgruppen wurden früh (Tag 42) bzw. spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und der Anti-OvA-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; n = 62 - 72; */** : p < 0,05/1; Mann-Whitney Rangsummentest.)

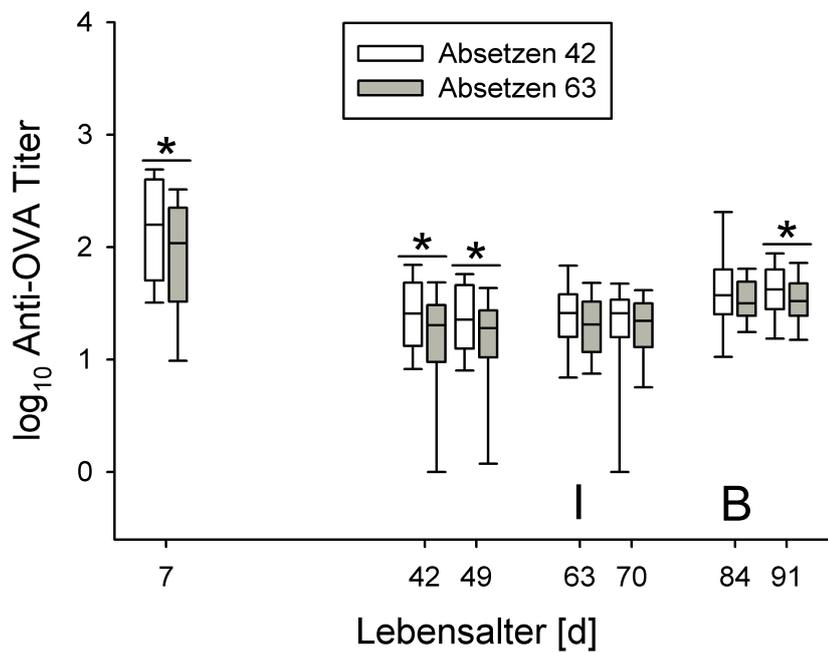


Abbildung 17.: **Zweite Laktation:** Alle Ferkel wurden mit OVA am Tag 63 immunisiert (I) und an Tag 84 geboostert (B). Maternale Antikörper waren durch Sauen-Immunsierung vorhanden. Die Ferkelgruppen wurden früh (Tag 42) bzw. spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und der Anti-OvA-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; n = 62 - 73; *: p < 0,05; Mann-Whitney Rangsummentest.)

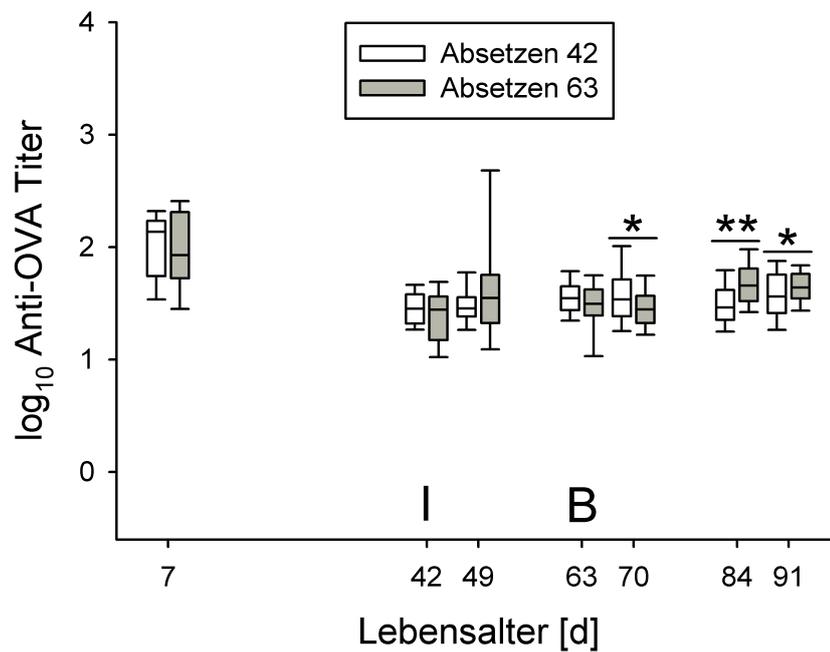


Abbildung 18.: **Dritte Laktation:** Alle Ferkel wurden mit OVA am Tag 42 immunisiert (I) und an Tag 63 geboostert (B). Maternale Antikörper waren durch Sauen-Immunsierung vorhanden. Die Ferkelgruppen wurden früh (Tag 42) bzw. spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und der Anti-OvA-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; n = 67 - 71; */**: p < 0,05/1; Mann-Whitney Rangsummentest.)

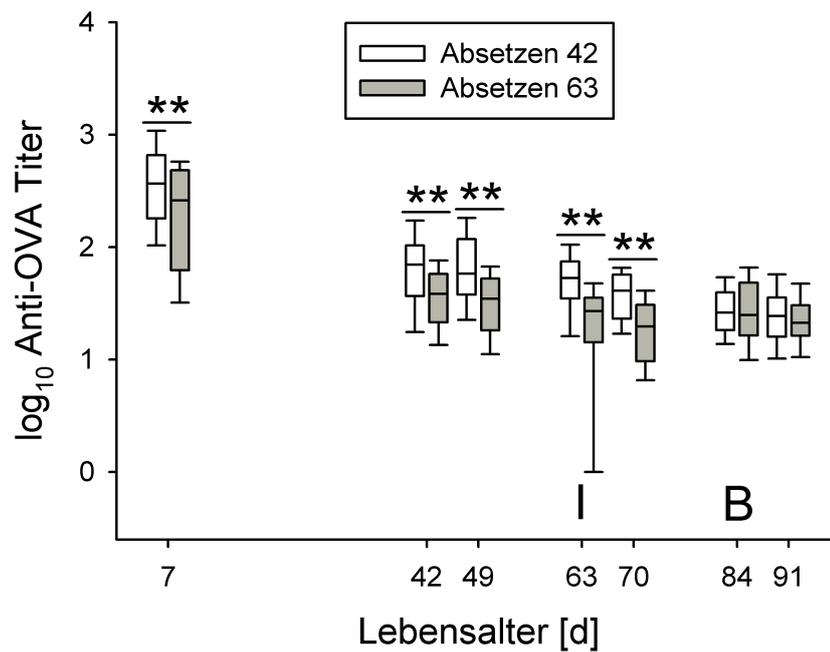


Abbildung 19.: **Dritte Laktation:** Alle Ferkel wurden mit OVA am Tag 63 immunisiert (I) und an Tag 84 geboostert (B). Maternale Antikörper waren durch Sauen-Immunsierung vorhanden. Die Ferkelgruppen wurden früh (Tag 42) bzw. spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und der Anti-OvA-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; n = 55 - 72; **: p < 0,01; Mann-Whitney Rangsummentest.)

4.3. Anti-IgY-IgG

4.3.1. Verlauf der Anti-IgY-IgG-Titer der Ferkel

In der Anti-IgY-IgG-Titer-Bestimmung sind an Tag 7 p.n. in der zweiten Laktation bei den früh- und spät immunisierten Gruppen und in der dritten Laktation bei den spät immunisierten Antikörper gemessen worden, obwohl die Ferkel zu diesem Zeitpunkt noch gar keinen Kontakt zum aviären IgY hatten (s. Abb. 20, 21 und 23). Dieses ist erstmals an Tag 42 bzw. 63 p.n. verabreicht worden. Nach der frühen Immunisierung hatten die spät abgesetzten Ferkel in der zweiten Laktation an den Tagen 70 und 91 p.n. einen signifikant höheren Anti-IgY-Titer (s. Abb. 20). Bei den spät immunisierten Ferkeln in der zweiten Laktation zeigten erst am Tag 84 p.n. die früh abgesetzten Ferkel einen signifikant höheren Anti-IgY-Titer, hingegen an Tag 91 p.n. die spät abgesetzten (s. Abb. 21). In der dritten Laktation war bei den früh immunisierten Ferkeln ein Anstieg des Titers auf die Immunisierung zu erkennen, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den früh- und spät abgesetzten Ferkeln (s. Abb. 22). Bei den spät immunisierten Ferkeln in der dritten Laktation haben die spät abgesetzten Ferkel an Tag 70 p.n. einen höheren IgY-Titer, hingegen an Tag 91 p.n. die früh abgesetzten Ferkel (s. Abb. 23).

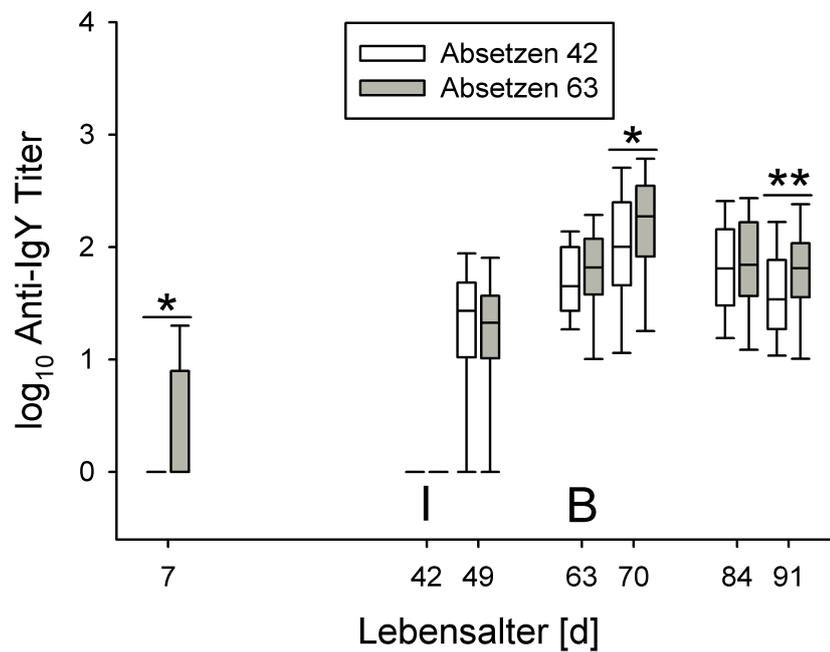


Abbildung 20.: **Zweite Laktation:** Alle Ferkel wurden mit IgY am Tag 42 immunisiert (I) und an Tag 63 geboostert (B). Die Ferkelgruppen wurden früh (Tag 42) bzw. spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und der Anti-IgY-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; n = 65 - 72; */**: p < 0,05/1; Mann-Whitney Rangsummentest.)

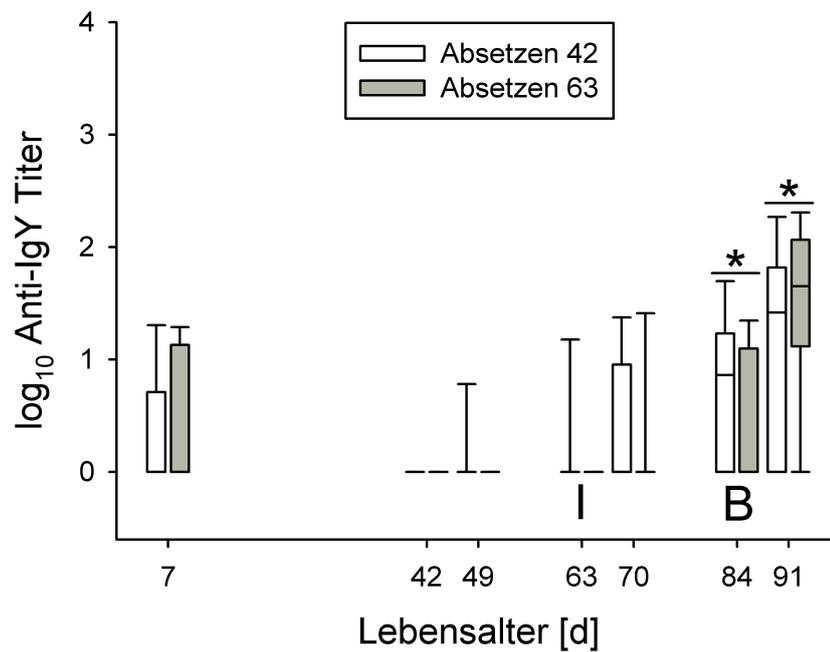


Abbildung 21.: **Zweite Laktation:** Alle Ferkel wurden mit IgY am Tag 63 immunisiert (I) und an Tag 84 geboostert (B). Die Ferkelgruppen wurden früh (Tag 42) bzw. spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und der Anti-IgY-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; n = 62 - 73; *: p < 0,05; Mann-Whitney Rangsummentest.)

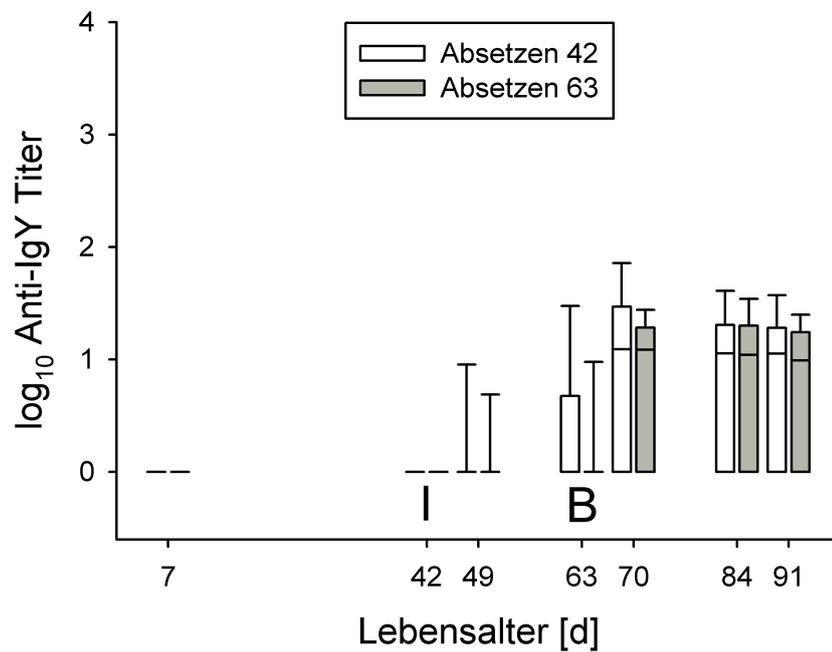


Abbildung 22.: **Dritte Laktation:** Alle Ferkel wurden mit IgY am Tag 42 immunisiert (I) und an Tag 63 geboostert (B). Die Ferkelgruppen wurden früh (Tag 42) bzw. spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und der Anti-IgY-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; n = 67 - 71).

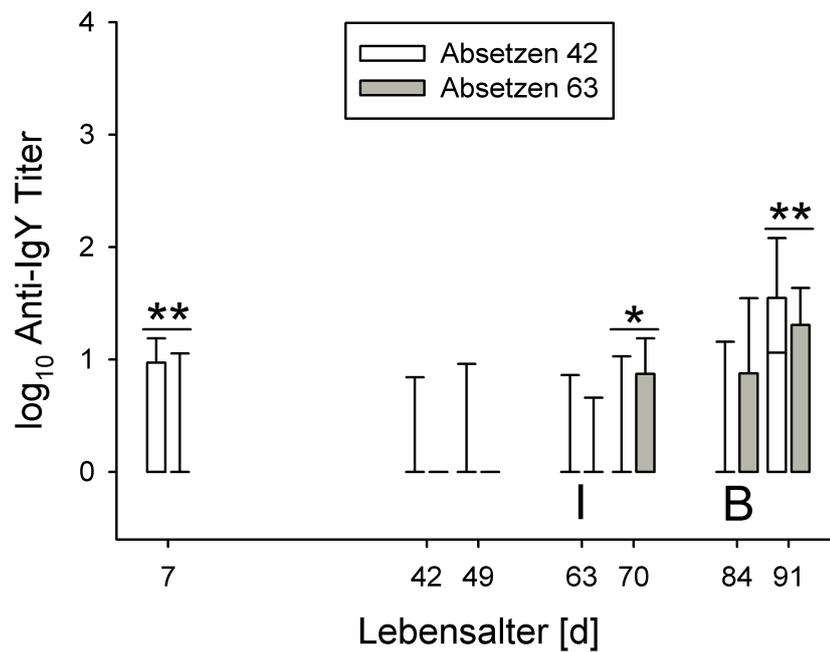


Abbildung 23.: **Dritte Laktation:** Alle Ferkel wurden mit IgY am Tag 63 immunisiert (I) und an Tag 84 geboostert (B). Die Ferkelgruppen wurden früh (Tag 42) bzw. spät (Tag 63) abgesetzt. An den dargestellten Tagen wurde den Ferkeln Blut entnommen und der Anti-IgY-Titer im Plasma mittels ELISA bestimmt. (Dargestellt sind die Medianwerte sowie die 5-, 25-, 75- und 95-Perzentile; n = 55 - 72; */**: p < 0,05/1; Mann-Whitney Rangsummentest.)

4.4. Qualitätskontrolle ELISA

Auf jeder zu messenden Platte wurde ein zusätzlicher Pool mitgemessen, der aus zufällig gewählten Ferkelplasma-Proben bestand. Dies diente zur Qualitätskontrolle der Messungen. Hierbei ergab sich für die Messungen von Gesamt-IgG ein Variationskoeffizient von 14,83. Für die Messungen von Anti-IgY-IgG ergab sich ein Variationskoeffizient von 4,65 bis 8,53. Für die Messungen von Anti-OvA-IgG ergab sich ein Variationskoeffizient von 2,87 bis 6,27. Es mussten teilweise mehrere verschiedene Pools verwendet werden, weil die Mengen für die Messungen inklusive Wiederholungsmessungen nicht ausreichten, deswegen entstanden mehrere Variationskoeffizienten.

4.5. Bildliche Darstellung der Sauen

Die Sauen wurden an Tag 3, 42 und 63 p.p. fotografiert. Hierbei wurde eine Aufnahme von caudal und jeweils eine lateral von jeder Gesäugeseite beurteilt. Die Beurteilung wurde verblindet von 5 verschiedenen erfahrenen Tierärzten vorgenommen. Der Mittelwert aus diesen Bewertungen wurde für die Statistik verwendet. Hierbei wurden die früh abgesetzten Sauen (Tag 42 p.p.) gegen die spät abgesetzten Sauen (Tag 63 p.p.) aufgeführt. Es wurden nur die Fotos der dritten Laktation bewertet.

4.5.1. Rötung der Sauengesäuge

Die Rötung der Gesäugeleisten der Sauen wurde von 1=keine, 2=geringgradig, 3=mittelgradig bis 4=hochgradig eingeteilt. Hierfür wurden die von lateral fotografierten Aufnahmen von den Tagen 3, 42 und 63 p.p. verwendet. Die Rötung nimmt bei den früh abgesetzten Sauen vom 3. Tag p.p. zum 42. Tag p.p. signifikant ab. Hingegen steigt sie im selbigen Zeitraum bei den spät abgesetzten Sauen signifikant an, fällt dann aber signifikant zum Tag 63 p.p. (s. Abb. 24).

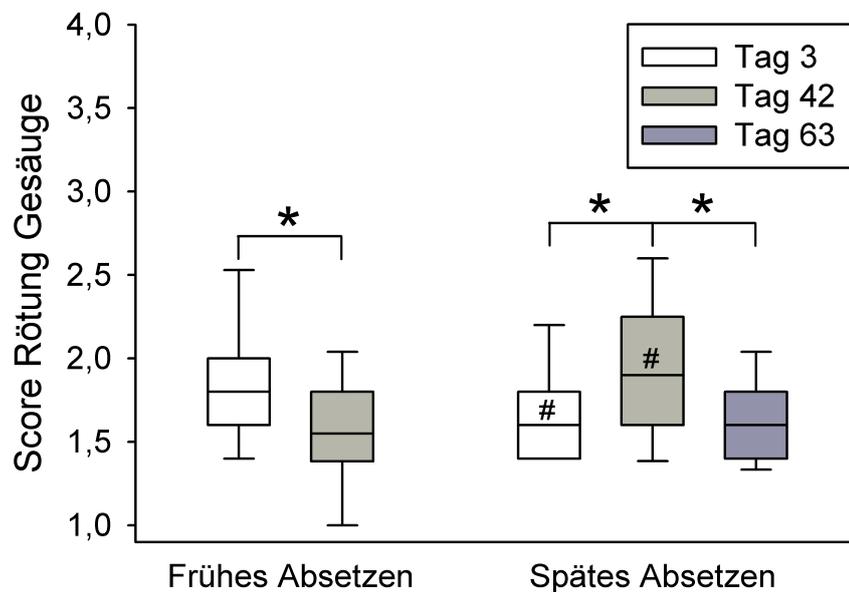


Abbildung 24.: Die Rötung der Gesäugeleisten der Sauen wurde von 1=keine, 2=geringgradig, 3=mittelgradig bis 4=hochgradig eingeteilt. Die Sauenfotos von den Tagen 3, 42 und 63 p.p. wurden von 5 verschiedenen erfahrenen Tierärzten verblindet beurteilt und deren Bewertungen gemittelt; n=36, unterteilt in früh (Tag 42 p.p.) und spät (Tag 63 p.p.) abgesetzte Sauen.

4.5.2. Schwellung der Sauengesäuge

Die Schwellung der Gesäugeleisten der Sauen wurde von 1=keine, 2=geringgradig, 3=mittelgradig bis 4=hochgradig eingeteilt. Hierfür wurden die von lateral fotografierten Aufnahmen von den Tagen 3, 42 und 63 p.p. verwendet. Bei den früh abgesetzten Sauen ergab sich im Hinblick auf die Schwellungen keine Signifikanz vom Tag 3 p.p. zum Tag 42 p.p. Bei den spät abgesetzten Sauen gab es in dieser Zeitspanne einen hoch signifikanten Anstieg von Schwellungen an Tag 42 p.p. (s. Abb. 25).

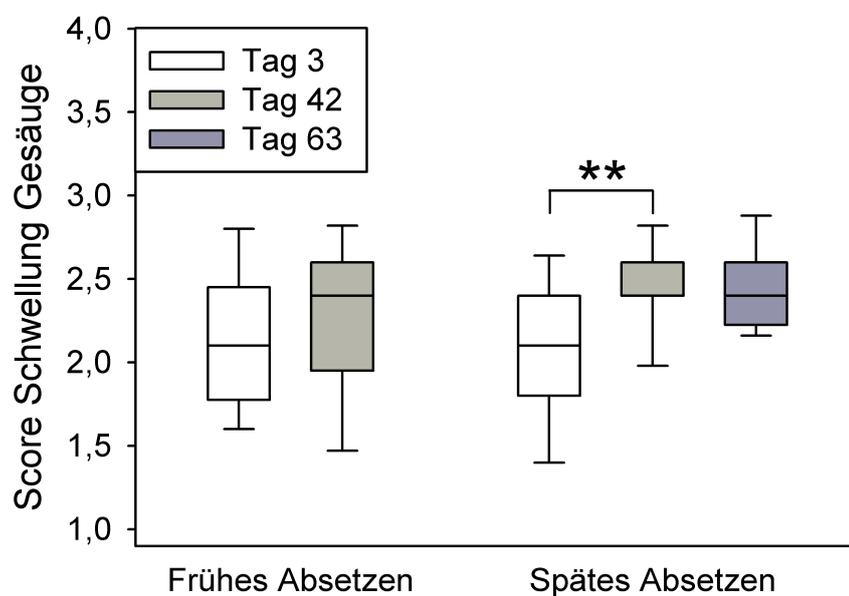


Abbildung 25.: Die Schwellung der Gesäugeleisten der Sauen wurde von 1=keine, 2=geringgradig, 3=mittelgradig bis 4=hochgradig eingeteilt. Die Sauenfotos von den Tagen 3, 42 und 63 p.p. wurden von 5 verschiedenen erfahrenen Tierärzten verblindet beurteilt und deren Bewertungen gemittelt; n=36, unterteilt in früh (Tag 42 p.p.) und spät (Tag 63 p.p.) abgesetzte Sauen.

4.5.3. Verletzung der Sauengesäuge

Die Verletzung der Gesäugeleisten der Sauen wurde von 1=keine, 2=geringgradig, 3=mittelgradig bis 4=hochgradig eingeteilt. Hierfür wurden die von lateral fotografierten Aufnahmen von den Tagen 3, 42 und 63 p.p. verwendet. Bei den früh abgesetzten Sauen ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Verletzungen der Gesäuge. Im Vergleich zu Tag 3 p.p. wiesen die spät abgesetzten Sauen an Tag 42 p.p. signifikant mehr Verletzungen auf (s. Abb. 26).

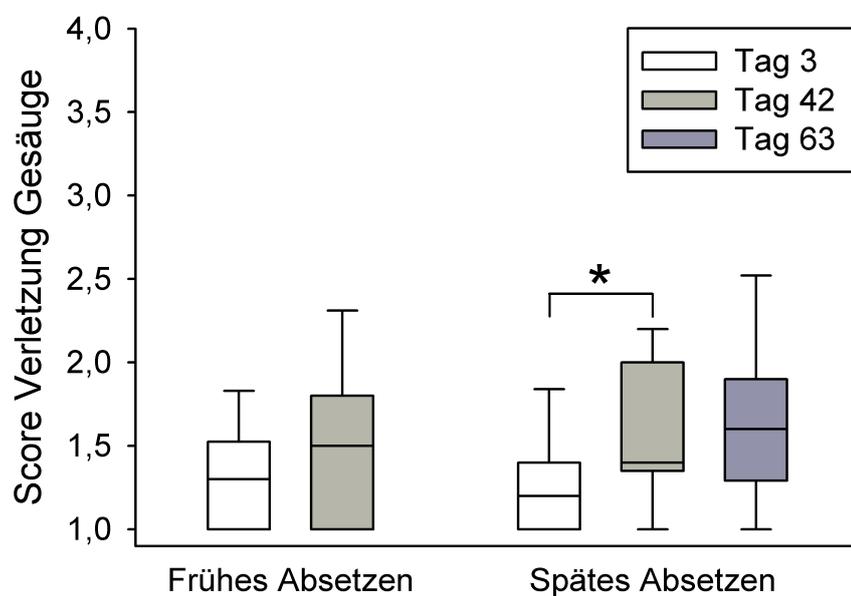


Abbildung 26.: Die Verletzungen der Gesäugeleisten der Sauen wurden von 1=keine, 2=geringgradig, 3=mittelgradig bis 4=hochgradig eingeteilt. Die Sauenfotos von den Tagen 3, 42 und 63 p.p. wurden von 5 verschiedenen erfahrenen Tierärzten verblindet beurteilt und deren Bewertungen gemittelt; n=36, unterteilt in früh (Tag 42 p.p.) und spät (Tag 63 p.p.) abgesetzte Sauen.

4.5.4. Body-Condition-Index (BCI) der Sauen

Der BCI der Sauen wurde von 1 (hochgradig kachektisch) bis 6 (hochgradig adipös) eingeteilt. Hierfür wurden die von caudal fotografierten Aufnahmen von den Tagen 3, 42 und 63 p.p. verwendet. Beim BCI ergaben sich keinerlei Signifikanzen, unabhängig vom Absetzzeitpunkt. Es war ein leichter Abfall des BCI an Tag 63 p.p. bei den spät abgesetzten Sauen zu beobachten (s. Abb. 27).

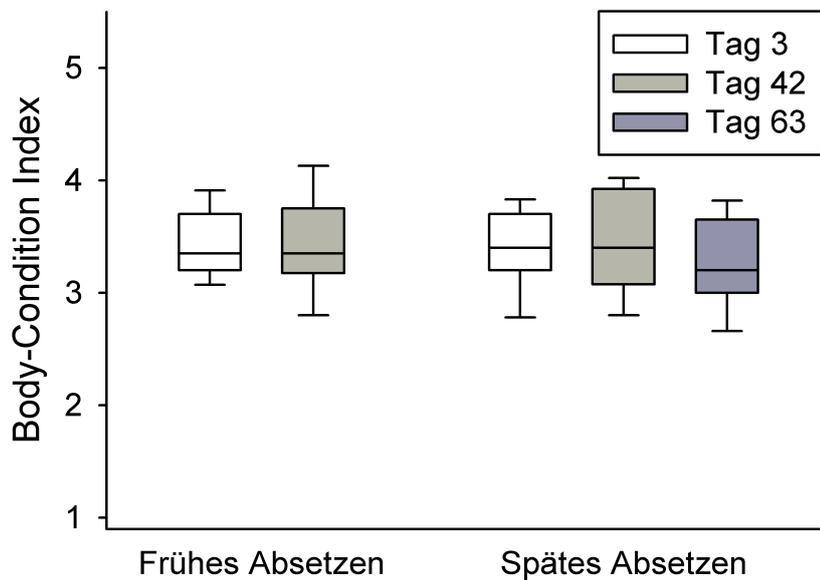


Abbildung 27.: Der BCI der Sauen wurden von 1 (hochgradig kachektisch) bis 6 (hochgradig adipös) eingeteilt. Die Sauenfotos von den Tagen 3, 42 und 63 p.p. wurden von 5 verschiedenen erfahrenen Tierärzten verblindet beurteilt und deren Bewertungen gemittelt; n=36, unterteilt in früh (Tag 42 p.p.) und spät (Tag 63 p.p.) abgesetzte Sauen.

5. Diskussion

5.1. Beurteilung des Immunstatus von Ferkeln in Abhängigkeit vom Absetzzeitpunkt

Die Ferkel werden zu verschiedenen Zeitpunkten mit IgY/OvA (entweder Tag 42 und 63 p.n. oder Tag 63 und 81 p.n.) und die Sauen mit OvA (6 und 2 Wochen a.p.) immunisiert. Durch Messungen von Immunglobulinkonzentrationen im Plasma (Gesamt-IgG) und spezifischer Antikörper (Anti-OvA-IgG, Anti-IgY-IgG) an den Tagen 7, 42, 49, 63, 70, 84 und 91 p.n. sollen die Auswirkungen unterschiedlicher Absetzzeitpunkte (Tag 42 oder 63 p.n.) auf die humorale Immunantwort von Ferkeln im ökologischem Landbau beurteilt werden. Darüber hinaus wurde den Sauen an Tag 3 p.p. Blut entnommen, um es mit den Werten der Ferkel an Tag 7 p.n. in Korrelation zu setzen. Erhöhte Konzentrationen der Parameter Gesamt-IgG, Anti-OvA-IgG und Anti-IgY-IgG im Blut könnten für eine höhere Abwehrbereitschaft sprechen. Ein auf diese Weise nachgewiesener besserer Immunstatus könnte möglicherweise das Auftreten von Infektionskrankheiten um den jeweils getesteten Absetzzeitpunkt reduzieren.

5.1.1. Beurteilung des Immunstatus anhand der Gesamt-IgG-Konzentration

Zwischen den Tagen 7 und 91 p.n. wurde den Ferkeln (von bis zu 36 Sauen in jeweils 2 Durchgängen) mehrmals Blut entnommen, um den Verlauf der IgG-Konzentration und die Unterschiede an den verschiedenen Absetzzeitpunkten darstellen zu können.

Da Schweine eine epitheliochoriale Plazenta besitzen, ist keine Passage von Immunglobulinen möglich (ROOKE und BLAND, 2002; TIZARD, 2008; SALMON et al., 2009). Erst mit dem Kolostrum des Muttertieres erhalten die Ferkel Antikörper (BRAMBELL, 1969; PORTER, 1969; TIZARD, 2008). In den eigenen Untersuchungen wurde der erste Blutentnahmetag der Ferkel auf Tag 7 p.n. festgelegt, weil die Ferkel zu diesem Zeitpunkt nicht mehr so empfindlich gegen

den Stress bei der Blutentnahme sind wie jüngere Ferkel. Bis zu diesem ersten Blutentnahmetag hatten die Ferkel Kolostrum und Milch aufgenommen. Die Variationen des späteren Absetzzeitpunktes nahmen an Tag 7 p.n. noch keinen Einfluß auf die IgG-Konzentration in dem Plasma der Ferkel. Es waren signifikante Unterschiede in der IgG-Konzentration bei den früh- und spätabgesetzten Ferkel an den Tagen 7 (z.B. Abb. 8) und 42 p.n. (z.B. Abb. 10) zu erkennen. Dadurch zeigt sich, dass die Kolostrumqualität, die Kolostrumaufnahmemenge und -zeit entscheidene Faktoren für die anfängliche IgG-Konzentration der Ferkel und dessen weiterer Verlauf im Plasma sind (STALLJOHANN, 2006). Die hohen IgG-Konzentrationen in beiden Durchgängen und allen Gruppeneinteilungen an Tag 7 p.n. und die im Gegensatz dazu niedrigen IgG-Konzentrationen bis zum Tag 42 p.n. liegen in Übereinstimmung mit Arbeiten von FRENYO et al. (1980); BUTLER et al. (1981) und LANG (2004), in der kurz nach der Geburt die IgG-Konzentration am höchsten ist und danach abfällt.

Laut CURTIS und BOURNE (1973) trägt die ersten 2-3 Wochen die eigene IgG-Produktion wenig zum Serum-IgG-Level des Ferkels bei. Die Periode von der späten Trächtigkeit bis zum Absetzen ist ein kritisches Fenster, wenn das adaptive Immunsystem sich entwickelt und den Schutz der passiven Immunität ersetzt (BUTLER und SINKORA, 2007). Obwohl in den ersten 2-3 Wochen in der eigenen Studie keine Messungen der IgG-Konzentration im Plasma der Ferkel durchgeführt wurden, ist auch hier ein Anstieg dieser Konzentration nach dem 42. Lebenstag p.n. ersichtlich (s. Abb. 8, 9, 10 und 11). Somit ist die IgG-Konzentration im Plasma der Ferkel einerseits von dem Kolostrum der Muttersau und andererseits von der eigenen Synthese der Ferkel abhängig.

Uneinigkeit herrscht jedoch bei dem Zeitpunkt des niedrigsten Levels der IgG-Konzentration. BOURNE (1973) und BUTLER et al. (1981) legen ihn auf 5-6 Wochen fest. LANG (2004) beschreibt die niedrigste IgG-Konzentration bei 5 Wochen p.n. und MARTIN et al. (2005) beschreibt den Tiefpunkt in einem Alter von 8 Wochen. Der Tiefpunkt der IgG-Konzentration der eigenen Ergebnisse liegt zwischen 6 und 7 Wochen. Da jedoch zwischen dem 7. und 42. Tag p.n. keine Messung stattgefunden hat, ist nicht auszuschließen, dass sich nicht noch niedrigere Werte zu einem früheren Zeitpunkt oder zu Zeitpunkten zwischen den anderen Blutentnahmepunkten hätten messen lassen.

Die IgG-Konzentrationen unterscheiden sich tendenziell kaum zu einem gleichen Zeitpunkt in den verschiedenen Immunisierungsgruppen- unabhängig ob ein Erstkontakt mit der Immunisierung stattgefunden hat oder nicht. Nur wenn man die IgG-Konzentration von den spät mit den früh immunisierten bei Erstkontakt vergleicht, sind die Konzentrationen der spät immunisierten bei Erstkontakt tendenziell höher. Demnach ist in allen Darstellungen (zweite und dritte Laktation sowie früh und spät abgesetzte Ferkel/ s. Abb. 8, 9, 10 und 11) der ansteigende Verlauf der Gesamt-IgG-Konzentration ohne Abweichungen durch die Immunisierung und Boosterung zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Immunisierung der Ferkel keinen Einfluss auf ihre Gesamt-IgG-Konzentration nimmt.

Eine Reaktion auf das Absetzen zeigten in der zweiten Laktation die früh abgesetzten Ferkel an Tag 49 (s. Abb. 8 und 9). Ergebnisse des Teilprojektes „biologisch-produktionstechnische Leistungen“ des Friedrich-Loeffler-Instituts ergaben bei diesen Ferkeln ein erhöhtes Krankheitsvorkommen. Die IgG-Konzentrationen steigen hier von Tag 42 bis Tag 49 p.n. bei den früh abgesetzten Ferkeln an und fallen bei den spät abgesetzten. BLECHA et al. (1983) stellen fest, dass ein Absetzzeitpunkt unter fünf Wochen p.n. einen schlechten Einfluss auf die zelluläre Immunität von Ferkeln hat. Bei allen Ferkeln der dritten Laktation, sowie bei den in der zweiten Laktation am Tag 63 p.n. abgesetzten Ferkeln war eine derartige Reaktion nicht feststellbar.

5.1.2. Beurteilung des Immunstatus anhand des Anti-OvA-IgG-Titers

Den Sauen wurde 6 und 2 Wochen a.p. mit dem Antigen OvA immunisiert. Dieses in das Muttertier injizierte Antigen brachte bei deren Ferkeln nach Kolostrumaufnahme messbare Anti-OvA-IgG-Titer hervor. Bei der ersten Messung an Tag 7 p.n. sind die höchsten Anti-OvA-IgG-Titer gemessen worden (s. Abb. 16, 17, 18 und 19).

Auch laut ELAHI et al. (2006) wiesen Ferkel einer während der Trächtigkeit mit Bordetella pertussis geimpften Sau ein signifikantes Level von spezifischen IgG im Serum nach. Selbst bei Fütterung von Sauen mit OvA findet laut TELEMO et al. (1991) ein Übergang von Antigen und Antikörper über das Kolostrum und schließlich in die zu säugenden Ferkel statt. Dass auch Antigen über das Kolostrum in die Ferkel gelangt, dürfte mit ein Grund dafür sein, dass bei der Erstimmunisierung Anti-OvA-IgG-Titer vorhanden sind.

Bei Betrachtung des Titerverlaufs des Anti-OvA-IgG zeigte sich die deutlichste Immunreaktion bei den früh abgesetzten Ferkeln der zweiten Laktation an Tag 49 p.n. gegenüber den spät abgesetzten Ferkeln (s. Abb. 16). HOERLEIN (1957) immunisierte Ferkel mit verschiedenen Antigenen in einem Alter von 3 bis 8 Wochen und boosterte diese 3 Wochen später. Er verglich 3 verschiedene Gruppen: Ferkel, denen Kolostrum vorenthalten wurde, Ferkel, die normales Kolostrum erhielten, und Ferkel, die „immunisiertes“ Kolostrum erhielten. Dieses Experiment zeigte, dass Antikörperbildung niedriger in den Ferkeln war, die „immunisiertes“ Kolostrum erhielten. Im Vergleich dazu war die Antikörperbildung höher bei den Ferkeln, die normales Kolostrum erhielten. Im Gegensatz dazu hatten in den eigenen Untersuchungen die früher abgesetzten Ferkel einen höheren Antikörpertiter, obwohl sie eine kürzere Zeitspanne zur Milchaufnahme zur Verfügung gestellt bekommen hatten. Obwohl die oben erwähnten Unterschiede zwischen früh- und spät abgesetzten Ferkeln bestand, war dies nicht kontinuierlich in den anderen Darstellungen und Laktationen zu erkennen. Bei den früh geimpften Ferkeln der zweiten Laktation glichen sich nach der Zweitimmunisierung die Anti-OvA-IgG-Titer im weiteren Verlauf der unterschiedlich abgesetzten Ferkel wieder an (s. Abb. 16).

Die früh abgesetzten und spät geimpften Ferkel der zweiten und dritten Laktation wiesen durchgehend von Tag 7 p.n. an bis zum Tag 49 p.n. (s. Abb. 17, bzw. bis zum Tag 70 p.n. s. Abb. 19) signifikant höhere Anti-OvA-IgG-Titer vor. Da diese Verteilung schon vor Immunisierung und vor Absetzen bestand, zeigte sich hier kein Vorteil, aber auch kein Nachteil für das frühe oder späte Absetzen in Hinsicht auf den Anti-OvA-IgG-Titer.

Auch nach der frühen Zweitimmunisierung (Tag 63 p.n.) bestanden entweder keine signifikanten Unterschiede zwischen früh und spät abgesetzten Ferkeln (s. Abb. 16), oder die Signifikanzen wechselten zwischen früh und spät abgesetzten Ferkeln (s. Abb. 18). Folglich hat also auch der Absetzzeitpunkt keinen signifikanten Einfluss auf den Anti-OvA-IgG-Titer.

Demnach hat weder der Absetzzeitpunkt noch der Immunisierungszeitpunkt in der zweiten und dritten Laktation einen durchgehend signifikanten Einfluss auf den Anti-OvA-IgG-Titer der Ferkel.

5.1.3. Beurteilung des Immunstatus anhand des Anti-IgY-IgG-Titers

Obwohl die Ferkel am Tag 7 p.n. noch gar keinen Kontakt zu dem „fremden“ aviären Antigen IgY hatten, weder durch Impfung, noch durch Kolostrum, wurden zu diesem Zeitpunkt geringe Anti-IgY-IgG-Titer gemessen (s. Abb. 20, 21 und 23). Dies weist auf eventuelle Kreuzreaktionen

hin.

Da im späteren Verlauf nach Erstimpfung und Boosterung deutlich ansteigende Titer gemessen wurden, scheint die anfängliche, geringgradige Kreuzreaktion die Untersuchung nicht gestört zu haben.

Eine frühe Immunisierung (Tag 42 p.n.) bringt nur in der zweiten Laktation einen signifikant höheren Anti-IgY-IgG-Titer für die spät abgesetzten Ferkel an Tag 70 und 91 p.n. (s. Abb. 20). In der dritten Laktation ergaben sich keine Signifikanzen für die früh immunisierten Ferkel (s. Abb. 22). Trotz der Signifikanzen in der zweiten Laktation besteht durch die nicht vorhandene Wiederholbarkeit in der dritten Laktation kein immunologischer Vorteil im späten Absetzen (Tag 63 p.n.) der Ferkel.

Bei den spät immunisierten Ferkeln (Tag 63 p.n.) ergaben sich signifikante Unterschiede in dem Anti-IgY-IgG-Titer zwischen früh und spät abgesetzten Ferkeln. Diese Signifikanzen wechseln in der zweiten Laktation an Tag 84 p.n. von früh zu an Tag 91 p.n. spät abgesetzten Ferkeln (s. Abb. 21). In der dritten Laktation sind diese Signifikanzen der Anti-IgY-IgG-Titer genau umgekehrt - erst an Tag 70 p.n. zum Vorteil der spät abgesetzten Ferkel - und an Tag 91 p.n. zum Vorteil der früh abgesetzten Ferkel (s. Abb. 23).

Folglich haben auch bei den spät immunisierten Ferkeln weder die früh noch die spät abgesetzten Ferkel einen immunologischen Vorteil im Hinblick auf den Anti-IgY-IgG-Titer.

Im Vergleich zu den Untersuchungen von TORCHE et al. (2006) stiegen auch in den eigenen Untersuchungen die anti-IgY-Immunglobuline bis ca. zum 30. Tag nach der Immunisierung an (s. Abb. 20, 21, 22 und 23). Der in deren Studie langsame Abfall vom 30. bis 60. Tag nach Immunisierung ließ sich nur andeutungsweise bei den früh geimpften Ferkeln der zweiten Laktation bestätigen (s. Abb. 20). Die Anti-IgY-IgG-Titer wurden von den spät geimpften nicht bis zum 60. Tag nach Immunisierung gemessen und können somit nicht mit den Untersuchungen von TORCHE et al. (2006) verglichen werden.

Auch wenn in beiden Laktationen die Anti-IgY-IgG-Titer deutlich anstiegen, hatten vergleichend gesehen der Immunisierungszeitpunkt und Absetzzeitpunkt keinen signifikanten Einfluss auf diesen Titer.

5.1.4. Beurteilung des Transfers von maternalen Antikörpern

Es gab signifikante Korrelationen zwischen den Antikörpertitern der Ferkel gegen OvA an Tag 7 p.n. und den Sauen an Tag 3 p.p. in der zweiten Laktation bei den früh- und den spät abge-

setzten Ferkeln und in der dritten Laktation bei den früh abgesetzten Ferkeln (s. Abb. 12, 13 und 14). Diese Korrelationen sind hinweisend dafür, dass es einen Zusammenhang zwischen über das Kolostrum aufgenommene Anti-OvA-IgG und dem Plasmatiter der Ferkel gibt.

Bei den früh- und spät abgesetzten Ferkeln der zweiten und dritten Laktation ergaben sich keine Korrelationen zwischen den Gesamt-IgG-Konzentrationen der Ferkel an Tag 7 p.n. und den Sauen an Tag 3 p.n.

Die Korrelationen der spezifischen Antikörper bestätigen die Arbeiten von STALLJOHANN (2006).

5.1.5. Schlussfolgerung

Abschließend kann festgestellt werden, dass eine Verlängerung der Säugezeit von 42 auf 63 Tage keine positiven, aber auch keine negativen Auswirkungen auf den Immunglobulinstatus bei Ferkeln hat. Es ergaben sich einige Signifikanzen zwischen früh und spät abgesetzten Ferkeln, aber entweder gab es diese Signifikanzen schon vor dem Absetzen (z.B. beim Anti-OvA-IgG-Titer, s. Abb. 19), oder die Signifikanzen wechselten in Ihren Titern zwischen früh und spät abgesetzten Ferkeln (z.B. beim Anti-IgY-IgG-Titer, s. Abb. 23). Somit scheint rein aus immunologischer Sicht betrachtet eine Verlängerung der Säugezeit im ökologischem Landbau nicht sinnbringend.

5.2. Beurteilung des Body-Condition-Index (BCI) und der Gesäugeleisten

Um bei der Debatte um den Absetzzeitpunkt der Ferkel im ökologischen Landbau nicht den Gesundheitsstatus der Muttersauen außer Acht zu lassen, wurden diese an Tag 3, 42 und 63 p.p. fotografiert. Hierbei wurde eine Aufnahme von caudal für den BCI beurteilt und jeweils eine lateral von jeder Gesäugeseite in den Kriterien Rötung, Schwellung und Verletzungen beurteilt. Die Beurteilung wurde verblindet von 5 verschiedenen erfahrenen Tierärzten vorgenommen. Der Mittelwert aus diesen Bewertungen wurde für die Statistik verwendet. Hierbei wurden die früh abgesetzten Sauen (Tag 42 p.p.) gegen die spät abgesetzten Sauen (Tag 63 p.p.) aufgeführt. Es wurden nur die Fotos der dritten Laktation bewertet.

5.2.1. Beurteilung der Rötung der Sauengesäuge

Obwohl bis zum Tag 42 p.p. noch beide Gruppen (früh und spät abgesetzte Sauen) gesäugt haben, hatten an Tag 42 p.p. die früh abgesetzten Sauen signifikant weniger Rötungen, hingegen hatten aber die spät abgesetzten signifikant mehr Rötungen. Das bei den spät abgesetzten Sauen die Rötungen zum Tag 63 p.p. signifikant zurückgingen, lässt darauf schließen, dass eine verlängerte Säugezeit im Hinblick auf Rötungen keinen Nachteil für die Sauen ergibt.

5.2.2. Beurteilung der Schwellung der Sauengesäuge

Auch wenn es bei den spät abgesetzten Sauen von Tag 3 steigend zu Tag 42 p.p. ein signifikantes Vorkommen von Schwellungen gab, spricht im Hinblick auf den Faktor Schwellung nichts gegen ein spätes Absetzen der Ferkel, da es an Tag 63 p.p. ein nicht signifikant höheres Vorkommen von Schwellungen gab.

5.2.3. Beurteilung der Verletzung der Sauengesäuge

Ferkel können laut IBEN (2003) den Sauen Verletzungen in Form von Quetsch-, Riss-, Bisswunden zuführen. Je länger die Ferkel bei der Muttersau verbleiben, desto länger sind sie dieser Gefahr ausgesetzt. Auch wenn es bei den spät abgesetzten Sauen von Tag 3 steigend zu Tag 42 p.p. ein signifikantes Vorkommen von Verletzungen gab, spricht im Hinblick auf den Faktor Verletzung nichts gegen ein spätes Absetzen der Ferkel, da es an Tag 63 p.p. ein nicht signifikant höheres Vorkommen von Verletzungen gab.

5.2.4. Beurteilung des BCI

Im Hinblick auf den BCI hat das späte Absetzen einen negativen Einfluss, denn der BCI sinkt von Tag 42 zum Tag 63 p.p., jedoch nicht signifikant. Gegensätzliches ergab die Studie von FRÜH (2007), bei der keine Korrelation zwischen dem BCI der Sauen und dem Alter der Ferkel, also der Säugedauer bestand.

5.2.5. Schlussfolgerungen aus den bildlichen Sauendarstellungen

Im Hinblick auf Rötung, Schwellung und Verletzungen der Sauengesäuge spricht nichts gegen eine verlängerte Säugezeit. Im Hinblick auf den BCI sind die spät abgesetzten Sauen gegenüber den früh abgesetzten Sauen tendenziell benachteiligt. Dieses Ergebniss müsste aber

durch weitere Studien bei höherer Anzahl von Laktationen bestätigt werden. Der Vorteil der verblindeten Beurteilung der Fotos durch die Tierärzte liegt darin, dass diese in ihren Beurteilungen nicht beeinflusst werden, da diese nicht wissen, ob sie eine früh- oder spät abgesetzte Sau beurteilen. Der Nachteil von Beurteilungen von Fotos gegenüber vor-Ort-Beurteilung könnten veränderte Lichtverhältnisse sein, ebenso stellen Aufnahmen in unterschiedlichen Winkeln ein Problem dar (z.B.: eine steilere Winkelung von caudal läßt eine Sau schlanker erscheinen - umgekehrt: eine flachere Winkelung von caudal läßt die Sau adipöser erscheinen).

6. Zusammenfassung

Auswirkungen einer verlängerten Säugezeit auf die humorale Immunantwort von Ferkeln im ökologischen Landbau

Die Untersuchungen wurden in 2 Durchgängen (zweite und dritte Laktation) mit jeweils 8 Ferkeln von 36 Sauen durchgeführt. Die Ferkel von 18 Sauen wurden früh abgesetzt (Tag 42 p.n.), die Ferkel der anderen 18 Sauen wurden spät abgesetzt (Tag 63 p.n.). Diese beiden 18-er Gruppen wurden jeweils nochmal in 9-er Gruppen unterteilt, wobei die einen früh (Tag 42 p.n.), und die anderen spät (Tag 63 p.n.) immunisiert wurden. Eine Zweitimmunisierung fand jeweils 3 Wochen später statt (Tag 63 oder 84 p.n.). Die Muttersauen erhielten 6 und 2 Wochen vor der Geburt eine Immunisierung mit Ovalbumin (OvA). Der Impfstoff für die Ferkel beinhaltete OvA und aviäres Immunglobulin Y (IgY), um 2 verschiedene Immunreaktionen beurteilen zu können- einmal den Verlauf des Anti-OvA-IgG-Titers bei bereits vorhandenen über das Kolostrum aufgenommenen Antikörpern und den Verlauf des Titers eines völlig neuen Antikörpers (Anti-IgY-IgG).

An den Tagen 7, 42, 49, 63, 70, 84 und 91 p.n. wurde den Ferkeln und an Tag 3 p.p. der Sau Blut entnommen. Die Bestimmung der Gesamt-IgG-Konzentration, des Anti-OvA-IgG-Titers und des Anti-IgY-IgG-Titers erfolgte aus dem Plasma mittels eines Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Zusätzlich wurden die Sauen an Tag 3, 42 und 63 p.p. von caudal zur Bestimmung des Body-Condition-Index und von beiden Seiten des Gesäuges fotografiert. Dabei wurden Rötung, Schwellung und Verletzungen von verschiedenen Tierärzten dokumentiert, um eine eventuelle Benachteiligung der Körperkonditionen und der Gesäugegesundheit der Sauen bei verlängerter Säugezeit mit einzubeziehen.

Im Hinblick auf die Ergebnisse der Messungen der Gesamt-IgG-Konzentrationen, der anti-OvA-IgG und Anti-IgY-IgG-Titer ergab sich kein einheitliches Bild, dass für oder gegen eine

verlängerte Säugezeit der Ferkel im ökologischem Landbau spricht. Es ergaben sich bei den Ergebnissen der Sauenfotobeurteilungen bezüglich Rötung, Schwellung und Verletzungen der Gesäuge keine Nachteile für die Sauen, deren Ferkel spät abgesetzt wurden. Im Hinblick auf den BCI ergab sich ein tendenzieller Nachteil für die Sauen deren Ferkel an Tag 63 p.n. entfernt wurden.

Schlußfolgernd kann festgestellt werden, dass sich hinsichtlich einer Immunisierung mit oben verwendeten Antigenen kein Vorteil, aber auch kein Nachteil für die Ferkel ergibt, die länger (bis zum Tag 63 p.n.) bei der Muttersau belassen werden.

7. Summary

Implications of a prolonged sucking period for the humoral immune response of piglets in organic farming

Two examinations were undertaken, each with eight piglets from 36 sows at two different time points in the second and third lactations. The piglets from 18 sows were weaned early on day 42 p.n., those from the other 18 sows were weaned later on day 63 p.n. These both groups of 18 sows were subdivided again in groups of nine sows, whereas the piglets of the first nine sows have been early (at day 42 p.n.) and piglets of the other nine sows have been late (at day 63 p.n.) immunized. The second immunization (booster) occurred three weeks later (day 63 or 84 p.n.). Six and two weeks prior to birth the mother-sows were immunized with Ovalbumin (OvA). The vaccinations of the piglets contained OvA and avian Immunoglobulin Y (IgY) so that two different immune reactions could be measured - firstly with anti-OvA-IgG-titres with the colostrum containing antibodies and secondly a completely new antibody (anti-IgY-IgG).

Blood was sampled from the piglets on day 7, 42, 49, 63, 70, 84 and 91 p.n. and from the sows on day 3 p.p. The total-IgG-concentration, the anti-OvA-IgG-titres and the anti-IgY-titres were measured from plasma using an Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). In addition, the sows were assessed for body-condition-index on days 3, 42 and 63 p.p. and the mammary glands were photographed bilaterally. Redness, swelling and injury were additionally documented by different veterinarians. A possible evaluation of the sow's body condition and mammary glands health in association with longer lactation time was thus comprised.

On review of the results of the total-IgG-concentration, neither the anti-OvA-IgG-titres nor the anti-IgY-IgG-titres gave a uniform pattern that spoke for or against a prolonged lactation period in organic farming. There was no photographic evidence of increase redness, swelling or injury

to the mammary glands with the prolonged lactation. There was a trend to disadvantage on review of the BCI for the sows their piglets were weaned later at day 63 p.p.

Finally, from the immunization data with the above mentioned antigens, neither advantageous nor disadvantageous to the piglets with prolonged sucking period (till day 63 p.n.) could be found.

Literaturverzeichnis

- BARRIGA O.O. und INGALLS W.L. (1984) *Potentiation of an IgE-like response to Bordetella bronchiseptica in pigs following Ascaris suum infection*. *Veterinary Parasitology* **16**: 343–345.
- BENNECKE K. (2008) *Vergleichende Untersuchungen zur protektiven Wirkung einer Streptococcus suis- Ganzzell- und einer Subunitvakzine*. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover .
- BILKEI und BÖLCSKEI (1993) *Die Auswirkung der Fütterung im letzten Trächtigkeitsmonat auf die perinatalen Parameter bei verschiedener Körperkondition und Parität der Muttersauen (Körperbeurteilungsschema/ Body-Condition-Scoring der Sau (nach Modifikation von Straw und Meuten 1986))*. *Tierärztliche Umschau* **48**: 629–635.
- BLECHA F., POLLMANN D. und NICHOLS D. (1983) *Weaning Pigs at an early age decreases cellular immunity*. *Journal of Animal Science* **56**: 396–400.
- BOURNE F. (1973) *The immunoglobulin system of the suckling pig*. *Proceedings of the Nutrition Society* **32**: 205–215.
- BOURNE F. und CURTIS J. (1973) *The Transfer of Immunoglobulins IgG, IgA and IgM from Serum to Colostrum and Milk in the Sow*. *Immunology* **24**: 157–162.
- BRAMBELL F.R. (1969) *The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young*. *Proceedings of the Nutrition Society* **28**: 35–41.
- BROWN H., SPEER V., QUINN L., HAYS V. und CATRON D. (1961) *Studies on colostrum- acquired immunity and active antibody production in baby pigs*. *Journal of Animal Science* **20**: 323–328.
- BUTLER J. und BROWN W. (1994) *The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **43**: 5–12.

- BUTLER J., KLOBASA F. und WERHAHN E. (1981) *The differential localization of IgA, IgM, and IgG in the gut of suckled neonatal piglets*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2**, Issue 1: 53–65.
- BUTLER J. und SINKORA M. (2007) *The isolator piglet: a model for studying the development of adaptive immunity*. *Immunologic Research* **39**: 33–51.
- BUTLER J.E., SINKORA M., WERTZ N., HOLTMEIER W. und LEMKE C.D. (2006) *Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology*. *Veterinary Research* **37**: 417–441.
- BUTLER J.E., SUN J., WERTZ N. und SINKORA M. (2006/1) *Antibody repertoire development in swine*. *Developmental and Comparative Immunology* **30**: 199–221.
- BUTLER J.E. und WERTZ N. (2006/2) *Antibody Repertoire Development in Fetal and Neonatal Piglets. XVII. IgG Subclass Transcription Revisited with Emphasis on New IgG3*. *The Journal of Immunology* **177**: 5480–5489.
- CHIDLOW J. und PORTER P. (1977) *Uptake of maternal antibody by the neonatal pig following intramuscular and intramammary vaccination of the preparturient sow*. *Research in Veterinary Science* **23(2)**: 185–190.
- COX J.C. und COULTER A.R. (1997) *Adjuvants -a classification and review of their modes of action*. *Vaccine* **15**: 248–256.
- CURTIS J. und BOURNE F. (1971) *Immunoglobulin Quantitation in Sow Serum, Colostrum and Milk and the Serum of young Pigs*. *Biochimica et Biophysica Acta* **236**: 319–332.
- CURTIS J. und BOURNE F. (1973) *Half- Lives of Immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the Serum of New- Born Pigs*. *Immunology* **24**: 147–155.
- DE ARRIBA M., CARVAJAL A., POZO J. und RUBIO P. (2002) *Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **85**: 85–97.
- DENNIS O.V.G. (2002) *Erfahrungen mit dem Porcine Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in einem Zuchtbetrieb in East Anglia*. *The Pig Journal* **49**: 103–109.

- ELAHI S., BUCHANAN R.M., BABIUK L.A. und GERDTS V. (2006) *Maternal Immunity Provides Protection against Pertussis in Newborn Piglets*. *Infection and Immunity* **74**: 2619–2627.
- FRENYO V., PETHES G., ANTAL T. und SZABO I. (1980) *Changes in colostral and serum IgG content in swine in relation to time*. *Veterinary Research Communications* **4**: 275–282.
- FRÜH B. (2007) *Gruppenhaltung ferkelführender Sauen in der Öko-Landwirtschaft*. *Ökologie & Landbau* **144,4**: 40–42.
- GÖBEL T. und KASPERS B. (2004) Blut/ Immunabwehr und Blutgruppen, in: *Physiologie der Haustiere*, Engelhard, W.v., Breves, G. (Hrsg). Enke Verlag, Stuttgart.
- GOTO N., KATO H., ICHI MAEYAMA J., SHIBANO M., SAITO T., YAMAGUCHI J. und YOSHIHARA S. (1997) *Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties*. *Vaccine* **15, No. 12/13**: 1364–1371.
- HAYE S. und KORNEGAY E. (1979) *Immunoglobulin G, A, M and antibody response in sow-reared and artificially- reared pigs*. *Journal of Animal Science* **48**: 1116–1122.
- HIGGINS D. und WARR G. (1993) *Duck immunoglobulins: structure, functions and molecular genetics*. *Avian Pathology* **22**: 211–236.
- HOERLEIN A.B. (1957) *The influence of colostrum on antibody response in baby pigs*. *Journal of Immunology* **78**: 112–117.
- IBEN B. (2003) *Das Gesäuge der Sau*. *Großtierpraxis* **4:12**: 16–22.
- JACKSON P.G. (2006) *Geburtshilfe in der Tiermedizin*. Urban & Fischer bei Elsevier, München.
- JENSEN A.R., ELNIF J., BURRIN D.G. und SANGILD P.T. (2001) *Development of Intestinal Immunoglobulin Absorption and Enzyme Activities in Neonatal Pigs Is Diet Dependent*. *The Journal of Nutrition* **131**: 3259–3265.
- JUNGI T. (2000) *Klinische Veterinärimmunologie*. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart.
- KACSKOVICS I., SUN J. und BUTLER J.E. (1994) *Five Putative Subclasses of Swine IgG Identified from the cDNA Sequences of a Single Animal*. *Journal of Immunology* **153**: 3565–3573.
- KELLEY K.W., BLECHA F. und REGNIER J.A. (1982) *Cold exposure and absorption of colostral immunoglobulins by neonata pigs*. *Jornal of Animal Science* **55, No. 2**: 363–368.

- KENNETH M., TRAVERS P. und WALPORT M. (2007) *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis, London.
- LANG E. (2004) *Einfluss einer Echinacea-Fütterung auf Immunstatus und Verhalten bei Ferkeln in den ersten Lebenswochen*. Dissertation, Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung, LMU München .
- LÖSER R. (2007) *Gut, aber noch nicht gut genug*. *Bioland* **4**: 20–21.
- MACHADO-NETO R., GRAVES C.N. und CURTIS S.E. (1987) *Immunoglobulins in piglets from sows heat- stressed prepartum*. *Journal of Animal Science* **65**: 445–455.
- MARTIN M., TESOURO M., GONZALES-RAMON N., PINEIRO A. und LAMPREAVE F. (2005) *Major plasma proteins in pig serum during postnatal development*. *Reproduction, Fertility and Development* **17**: 439–445.
- MILLER B., WHITTEMORE C., STOKES C. und TELEMO E. (1994) *The effect of delayed weaning on the development of oral tolerance to soya- bean protein in pigs*. *British Journal of Nutrition* **71**: 615–625.
- PIRRON N. (2001) *Empirische Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen in Schweinemastbetrieben*. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover .
- PLONAIT H. (2004) *Erkrankungen des Gesäuges*, in: *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart.
- PORTER P. (1969) *Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sow and their absorption by the neonatal piglet*. *Biochimica et Biophysica Acta* **181**: 381–392.
- RAMANAU A. (2004) *Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von L-Carnitin auf die Reproduktions- und Aufzuchtleistungen von Sauen*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg .
- ROOKE J. und BLAND I. (2002) *The aquisition of passive immunity in the new-born piglet*. *Livestock Production Science* **78**: 13–23.

- ROOKE J., CARRANCA C., BLAND I., SINCLAIR A., EWEN M., V.C. B. und EDWARDS S. (2003) *Relationships between passive absorption of immunoglobulin G by the piglet and plasma concentrations of immunoglobulin G at weaning*. *Livestock Production Science* **81**: 223–234.
- SALMON H., BERRI M., GERDTS V. und MEURENS F. (2009) *Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine*. *Developmental and Comparative Immunology* **33**: 384–393.
- SCHADE R., BEHN I. und ERHARD M. (2001) *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application*. Springer Verlag, Berlin.
- SCHIJNS V.E. (2000) *Immunological concepts of vaccine adjuvant activity*. *Current Opinion in Immunology* **12**: 456–463.
- SETCAVAGE T.M. und KIM Y.B. (1976) *of the Immunological State of Germfree Colostrum-Deprived Minnesota Miniature Piglets*. *Infection and Immunity* **13 No.2**: 600–607.
- STALLJOHANN G. (2006) *Untersuchungen zu Fütterungsstrategien für eine erfolgreiche Aufzucht ökologisch gehaltener Ferkel*. Dissertation, LMU München .
- TELEMO E., BAILEY M., MILLER B., STOKES C. und BOURNE F. (1991) *Dietary Antigen Handling by Mother and Offspring*. *Scandinavian Journal of Immunology* **34**: 689–696.
- TIZARD I.R. (2008) *Veterinary Immunology: An Introduction*. W.B Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- TORCHE A.M., DIMNA M.L., CORRE P.L., MESPLEDE A., GAL S.L., CARIOLET R. und POTIER M.F.L. (2006) *Immune response after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **109**: 209–217.
- VAN DER VEN H. (2002) *Zur Wirksamkeit verschiedener Adjuvantien in bakteriellen bestandsspezifischen Vakzinen für Puten*. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover .
- WIESNER E. und RIBBECK R. (2000) *Lexikon der Veterinärmedizin*. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart.
- ZHAO Y., KACSKOVICS I., PAN Q., LIBERLES D., GELI J., DAVIS S., RABBANI H. und HAMMARSTROM L. (2002) *Artiodactyl IgD: the missing link*. *Journal of Immunology* **169**: 4408–4416.

ZIKAN J., SIMA P. und TUCKOVA L. (1983) *Cross-reactivity of Human and a Putative Pig IgD. Pig IgD-like Molecules as Serum and Lymphocyte Components.* Folia Microbiologica **28**: 474–483.

Abbildungsverzeichnis

1.	Sauen in der Freilandhaltung	13
2.	Fütterung der Sauen	13
3.	Ausläufe der Abferkelstallungen	14
4.	Ausläufe der Gruppensäugestallungen	15
5.	Aufzuchtstallungen der Ferkel	16
6.	Gesamt-IgG-Konzentrationen der Ferkel an Tag 7 p.n. und der Muttersauen an Tag 3 p.p. der zweiten Laktation	25
7.	Gesamt-IgG-Konzentrationen der Ferkel an Tag 7 p.n. und der Muttersauen an Tag 3 p.p. der dritten Laktation	26
8.	Ergebnisse der Gesamt-IgG-Konzentrationen im Plasma der früh immunisierten Ferkel der zweiten Laktation	28
9.	Ergebnisse der Gesamt-IgG-Konzentrationen im Plasma der spät immunisierten Ferkel der zweiten Laktation	29
10.	Ergebnisse der Gesamt-IgG-Konzentrationen im Plasma der früh immunisierten Ferkel der dritten Laktation	30
11.	Ergebnisse der Gesamt-IgG-Konzentrationen im Plasma der spät immunisierten Ferkel der dritten Laktation	31
12.	Korrelationen der Anti-OvA-IgG-Titer der Sauen an Tag 3 p.p. und der früh abgesetzten Ferkel an Tag 7 p.n. der zweiten Laktation	32
13.	Korrelationen der Anti-OvA-IgG-Titer der Sauen an Tag 3 p.p. und der spät abgesetzten Ferkel an Tag 7 p.n. der zweiten Laktation	33
14.	Korrelationen der Anti-OvA-IgG-Titer der Sauen an Tag 3 p.p. und der früh abgesetzten Ferkel an Tag 7 p.n. der dritten Laktation	34

15.	Korrelationen der Anti-OvA-IgG-Titer der Sauen an Tag 3 p.p. und der spät abgesetzten Ferkel an Tag 7 p.n. der dritten Laktation	35
16.	Ergebnisse der Anti-OvA-IgG-Titer im Plasma der früh immunisierten Ferkel der zweiten Laktation	36
17.	Ergebnisse der Anti-OvA-IgG-Titer im Plasma der spät immunisierten Ferkel der zweiten Laktation	37
18.	Ergebnisse der Anti-OvA-IgG-Titer im Plasma der früh immunisierten Ferkel der dritten Laktation	38
19.	Ergebnisse der Anti-OvA-IgG-Titer im Plasma der spät immunisierten Ferkel der dritten Laktation	39
20.	Ergebnisse der Anti-IgY-IgG-Titer im Plasma der früh immunisierten Ferkel der zweiten Laktation	41
21.	Ergebnisse der Anti-IgY-IgG-Titer im Plasma der spät immunisierten Ferkel der zweiten Laktation	42
22.	Ergebnisse der Anti-IgY-IgG-Titer im Plasma der früh immunisierten Ferkel der dritten Laktation	43
23.	Ergebnisse der Anti-IgY-IgG-Titer im Plasma der spät immunisierten Ferkel der dritten Laktation	44
24.	Die Rötung der Gesäugeleisten der Sauen	46
25.	Die Schwellung der Gesäugeleisten der Sauen	47
26.	Die Verletzung der Gesäugeleisten der Sauen	48
27.	Der Body-Condition-Index der Sauen	49

Tabellenverzeichnis

1.	IgG-Konzentrationen (mg/ml) nach BOURNE (1973)	5
2.	Veränderungen der Durchschnitts-IgG-Konzentration (mg/ml) im Serum von Ferkeln von der Geburt bis zu einem Alter von 10 Wochen (FRENYO et al., 1980) . .	6
3.	Futtermittelzusammensetzung der tragenden Sauen	71
4.	Futtermittelzusammensetzung der laktierenden Sauen	71
5.	Futtermittelzusammensetzung der Aufzuchtferkel	72
6.	Beim ELISA verwendete Puffer und Lösungen	73
7.	Bezeichnungen, Firmen und deren Herkunftsort von Chemikalien, Reagenzien, Materialien, Geräten und Programmen	74

Anhang

Tabelle 3.: Futtermittelzusammensetzung der tragenden Sauen

Komponente	Anteil in %
Ackerbohnen	20,0
Gerste	16,0
Erbsen	5,0
Weizenkleie	12,0
Bio-Rapskuchen	6,0
Triticale	37,5
Kalk	1,0
Mineralzusatz	2,5

Tabelle 4.: Futtermittelzusammensetzung der laktierenden Sauen

Komponente	Anteil in %
Bio-Rapskuchen	5,0
Bio-Sojakuchen	6,0
Bio-Sonnenblumenöl	0,5
Erbsen	20,0
Kalk	1,0
Ackerbohnen	10,0
Gerste	25,5
Triticale	30,0
Mineralzusatz	2,0

Tabelle 5.: Futtermittelzusammensetzung der Aufzuchtferkel

Komponente	Anteil in %
Erbsen	20,0
Lupinen, blau	10,0
Triticale	28,0
Gerste	20,0
Bio-Sojakuchen	20,0
Mineralzusatz	2,0

Tabelle 6.: Beim ELISA verwendete Puffer und Lösungen

Beim ELISA verwendete Puffer und Lösungen	
PBS:	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,2 8,00 g Natriumchlorid (J.T. Baker, Deventer, Holland) 1,45 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 0,20 g Kaliumdihydrogenphosphat 0,20 g Kaliumchlorid Ad 1000ml Aqua bidest Zur Herstellung von PBS- Tween (pH 7,2) wurde zusätzlich 500 µl Tween 20 (Fa. AppliChem, Darmstadt) zugesetzt.
Beschichtungspuffer:	Carbonatpuffer pH 9,6 3,11 g Natriumcarbonat 6,00 g Natriumhydrogencarbonat Ad 1000ml Aqua bidest.
Waschpuffer:	PBS- Tween
Tetramethylbenzidin- (TMB) Puffer:	Natriumacetat- Citrat- Puffer pH 5,0 8,20 g Natriumcarbonat 3,15 g Zitronensäure- Monohydrat (AppliChem, Darmstadt) ad 1000ml Aqua bidest.
Stammlösung:	0,06 g Tetramethylbenzidin (Fa. Sigma, Deisenhofen) 10 ml Dimethylsulfoxid (Fa. AppliChem, Darmstadt)
Substratlösung:	332 µl Stammlösung 10,0 ml TMB- Puffer 3,00 µl 30 % H ₂ O ₂
Stoppreagenz:	1- molare Schwefelsäure pH 1 472,2 ml Aqua bidest. 27,80 ml 96 % ige Schwefelsäure

(soweit nicht anders aufgeführt, sind alle Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt)

Tabelle 7.: Bezeichnungen, Firmen und deren Herkunftsort von Chemikalien, Reagenzien, Materialien, Geräten und Programmen

Bezeichnungen, Firmen und deren Herkunftsort von Chemikalien, Reagenzien, Materialien, Geräten und Programmen	
IgY vom Huhn:	(eigene Herstellung vom 03.11.05, Institut für Tierschutz, München)
OvA:	(Fa. Sigma A5503)
Al(OH) ₂ xH ₂ O:	(Fa. Merck, Darmstadt)
Monovetten® 9 ml:	(Sarstedt, Nümbrecht)
Interner Standard:	zufällig ausgewählte Ferkelplasmaproben miteinander gepoolt
mechanisches Waschgerät:	(ELx 405, Auto- Plate- Washer, Bio-TEK Instruments, Bad Friedrichshall)
96- F- Loch- Mikrotiterplatte:	aus Polystrol (nunc, Roskilde, Dänemark)
Kaninchen-anti-Schwein-IgG:	(P8290, Fa. Sigma, Deisenhofen)
porcines IgG:	(I4381, Fa. Sigma, Deisenhofen)
an Peroxidase gekoppelten Kaninchen-anti-Schwein- IgG:	(A5670, Fa. Sigma, Deisenhofen)
ELISA- Reader:	(GENios, Tecan, Crailsheim)
Computerprogramm:	(MikroWin, Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath)
POOL in einer Verdünnung 1:5:	(vom 06.11.2006 Pollmüller- lange nach Boosterung)
POOL in einer Verdünnung 1:10:	(vom 08.2006 Pollmüller)
an Peroxidase gekoppeltes Ziegen- anti-Schwein- IgG:	(Acris SP2086HRP)
POOL in einer Verdünnung 1:5:	(vom 21.03.2007 Pollmüller- geboostert)

Danksagung

Herrn Professor Dr. M. H. Erhard gilt mein besonderer Dank, für die Überlassung des Themas, die wertvollen Anregungen und die stets gewährte Hilfe und Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die jederzeit freundliche und immer hilfsbereite Betreuung in einem nicht selbstverständlichem Ausmaß bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. F. Ahrens bedanken.

Vielen Dank an das Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) und an die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) für die Finanzierung dieser Studie.

Ein großes Dankeschön an meine „Dissertationspartnerin“, Kollegin, Freundin und Mitbewohnerin Yvonne Sünkel - Danke für die schöne Zeit!

Danken möchte ich dem Laborpersonal, insbesondere Frau Katrin Schuster, ebenso Herrn Herrmann Kuchler und Herrn Christian Strobl, so wie allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die immer freundliche Hilfsbereitschaft.

Vielen Dank an die Tierärzte, die die Fotos beurteilt haben: Dr. Frank Ahrens, Dr. Dorothea Döring, Dr. Angela Mittmann, Dr. Siegfried Platz und Dr. Anna-Caroline Wöhr.

Ganz herzlich danke ich den Mitarbeitern des Instituts für ökologischen Landbau in Trenthorst, Herrn Prof. Dr. Gerold Rahmann und Herrn Dr. Friedrich Weißmann für die wissenschaftliche Unterstützung. Besonders hervorzuheben in meiner Danksagung sind die Menschen, die während des gesamten praktischen Teils der Doktorarbeit tatkräftig als „Fixierer“ der Schweine und für die Pflege und Fütterung der Tiere zuständig waren, unter anderen: Ralf Bussemas, Andrea Kiehl, Sören Stehr, Lennard Glöde, Felix Michael, Michaela Braun und Uwe Stockrahm.

Danksagung

Für die allzeit freundliche Unterstützung in jeglichen LaTeX- und IT-Angelegenheiten danke ich Herrn Chris van der Meijden, Dr. Sylvia Latzel und Julia Loibl.

Ich danke meinen Eltern, Johannes und Elisabeth Pollmüller, und meiner Schwester, Andrea Schmidt, dass sie immer für mich da waren und an mich geglaubt haben.

Zuletzt danke ich Theo und Lucy und allen Freunden für ihre Anteilnahme und ihre Geduld.