

Aus der Medizinischen Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Analyse des fäkalen Mikrobioms des Pferdes
in Assoziation mit antibiotischer Therapie und
Anwendung eines Präbiotikums**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Nicole Graneß

aus Neustrelitz

Leipzig, 2018

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Walter Brehm

Betreuer: Prof. Dr. Gerald Fritz Schusser

Gutachter: Prof. Dr. Gerald Fritz Schusser

Medizinische Tierklinik

Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

PD Dr. Angelika Schoster

Klinik für Pferdemedizin

Vetsuisse-Fakultät Departement für Pferde, Universität Zürich

Tag der Verteidigung: 30.10.2018

Meiner Großmutter

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Bedeutung der intestinalen Mikrobiota	3
2.1.1	Etablierung	3
2.1.2	Zusammensetzung	3
2.1.2.1	Bakterien	4
2.1.2.2	Protozoen	5
2.1.2.3	Archaea	6
2.1.2.4	Pilze und Hefen	6
2.1.2.5	Viren und Bakteriophagen	7
2.1.3	Funktion	8
2.1.3.1	Schutzbarriere	8
2.1.3.2	Antimikrobielle und antibakterielle Funktion	11
a)	Biofilme	11
b)	Antimikrobielle Peptide	13
c)	Bakteriozine	13
d)	Bakteriophagen	15
e)	pH-Wert	16
f)	Gallensäuren	18
g)	Milchsäurebakterien	18
2.1.3.3	Metabolische Funktion	19
2.1.3.4	Immunologische Funktion	22
2.2	Das equine Mikrobiom	24
2.2.1	Unterschiede des Mikrobioms innerhalb verschiedener Kompartimente	26
2.3	Einflussfaktoren	27
2.3.1	Fütterung	28
2.3.2	Alter	30
2.3.3	Medikamente	30
2.4	Störungen der intestinalen Mikrobiota	31
2.4.1	Dysbiose	31
2.4.2	Antibiotika-assoziierte Diarrhoe	32
2.4.3	Colitis	34
2.5	Therapie	37

2.5.1	Antibiotika.....	37
2.5.2	Probiotika	39
2.5.3	Präbiotika	40
2.5.4	Huminsäuren	43
2.5.5	Fäkale Mikrobiota-Transplantation	45
2.6	Molekulargenetische Methoden zur Analyse der Mikrobiota	46
2.6.1	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	47
2.6.2	Andere Methoden	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Publikation: Quantitative Analyse der fäkalen bakteriellen Mikrobiota mit Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung bei Pferden unter Antibiotikatherapie und Präbiotikum- applikation	51
4	Diskussion	66
4.1	Beurteilung der Methode	66
4.2	Einfluss von Antibiotika (Gruppe 3 und Gruppe 4)	68
4.3	Effekt des Präbiotikums (Gruppe 2 und Gruppe 4)	70
4.4	Pferde mit akuter Colitis	72
4.5	Individuelle und äußere Einflussfaktoren.....	73
5	Zusammenfassung	75
6	Summary	77
7	Literaturverzeichnis	79
8	Anhang	I
8.1	Abbildungen	I
8.2	Weitere Publikationen	V

Danksagung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
16S-/23S-rRNA	Ribonukleinsäure der kleinen Ribosomenuntereinheit (S = Sedimentationseinheit)
Abb.	Abbildung
AAD	Antibiotika-assoziierte Diarrhoe
AMP	antimikrobielle Peptide
ATP	Adenosintriphosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Bif 164	Oligonukleotidsonde, Genus-spezifisch für <i>Bifidobacterium spp.</i>
bzw.	beziehungsweise
C-Atom	Kohlenstoff-Atom
CF 319a	Oligonukleotidsonde, Zielorganismus: Bakterien der <i>Cytophaga-Flavobacteria</i> -Klasse
CFU	colony forming unit = koloniebildende Einheit
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
EU	Europäische Union
EUB 338	Oligonukleotidsonde, Zielorganismus stammübergreifend für Eubacteria
FAO	Food and Agriculture Organization of the Nation = Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FMT	faecal microbiota transplantation = fäkale mikrobielle Transplantation
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
IgA	Immunglobulin A
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
i.v.	intravenös

kDA	Kilodalton, atomare Masseneinheit
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
LPS	Lipopolysaccharide
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mol	Molekulargewicht
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MUC	Muzin-Gen
n	Anzahl
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs = nicht-steroidale Antiphlogistika
NOD	Nucleotid-Oligomerizations-Domains
p	p-Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> (lat.); negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pKa	Dissoziationskonstante
q-PCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sp.	<i>Species</i> (Singular)
spp.	<i>Species</i> (Plural)
ssp.	<i>Subspezies</i> (lat. für Unterart)
Tab.	Tabelle
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
T-RFLP	Terminale Restriktionsfragmentanalyse
TLR	Toll-like-Rezeptor
TGF	transforming growth factor
u.a.	unter anderem/ unter anderen
USA	United States of America = Vereinigte Staaten von Amerika
VLP	virusähnliche Partikel
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel

Mikroorganismen

<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lb. planturum 299v</i>	<i>Lactobacillus planturum 299v</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>S. bongori</i>	<i>Salmonella bongori</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella enterica ssp. enterica ser. Enteritidis</i>
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica ssp. enterica ser. Typhimurium</i>

1. Einleitung

Die Besiedlung der Schleimhautoberflächen größerer Organismen durch Kleinstlebewesen ist seit Jahrzehnten bekannt. Mit der Geburt entzieht sich das Neugeborene der sterilen Umgebung und setzt sich den Mikroorganismen, die ubiquitär in der Umwelt existieren, aus.

Millionen von Mikroorganismen wie Bakterien, Protozoen, Archaeen, Pilze, Viren und Parasiten erreichen damit auch den Verdauungstrakt der größeren Lebewesen und kolonisieren dort unter symbiotischen Verhältnissen die Darmschleimhaut. Die sogenannte gastrointestinale Mikrobiota sichert so nicht nur ihr eigenes Überleben, sie unterstützt den Wirtsorganismus insbesondere bei der Verdauung von Nahrungsbestandteilen, die durch wirtseigene Enzyme nicht verdaubar wären. Durch die mikrobielle Fermentation wird dem Wirtsorganismus zusätzliche Energie zur Verfügung gestellt.

Da die Mikroorganismen nunmehr auch über moderne DNA-Extraktionsmethoden und Sequenzierung erkannt und benannt werden können, wurde der umfassende Begriff des Mikrobioms etabliert. Zum Mikrobiom zählen viele Mikroorganismen, die Oberflächen, Umweltnischen, aber auch Schleimhäute und Gewebe von Wirtsorganismen kolonisieren und in der Zusammensetzung individuell und vielfältig sind.

Untersuchungen zum Mikrobiom auf Schleimhäuten diverser Tierarten sind hochaktuell. Das intestinale Mikrobiom ist dabei von besonderem Interesse, da die Verdauung der Nahrung für den Erhalt des Organismus von essentieller Bedeutung ist und Erkrankungen des Verdauungstraktes meist schwerwiegenden Einfluss auf den allgemeinen Gesundheitszustand des Individuums nehmen.

Das Pferd mit seinem im Vergleich zu anderen Spezies sehr voluminösen Verdauungstrakt ist besonders von seiner Mikrobiota abhängig, denn fast 2/3 des Erhaltungsbedarfes eines Pferdes kann allein über die Fermentation bereitgestellt werden (ARGENZIO et al. 1974, 1975; BERGMANN 1990).

Statistisch gesehen gilt die Kolik als Haupttodesursache erwachsener Pferde mit einer Mortalitätsrate von 28 - 31 % (TINKER et al. 1997, KANEENE et al. 1997). Eine epidemiologische Studie ergab eine Inzidenz von 10,6 bis max. 30 Kolikfällen je 100 Pferde pro Jahr (TINKER et al. 1997). Inwieweit Veränderungen der mikrobiellen Zusammensetzung zur Entstehung der Kolik beitragen, ist noch nicht hinreichend untersucht, aber denkbar.

Daneben gilt der therapeutische Einsatz von Antibiotika erwiesenermaßen als Risikofaktor für die Entstehung gastrointestinaler Störungen, wie Diarrhoe, Darmwandentzündung und Etablierung von pathogenen oder resistenten Bakterien bei antibiotischer Langzeittherapie. Die Inzidenz für die Entwicklung einer AAD schwankt in der Humanmedizin in Abhängigkeit vom verwendeten

Einleitung

Antibiotikum zwischen 15 - 20 % (SCHRÖDER et al. 2006). Die Kombination der AAD mit dem Auftreten von *C. difficile*-Infektionen ist erwiesen und verkompliziert Behandlungen in zunehmendem Maße (BARTLETT 1992; MCFARLAND 2008; SLIMINGS und RILEY 2014).

In der Veterinärmedizin sind diesbezüglich erst wenige Studien vorhanden. In den USA ermittelte eine Studie von BARR et al. (2013) eine Prävalenz für AAD bei Pferden von 0,6 %. Die Problematik der AAD ist auch bei Hunden (WILLARD et al. 1998) und Schweinen (TSUKAHARA und USHIDA 2002) bekannt.

Die Behandlung mit Medikamenten, speziell Antibiotika, begründet sich durch die klinische Symptomatik und daraus resultierende Diagnostik und darf nicht wahllos erfolgen. Ziel der vorliegenden Studie war es daher zu untersuchen, ob unter antibiotischer Behandlung Veränderungen in der Darmflora des Pferdes eintreten, wie diese zu messen sind und wie die Veränderungen im klinischen Kontext interpretiert werden können.

Eine größere Schwierigkeit in der Untersuchung des intestinalen Mikrobioms stellt die direkte Probenentnahme dar. Außerdem variiert die mikrobielle Zusammensetzung in den verschiedenen Kompartimenten des Verdauungstraktes (SUCHODOLSKI et al. 2005; HASTIE et al. 2008; SADET-BOURGETEAU und JULLIAND 2010; DOUGAL et al. 2011, 2012). Die einfachste zugängliche Methode ist die Untersuchung der Fäzes und der fäkalen Mikrobiota. Die fäkale Probenuntersuchung wurde für diese Studie ausgewählt, da bei gesunden Kontrolltieren vergleichend zu erkrankten Tieren die gleiche Entnahmeform angewendet werden sollte. Inwieweit Veränderungen der intestinalen Mikrobiota auch in Fäzes nachzuvollziehen sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Aber sollte eine Hemmung der Proliferation von intestinaler Flora eintreten, ist eine Veränderung der mikrobiellen fäkalen Zusammensetzung ebenso anzunehmen. Die therapeutischen Maßnahmen bei Darmentzündungen sind sehr begrenzt, da der Darm, im Gegensatz zur Hautoberfläche beispielsweise, für eine direkte lokale Therapie nicht zugänglich ist. Pro- und präbiotische Applikationen sowie Transplantationen von Fäzes eines gesunden Spenders sind neuere Methoden in der Therapie einer Darmentzündung neben der symptomatischen Behandlung des durch die Diarrhoe entstehenden Flüssigkeit- und Elektrolytverlustes und der antibiotischen Behandlung bei Dysbiosen bzw. dem Auftreten von pathogenen Keimen. Bei chronischen Darmwandveränderungen, hervorgerufen durch Autoimmunerkrankungen, kommen üblicherweise Glukokortikoide zum Einsatz.

Das Ziel dieser Studie war die quantitative Analyse der fäkalen Mikrobiota mit Hilfe ausgewählter Oligonukleotidsonden spezifischer enteraler kommensaler Bakterien bei darmgesunden Pferden und kranken Pferden mit Antibiotikatherapie. Eine zweite Untersuchung analysierte den Einfluss eines Präbiotikums auf die fäkale Mikrobiota der Pferde.

2. Literaturübersicht

2.1 Bedeutung der intestinalen Mikrobiota

2.1.1 Etablierung

Neugeborene sind nach dem Verlassen der sterilen Gebärmutter der kompletten Vielfalt der in der Umwelt vorkommenden Mikroorganismen ausgesetzt. Durch die Geburt und mit der Entlassung in die Umwelt kommt es zur mikrobiellen Besiedlung von äußeren und inneren Körperoberflächen des Neugeborenen (SONNENBURG et al. 2004). Die mikrobielle Gemeinschaft (Mikrobiota) im Darm entwickelt sich über die orale Aufnahme von Mikroorganismen mit der Nahrung. Bakterielle Erstbesiedler des Darmes sind aerotolerante und fakultativ anaerobe Bakterien des Phylum *Proteobacteria* und der dazugehörigen Familie *Enterobacteriaceae* mit ihrem wichtigen Vertreter *E. coli*. Des Weiteren gehören dazu mehrere bakterielle Vertreter des Phylum *Firmicutes* sowie aus der Ordnung der Milchsäurebakterien (*Lactobacillales*) die dazugehörigen grampositiven Kokken wie *Enterococcus*, *Lactobacillus* und *Streptococcus* sowie die aus der Ordnung der *Bacillales* die stammende Gattung *Staphylococcus* (HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 1979; MACKIE et al. 1999; PARK et al. 2005). Diese Bakterien konnten sowohl kulturell als auch mit molekularbiologischen Methoden im Mekonium nachgewiesen werden (MOLES et al. 2013). Es ist bemerkenswert, dass dieser Prozess der Erstbesiedlung speziesübergreifend einheitlich verläuft (SMITH und CRABB 1961; SMITH 1965). Jüngste Erkenntnisse aus der Humanmedizin zeigten ein verstärktes Auftreten von Staphylokokken an Stelle von *E. coli* als Erstbesiedler der Darmschleimhäute, was mit veränderten Hygienebedingungen in Krankenhäusern begründet wird (ADLERBERTH et al. 2006). Die Erstbesiedler gelten als Milieuvorbereiter, denn der restliche vorhandene Sauerstoff wird durch sie verbraucht und das Redoxpotential dadurch gesenkt, so dass im weiteren Prozess der Entwicklung der Diversität des intestinalen Mikrobioms hauptsächlich Anaerobier wie *Bifidobacterium* des Phylum *Actinobacteria* sowie Vertreter der Gattung *Bacteroides* und *Clostridia* des Phylums *Bacteroidetes* und *Firmicutes* die dominierenden Bakterienarten werden (MACKIE et al. 1999).

Im Alter ist die Zusammensetzung der mikrobiellen Darmflora im Individuum sehr stabil (HOPKINS et al. 2001, MACKIE et al. 1999). Dennoch fielen interindividuelle Unterschiede in der Zusammensetzung auf (ZOETENDAL et al. 1998; DOUGAL et al. 2014).

2.1.2 Zusammensetzung

Das mikrobielle Ökosystem ist sowohl beim Menschen als auch bei anderen Säugetieren sehr komplex und divers zusammengesetzt. Neben prokaryotischen Lebewesen wie den Bakterien,

Archaeen und den eukaryotischen Lebewesen, wie Pilzen (inklusive Hefen) und Protozoen, zählen auch Viren und Bakteriophagen zu der Biozönose innerhalb des Darmes.

Das Milieu im Darm ist anaerob, was zugleich eine Voraussetzung für die Ansiedlung dieser Mikroorganismen ist. CANN et al. (2005) untersuchten mit molekularbiologischer Analysen in Fäzes von darmgesunden Pferden die quantitativen Anteile der darin vorkommenden Mikroorganismen. Sie konnten in 63 % der Proben Virusgenom nachweisen, wobei nicht klassifizierte Phagen 23 % davon einnahmen. Weiterhin waren 20 % bakterielles Genom, 7 % Archaea und 6 % eukaryotische Zellen (Protozoen und Pilze) feststellbar. Aufgrund derzeit noch begrenzter Forschungsergebnisse, ist die genaue Funktion von Protozoen und Archaeen innerhalb der autochthonen Darmflora nicht genau bekannt.

2.1.2.1 Bakterien

Das gastrointestinale bakterielle Mikrobiom ist ein sehr bedeutsamer Forschungszweig innerhalb der Mikrobiota. Anfänglich erschwerten die begrenzten Kulturmöglichkeiten die Forschung.

Früh bemerkten DYAR und KEITH (1894) in ihrer Studie, dass innerhalb des Darmmilieus beim Pferd und anderen domestizierten Tieren Mikroorganismen leben und vorkommen. CHOUKEVITCH (1911) nahm noch an, dass die mikrobielle Darmflora bei Pflanzenfressern durch begrenzte Entwicklungsmöglichkeiten aufgrund des fehlenden Sauerstoffs nur mit wenigen Bakterien ausgestattet ist.

Mit den verbesserten Kulturmöglichkeiten und neueren Erkenntnissen zu Bakterien, die auch anaerob lebensfähig sind (HUNGATE 1950; GRUBB und DEHORITY 1976) zeichnete sich der Artenreichtum von Bakterien im Mikrobiom des Darmes ab. Aus dem Darminhalt von Caecum und Colon des Pferdes wurden Bakterien anfänglich mikroskopisch unterschieden und aufgrund ihres Verhaltens in der Gram-Färbung, dem Vorhandensein einer Zellwand sowie ihrer Morphologie in Gruppen oder Spezies eingeordnet (CHOUKEVITCH 1911; ALEXANDER et al. 1952; ALEXANDER und DAVIES 1963; DAVIES 1964; KERN et al. 1973; BARUC et al. 1983; MACZULAK et al. 1985; BONHOMME 1986; MACKIE und WILKINS 1988; JULLIAND et al. 1999; AL JASSIM et al. 2005). Eine übersichtliche Tabelle zu den gegenwärtigen im equinen Intestinum nachgewiesenen Bakteriengruppen und Spezies ist in einer Arbeit von JULLIAND und GRIMM (2016) veröffentlicht worden.

Mit der Entwicklung von molekularbiologischen Methoden und den damit verbundenen Möglichkeiten nach genomischen Material zu suchen, sind Bakterien, für die keine kulturabhängigen Standardverfahren zur Verfügung stehen, detektierbar geworden (DALY et al. 2001; SHEPARD et al. 2012). Damit erweiterte sich wiederum das Spektrum der nachweislich vorkommenden Bakterienarten. Die Voraussetzungen für das intestinale Existieren dieser

Mikroorganismen ist die Fähigkeit, ohne Sauerstoff leben zu können. SADET-BOURGETEAU und JULLIAND (2012) fanden Konzentrationen von Anaerobiern im Blind- und Grimmdarminhalt beim Pferd von 10^7 - 10^{11} Zellen/ml heraus. SADET-BOURGETEAU et al. (2014) berichteten, dass zuvor durch DE FOMBELLE et al. (2003) ermittelte Bakterienzahl von Anaerobiern in Fäzes weitaus höher ist als im rechten ventralen Grimmdarm des Pferdes. Es ist bereits anerkannt, dass die mikrobielle Gemeinschaft sich in ihrer Diversität und Quantität in den verschiedenen Magen- und Darmsegmenten unterscheidet, sowohl beim Menschen (ECKBURG et al. 2005; ANDERSSON et al. 2008; DURBÁN et al. 2011), beim Rind (HESPELL et al. 1997; FREY et al. 2010), Hund (SUCHODOLSKI et al. 2005), der Maus (PANG et al. 2012) als auch beim Pferd (DE FOMBELLE et al. 2003; MILINOVICH et al. 2008; HASTIE et al. 2008; DOUGAL et al. 2012, 2013; SCHOSTER et al. 2013; SADET-BOURGETEAU et al. 2014; COSTA et al. 2015a).

Im Abschnitt 2.2 wird näher auf die Zusammensetzung der bakteriellen intestinalen Mikrobiota des Pferdes eingegangen, der Abschnitt 2.2.1 wird sich näher mit den Unterschieden innerhalb der Kompartimente beim Pferd befassen.

2.1.2.2 Protozoen

Das Auftreten von Protozoa in den Ingesta des Pferdes wurde von GRUBY und DELAFOND (1843) erstmalig beschrieben. Die ersten quantitativen Studien folgten anschließend durch ADAM (1953) und OZEKI et al. (1973). Letztere konnten im Dickdarm Konzentrationen von 10^4 - 10^6 Zellen/ml ermitteln, wobei im Grimmdarm des Pferdes ($7,7 \times 10^5$ Zellen/ml) eine höhere Dichte der Protozoa als im Blinddarm ($2,2 \times 10^5$ Zellen/ml) festgestellt wurde (OZEKI et al. 1973). Protozoen wurden besonders in Caecum, Colon und in Fäzes nachgewiesen, wobei die Gattungen *Blepharocorys* und *Cycloposthium* zuerst erkannt (ADAM 1953) und in Konzentrationen von 10^3 - 10^6 Zellen/ml in Ingestaprobe aus Caecum und Colon zu messen waren (KERN et al. 1973; KERN et al. 1974; MOORE und DEHORITY 1993). Auch BELZECKI et al. (2016) kultivierten erfolgreich Vertreter der Gattung *Blepharocorys* aus Darminhalt des equinen Colons.

Als dominierende Art im Blinddarm des Pferdes bezeichneten OZEKI et al. (1973) *Paraisotricha*, während *Ampullacula*, *Blepharosphaera*, *Ditoxum*, *Prorodonopsis*, *Spiridinium*, *Tetratoxum*, *Triadinium* sowie *Tripalmaria* ausschließlich im Grimmdarm des Pferdes und in Fäzes, aber nicht im Blinddarm zu ermitteln waren (OZEKI et al. 1973).

Später konnten DOUGAL et al. (2012) mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wie der 18S-rRNA Gen-Sequenzierung und quantitativer PCR ebenfalls ein signifikant höheres Auftreten von ribosomaler Protozoen-DNA im rechten dorsalen Colon als im Caecum des Pferdes nachweisen. Eine Übersichtstabelle über die bisher bekannten vorkommenden Protozoen-Gattungen und Arten beim Pferd publizierten SADET-BOURGETEAU und JULLIAND (2010).

2.1.2.3 Archaea

Neben den Bakterien sind die Archaeen ebenfalls prokaryotische Bestandteile des Mikrobioms. Die Archaea sind vorwiegend anaerob und einige davon sind zur Methanogenese fähig.

Als methanogene Vertreter gelten Spezies wie *Methanobrevibacterium* sowie *Methanosphaera*, die besonders in Studien bei Wiederkäuern (JOBLIN et al. 1989), aber auch Menschen (GACI et al. 2014) und anderen Monogastriern (JENSEN 1996) entdeckt wurden. ROBINSON et al. (1989), JENSEN (1996) sowie auch DOUGAL et al. (2012) konnten ein stärkeres Vorkommen von methanogenen Archaeen im Colon als im Caecum bei Schweinen, Kühen, Kaninchen und Pferden zeigen. Bei Schweinen war der Anteil im Colon sogar 30 Mal höher als im Caecum (BUTINE und LEEDLE 1989). Zur Quantifizierung von Archaea gibt es wenige Informationen. SORLINI et al. (1988) verglichen Gesamtzahlen von Anaerobiern und methanogenen Vertretern in Fäzes bei Kühen (Anaerobier 3×10^{11} Zellen/g; Methanogene 1×10^6 Zellen/g), Schweinen (Anaerobier 3×10^{11} Zellen/g; Methanogene 1×10^8 Zellen/g) sowie Kaninchen (Anaerobier 7×10^9 Zellen/g; Methanogene 4×10^4 Zellen/g), dabei wurde nicht zwischen den prokaryotischen Bacteria und Archaea unterschieden. MORVAN et al. (1996) konnten quantitativ aus dem Caecuminhalt beim Pferd $10^4 - 10^6$ Zellen/g Trockenmasse an prokaryotischen methanogenen Einheiten erfassen.

2.1.2.4 Pilze und Hefen

Der Anteil von Pilzen inklusive Hefen als eukaryotische Vertreter am Gesamtmikrobiom ist eher gering (CANN et al. 2005) und mit $2,0 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$ Einheiten/g Trockenmasse im Pferdekot quantifiziert worden (FRAPE 2010). Von LIEBETANZ (1910) noch als monoflagellierte eukaryotische Organismen mit Ähnlichkeit zu Protozoen bezeichnet, wurden sie später als multiflagellierte Organismen im Pferdekot erkannt und für Protozoen gehalten (HSIUNG 1930). Diese eukaryotischen Organismen wurden 1966 von VAVRA und JOYON (1966) als *Neocallimastix equi* benannt und zu den Pilzen und Hefen eingeordnet sowie durch BATISTA et al. (1961) auch in Ingesta aus distalen Darmanteilen nachgewiesen.

Die ersten quantitativen Analysen zu den Konzentrationen durch ORPIN (1981) ergaben $3,2 \times 10^4 - 4,7 \times 10^4$ Zellen/ml durch die direkte mikroskopische Beurteilung von homogenisiertem Inhalt, der aus dem Caecum des Pferdes stammte. Später berechnete JULLIAND (1996) durch kultivierbare Techniken durchschnittlich $1,3 \times 10^2 - 5,3 \times 10^2$ Zoosporen/ml im Caecuminhalt von Pferden und Ponys, was eher mit Ergebnissen von FRAPE (2010) übereinstimmte.

Beeinträchtigungen in der Quantifizierung sind durch die asexuelle Vermehrung mittels freier Zoosporen in den Medien bei kulturabhängigen Methoden möglich, außerdem erschwert die

strikt anaerobe Lebensweise dieser Pilze deren Kultivierung. Über kulturunabhängige Methoden konnte die Taxonomie von Pilzen erweitert werden.

Im Pferdekot wurden durch Sequenzierungsmethoden die Gattungen *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces* und *Anaeromyces* erkannt und benannt, die zur Ordnung der *Neocallimastigales* gehören und unter dem Phylum der *Neocallimastigomycota* eingeordnet werden konnten (LIGGENSTOFFER et al. 2010).

In einer der jüngeren Untersuchungen konnten DOUGAL et al. (2012) keine signifikanten Unterschiede im Vorkommen von Pilzen in Caecum und Colon vom Pferd feststellen. Beim Menschen sind im gesunden Mikrobiom auch Hefen der Abteilung *Ascomycota* und der Ordnung *Saccharomycetales*, wie die der Familie *Dipodascaceae* zugehörigen Gattungen *Galatomyces* (KHATIB et al. 2001; GOUBA et al. 2013; HALLEN-ADAMS et al. 2015) und *Cladosporium* (COHEN et al. 1969; HALLEN-ADAMS et al. 2015; SUHR et al. 2016) nachgewiesen werden. Für diese Vertreter wird angenommen, dass sie die Fähigkeit besitzen, den Darm zu kolonisieren. Dieser ist jedoch nicht als primäres Habitat vorgesehen (HALLEN-ADAMS und SUHR 2017). Andere Pilze können in einzelnen individuellen Stichproben nachgewiesen werden (HALLEN-ADAMS und SUHR 2017). Meistens werden sie eher aus Umweltquellen bzw. Lebensmitteln eingetragen und besiedeln die Darmschleimhaut nur transient, denn ein Wachstum bei einer inneren Körpertemperatur von 37 °C ist nicht für alle Organismen möglich (HALLEN-ADAMS und SUHR 2017).

Die Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, gehört nicht zur autochthonen Darmflora. Sie wird aber als Probiotikum eingesetzt, da sie unter intestinalen Bedingungen temporär wächst und das mikrobielle Milieu beeinflusst (PALMA et al. 2016). Andere Arten wie *Penicillium* und *Debaryomyces* verfügen nicht über diese Fähigkeit (DESNOS-OLLIVEIR et al. 2008; BANJARA et al. 2015).

Im Gegensatz zu der bakteriellen Mikrobiota scheint das Mykobiom empfindlicher auf Umweltfaktoren zu reagieren (HALLEN-ADAMS und SUHR 2017).

2.1.2.5 Viren und Bakteriophagen

Viren gehören nicht zu den Lebewesen. Sie wurden in einer Arbeit von CANN et al. (2005) basierend auf DNA-Klondatenbanken mit 63 % anteilmäßig als größter Bestandteil der mikrobiellen Gemeinschaft in Pferdefäzes ermittelt. Bakteriophagen wiederum sind in diesen Zusammenhang interessant, da sie verschiedene Gruppen der Viren bilden und als Wirtszellen Bakterien oder Archaea spezifisch befallen (D'HERELLE 1917). Von der Art der befallenen Wirtszelle leitet sich ihre Taxonomie ab, was bedeutet das Coliphagen als Wirtszelle *E. coli*-Bakterien befallen.

Bakteriophagen wurden erstmalig 1970 im Inhalt des Blind- und Grimmdarmes des Pferdes (ALEXANDER et al. 1970) mittels Elektronenmikroskop dargestellt, nachdem bereits 1966 ADAMS et al. über Plaques-Assay-Verfahren Bakteriophagen im Panseninhalt von Rindern detektieren konnten und auch HOOGENRAAD et al. (1967) gleiches bei Schafen elektronenmikroskopisch bestätigten.

Nach derzeitigem Stand der Forschungen gibt es wenige und widersprüchliche Informationen zur Quantität von Bakteriophagen im Gastrointestinaltrakt. In der Arbeit von GOLOMIDOVA et al. (2007) wurden 10^{10} - 10^{11} /g Fäzes beim Pferd nachgewiesen; diese Angabe ist aber weiter nicht bestätigt worden. Die Ermittlung basiert hauptsächlich auf Zählungen von virusähnlichen Partikeln (VLP) mittels Fluoreszenzfarbstoffmarkierung und mikroskopischer Analyse. Im Pansensaft des Rindes lieferten Zählungen von freien Konzentrationen zwischen 10^7 - 10^8 VLP/ml (LETAROV und KULIKOV 2009), jedoch wurde festgestellt, dass durch Bindungen der VLP an Oberflächen, Bakterien sowie Nahrungsmittel eine effiziente Detektion nicht möglich war und somit die Anzahl der VLP unterschätzt worden sein könnten. Während in der Aquaristik gezählte VLP-Einheiten die Bakteriendichte stark übertreffen beispielsweise mit Bakterienzählungen im Bereich von 10^6 Zellen/ml und VLP-Zählungen in 10-facher Höhe (DE PAEPE et al. 2014), konnte Vergleichbares für den Verdauungstrakt bisher noch nicht gezeigt werden (DE PAEPE et al. 2014). Eine quantitative Analyse aus dem Darm von Mäusen berichtete von $2,0$ - $8,0 \times 10^9$ Phagen/g und damit einem 4-fachen Überschreiten der Bakteriendichte (BARR et al. 2013). Allerdings zeigten MAURA et al. (2012) in einem speziellen Experiment im Mausverdauungstrakt, in dem *E. coli*-Bakterien mit virulenten Phagen eliminiert werden sollten, dass die Phagendichte im Duodenum höher war als in den distalen Anteilen des Darmes, was vom physiologischen Vorkommen von *E. coli*-Bakterien in den Darmabschnitten abhängig sein könnte (MAURA et al. 2012).

In humanmedizinischen Studien wurde hingegen publiziert, dass die Quantität der VLP mengenmäßig der Bakteriendichte ähnelt. So zeigten KIM et al. (2011), basierend auf mikroskopischen Zählungen in Fäzes, ähnliche Mengen von $\approx 10^9$ Bakterien/g im Vergleich zu gefundenen VLP von $\approx 10^8$ - 10^9 VLP/g in Fäzes.

2.1.3 Funktion

2.1.3.1 Schutzbarriere

Mit der Kolonisation des Mikrobioms auf Schleimhäuten bei Neugeborenen beginnt die Kooperation zwischen den Mikro- und Makroorganismen. GÜNTHER und WAAIJ (1984) publizierten einen Artikel zur Kolonisationsresistenz im Verdauungstrakt. Sie beschrieben darin die Verhinderung der Besiedlung mit pathogenen Bakterien durch das anwesende kommensale Mikrobiom, welches der Mukusschicht des Darmepithels anhaftet. Wird die Darmbarriere durch

äußere Einflüsse wie antimikrobielle Therapien oder Zerstörung der Mukusschicht unterbrochen, wird eine Ansiedlung pathogener Keime begünstigt, so die Theorie.

Die Besiedlung der Mukusschicht des Darmepithels wurde von HANSSON und JOHANSSON (2010) bewiesen, die zeigten, dass ein wichtiger Zusammenhang zwischen dem Aufbau der Mukusschicht auf dem Darmepithel und der Anhaftung der Bakterien besteht und wie diese Interaktionen funktionieren.

Es fielen Differenzen in den Schleimschichtdicken der unterschiedlichen Abschnitte des Magen-Darmtraktes auf, wobei im Magen die höchste Schichtdicke zu finden war (MATSUO et al. 1997). Genauso wurde die Hydrophobizität an der Oberfläche der Muzinschicht untersucht. Diese unterstützt die Trennung von Schichten und hält wasserlösliche Substanzen wie z. B. Toxine von der Schleimschicht fern und ist im Bereich des Magens und Colons besonders ausgeprägt, während sie im Dünndarm aufgrund der Resorption von Nährstoffen geringer ist (TATSUMI et al. 1996).

Die Becherzellen des Dün- und Dickdarms produzieren u.a. das Mucin MUC2, welches aus diversen hochglykosylierten Glykoproteinen eine komplexe netzartige und verdichtete Struktur bildet. Dem Darmepithel ist diese Mukusschicht aus gefalteten und durch Disulfidbrücken verbundenen MUC2-Mucin-Proteinen aufgelagert und wird als innere Schicht bezeichnet. Die Regeneration der Mukusschicht erfolgt über die Becherzellen vom Epithel ausgehend nach luminal (JOHANSSON et al. 2013). Der inneren festen Schleimschicht liegt eine äußere lose Schicht aus Mukus an, die eine niedrigere Konzentration des MUC2-Glykoproteins enthält und bei der das MUC2-Netzwerk durch proteolytische Spaltung eher zu einem losen polymeren Netzwerk geformt ist (JOHANSSON et al. 2011; DE WEIRDT und VAN DE WIELE 2015). Auffallend war bei dieser Studie, dass die innere Mukusschicht fast bakterienfrei war und sich die kommensale Ansiedlung nur in der losen Schicht zeigte (JOHANSSON et al. 2008; HANSSON und JOHANSSON 2010; JOHANSSON et al. 2011). Im Vergleich konnte eine Studie von VELCICH et al. (2002) zeigen, dass in Mäusen, denen das Gen für MUC2-Mucin fehlte, es zur Ansiedlung von Bakterien direkt am Darmepithel kam. Diese Mäuse fielen mit Diarrhoe und Hämatochezie auf und waren anfällig für Darmkrebs (VELCICH et al. 2002). Das kommensale Mikrobiom befindet sich demnach luminal in der äußeren losen Schicht (HANSSON und JOHANSSON 2010; JOHANSSON et al. 2011). Von dort kann es durch proteolytische Aktivitäten sowie kohlenhydratabbauende Enzyme in die Muzinschicht eindringen und über Adhäsionsmoleküle Anheftung finden (HANSSON und JOHANSSON 2010). Gleichzeitig schafft die Besiedlung in der losen Mukusschicht eine weitere Schutzbarriere gegenüber pathogenen Bakterien (Kolonieresistenz).

Da die Mukusschicht kontinuierlich von den Becherzellen ausgehend (merokrine Exkretion) erneuert wird, ist ein Eindringen entgegen des Schichtstromes aus Glykoproteinen für Mikroorganismen auch nur schwer möglich (SWIDSINSKI et al. 2007b; TURNER 2009; BIRCHENOUGH et al. 2015).

Die Untersuchungen zu den Muzinschichten stützen sich größtenteils auf den Bereich des Grimmdarms, oral davon gelegene Strukturen wie das Caecum, aber auch der Dünndarm, fanden in bisherigen Untersuchungen durch ihre unterschiedliche Physiologie und Interaktion mit dem Darmmikrobiom gegenwärtig noch wenig Berücksichtigung. Es zeigte sich lediglich, dass die Schleimschicht im Bereich des Dünndarms diskontinuierlich und teilweise ungebunden vorhanden war, während das Colon eine kontinuierliche Schleimschicht auf den Epithelzellen besaß (DE WEIRDT und VAN DE WIELE 2015; BROWN et al. 2013; JOHANSSON et al. 2013).

Die Viskosität der Muzinschicht verlangt den sich ansiedelnden Bakterien besondere Fähigkeiten ab. Untersuchungen im Rattendarm zeigten, dass bei geringerer Viskosität kokkoide Bakterien eher Haftung an der Schleimschicht fanden wohingegen mit Zunehmen der Viskosität vermehrt stäbchenförmige Bakterien zu finden waren (SWIDSINSKI et al. 2007a). Weiterhin stellten Untersuchungen das Vermögen von Bakterien dar, die die Anbindung an die Schleimschicht über spezielle Werkzeuge wie Pili, Fimbrien oder Schleimbindungsproteine realisieren (JUGE 2012; VON OSSOWSKI et al. 2010; O'CONNELL MOTHERWAY et al. 2011). Letztere sind extrazelluläre Proteine mit denen Bakterien eine feste Bindung zu den Kohlenhydratketten der in der Schleimschicht befindlichen Glykoproteine schaffen (HUANG et al. 2011). Diese Eigenschaft ist vor allem für die Verwendung als Probiotika sehr interessant (DE WEIRDT und VAN DE WIELE 2015). Außerdem beschrieben DE WEIRDT und VAN DE WIELE (2015), dass starke Säuren die Viskosität der Muzinschicht durch die Erniedrigung der negativen Ladung der Sialinsäuren innerhalb der Disulfidbrückenbildung reduzieren (Abb. 1). Dies wurde von CANANI und TERRIN (2010) bestätigt. Zudem lassen hohe Calciumkonzentrationen die Schleimschicht kollabieren (RAYNAL et al. 2003). Welche Mechanismen genau zu Dysbalancen in diesem Konstrukt führen, ist noch weitgehend unverstanden. Weitere Bemühungen und Forschungsansätze besonders im humanmedizinischen Bereich lassen auf bald verfügbare Daten und Erkenntnisse hoffen, um auch Einflüsse von Zusatzstoffen in der Nahrung zu verstehen, die durch dauerhafte Konsumierung auf das Darmepithel und dessen Muzinschicht wirken.

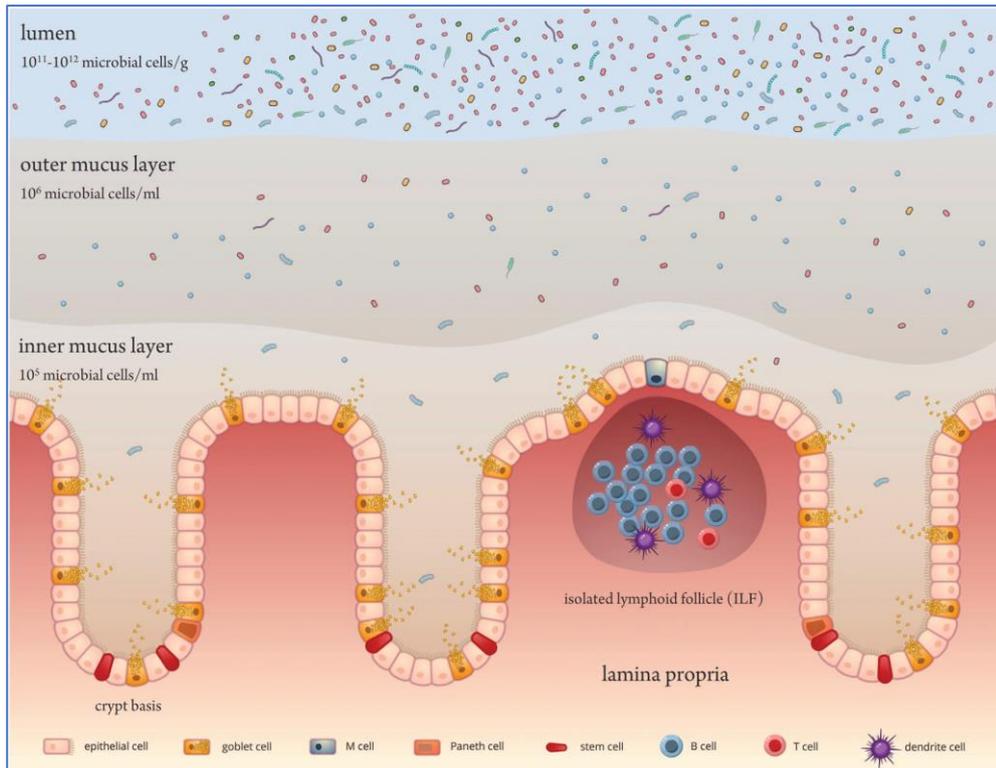


Abb. 1: Abbildung aus: DE WEIRDT und VAN DE WIELE (2015); Schematische Darstellung des Dickdarmepithels sowie der Überblick des verteilten luminalen Mikrobioms mit sechs dargestellten Faktoren, die die mikrobielle Besiedlung der Schleimhäute beeinflussen.

2.1.3.2 Antimikrobielle und antibakterielle Funktion

a) Biofilme

Vor allem aus dem wässrigen Milieu bekannt sind Biofilme, die als Schleimschichten mit eingebetteten Mikroorganismen (eine oder mehrere Arten) an Grenzflächen oder aneinander haften. Die Schleimmatrix wird von den Mikroorganismen über extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) produziert (COSTERTON 1995). Diese Biopolymere bestehen aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und extrazellulären Nukleinsäuren (DNA) und können in Verbindung mit Wasser stabile Hydrogele formen, in denen sich z.B. bakterielle Kolonien geschützt aufhalten (COSTERTON und LEWANDOWSKI 1995; PAULSEN et al. 1997; FLEMMING 1999). Aufgrund der bekannten hohen Anpassungsfähigkeit mikrobieller Lebewesen an verschiedenste Umweltbedingungen (FLEMMING 1994), sind Biofilmstrukturen auch im Bereich des Gastrointestinaltrakts, trotz pH-Schwankungen und der Einwirkung von Verdauungsenzymen möglich.

MACFARLANE et al. (2004) stellten mit Hilfe von mikroskopischen Untersuchungen die dreidimensionale Struktur von Biofilmen dar, die auf epithelialen Oberflächen des Kolons

gefunden wurden. Die Biofilmstruktur ist über der epithelialen Muzinschicht verteilt, aber nicht in den Krypten des gesunden Epithels vorhanden (MACFARLANE et al. 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass Bakterien meist in Mikrokolonien auftraten (MACFARLANE et al. 2004).

DE WEIRDT und VAN DE WIELE (2015) postulierten in ihrem Artikel „Dass es sich bei dem intestinalen Biofilm, speziell im Grimmdarm, nicht um einen Biofilm im klassischen Sinn handelt“. Sie beschrieben es eher als Struktur, die sich „als einzigartig an mukosalen Grenzflächen darstellt und mit dem aus Glykoproteinen aufgebauten polymeren Muzinnetzwerk verbindet“ (DE WEIRDT und VAN DE WIELE 2015) (Abb. 1).

STOODLEY et al. (2002) beschrieben in ihrer Arbeit den grundsätzlichen Aufbau und die Funktionsweise von Biofilmen als Reservoir mikrobieller Gemeinschaften. Der Aufbau, die Struktur und die Widerstandsfähigkeit waren abhängig von der Zell-Zell-Kommunikation, der Produktion von EPS, der Wachstumsrate und der Motilitätsfrequenz. Durch die kontinuierliche Nahrungsaufnahme ist der Gastrointestinaltrakt ein prädisponierter Raum für die Bildung von Biofilmen. Die Integration von unterschiedlichsten Arten von Mikroorganismen sorgt für die effektivere Realisierung von mehrstufigen Verdauungsprozessen (STOODLEY et al. 2002).

Medizinisch gesehen können Biofilme an Oberflächen auch schädlich sein (BROWN und WILLIAMS 1985). Sie limitieren bei infektiösen Erkrankungen die Heilungstendenz und können zu Wundheilungsstörungen etwa bei Bisswunden von Hund und Katze führen (ZAMBORI et al. 2012) oder Abstoßungsreaktionen kontaminierter Implantate hervorrufen (COSTERTON et al. 1981; DONLAN und COSTERTON 2002). Vor allem erlangten Biofilme in der Medizin größere Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit infektiösen Erkrankungen in der Mundhöhle (WHITTAKER et al. 1996; XIE et al. 2000) sowie der Atemwege (GOVAN und DERETIC 1996).

Durch die Anpassungsfähigkeit von Biofilmen stellen sie für Mikroorganismen eine effektivere Lebensform als der Einzelorganismus dar. Die Matrix schützt sie vor Schwankungen des pH-Wertes und osmotischen oder hydraulischen Schwankungen; darüberhinaus können sich extrazelluläre Enzyme für die Verwertung von Nährstoffen innerhalb dieser Matrix nicht schnell verflüchtigen und sind für alle lebenden Mikroorganismen innerhalb der Matrix nutzbar (FLEMMING 1999).

Die Wirkung antibakterieller Substanzen wird durch die Matrix gehemmt, wodurch die Mikrokolonien sehr gut davor abgeschirmt sind, was die Therapie mit Antibiotika oder Bakteriozinen deutlich erschwert (GILBERT et al. 1997). Die Mikrokolonien innerhalb der Matrix zeigen sogar koordinierte Abwehrmechanismen, was dazu führt, dass Antibiotika völlig wirkungslos sein können und die Gefahr der Resistenzbildung gegeben ist (PROSSER et al. 1987; MAIRA-LITRAN et al. 2000; MAH und O'TOOLE 2001).

b) *Antimikrobielle Peptide*

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind Oligo- oder Polypeptide, die von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen produziert werden und eine antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien, Pilze, Archaea, Protozoen und Viren entfalten.

Von Bakterien produzierte AMP werden als Bakteriozine bezeichnet, aber auch in komplexen Organismen bilden Phagozyten (Granulozyten) sowie mukosale Epithelzellen AMP zur Abwehr. Z.B. werden von Enterozyten und Paneth-Körnerzellen am Darmepithel Enzyme wie Defensine, Lysozym, Trypsin, Phospholipase A2 oder DNAsen exprimiert, die antimikrobiell wirken (SARKER und GYR 1992; OUELLETTE und BEVINS 2001). Es ist auch untersucht worden, dass die Muzinschicht AMP festhält, sodass sie sich nicht verflüchtigen (MEYER-HOFFERT et al. 2008) und dass im Bereich des Grimmdarms niedrigere Konzentrationen von AMP auftraten als im Dünndarm (WEHKAMP et al. 2006). Dies ist durch die vermehrte Anzahl der Paneth-Körnerzellen und die regulierenden Peyerschen Platten zu erklären (BROWN et al. 2013). Die Paneth-Körnerzellen befinden sich vor allem in den Krypten des Darmepithels, von denen die Regeneration des Epithels ausgeht (LÜLLMANN-RAUCH 2003, 2015). Die ausgeschütteten Defensine dienen der Abwehr innerhalb des Kryptenlumens, um eine möglichst sterile Umgebung für die Erneuerung des Epithels zu schaffen.

Bei an Morbus Crohn erkrankten Patienten konnte eine deutliche Erniedrigung der Produktion von Humane Defensine-5 (HD-5) nachgewiesen werden (WEHKAMP et al. 2005), wobei SIMMS et al. (2008) das allerdings in ihren Untersuchungen widerlegten. Sie postulierten, dass die niedrigere Produktion von Defensinen allein das Resultat des Untergangs von Epithelgewebe darstellt. Jedoch wiesen weitere Untersuchungen mit der Verwendung von Knock-out-Mäusen und *in vitro*-Studien nach, dass es doch einen genetischen Defekt in der Ligand-Kommunikation zwischen Paneth-Körnerzellen und den peripheren mononukleären Blutzellen geben könnte, welcher zu einer Minderproduktion von Defensinen führt (COURTH et al. 2015).

Neben der Stimulation über endogene Mediatoren kann die Induktion zur AMP-Ausschüttung auch über Toll-like-Rezeptoren (TLR) und Nucleotid-Oligomerizations-Domains (NOD) auf Epithelzellen oder Leukozyten erfolgen, die in direktem Kontakt mit Bakterien und speziell mit Flagellin kommen, welches an TLR binden kann (GEWIRTZ et al. 2001; SCHLEE et al. 2007).

c) *Bakteriozine*

Bakteriozine gehören zu den AMP und sind höher molekulare, ribosomal gebildete Peptide mit antimikrobiellen Wirkungen gegen eigene oder ähnliche Arten von Bakterien (RILEY und WERTZ 2002).

Hauptsächlich von grampositiven Bakterien und da speziell von Milchsäurebakterien gebildet, richten sich die meisten Bakteriozine gegen grampositive Bakterien, aber auch Breitbandwirkungen sind bekannt, die sich auch gegen gramnegative Bakterien richten können (CINTAS et al. 2011; NESS et al. 2014).

Die Klassifikationen der Bakteriozine ändert sich stetig. Auf vier Klassen konnte sich über chemische Eigenschaften sowie Hitzestabilität und Molekulargewicht bisher geeinigt werden. Die ersten beiden großen Klassen bilden die Lantibiotika (Klasse I) und die Nicht-Lantibiotika (Klasse II). Über die nachfolgenden Klassen herrscht noch Uneinigkeit, inwieweit die großen hitzelabilen Bakteriozine mit Molekulargewicht über 30 kDa eine Klasse bilden oder die bisher undefinierbaren Gruppen von Bakteriozinen ebenfalls eine Klasse darstellen können (REIS et al. 2012; NESS et al. 2014).

Das erste entdeckte und dementsprechend sehr ausgiebig studierte Bakteriozin ist Colizin. Colizinogene Stämme treten häufig in der Familie der *Enterobacteriaceae* auf (RILEY 2011), wie z.B. *E. coli*-Bakterien (RILEY 2011). Die bakteriozine Wirkung richtet sich besonders gegen einige verwandte Kolibakterien-Stämme (BRAUN et al. 1994; RILEY 2011). Die toxische Wirkungsweise ist bei den Colizinen verschieden (RILEY 2011). Einige Colizine können sich als porenbildende Ionenkanäle in die Zellmembran einbauen und darüber den Ionenaustausch manipulieren (RILEY und CHAVAN 2007). Anhand von Colizin I konnte gezeigt werden, dass sich das Peptid in die Zytoplasmamembran einbaut und das Zellinnere durch die Hemmung der ATP-Synthase an ATP verarmen lässt (BRAUN et al. 1994). Andere Colizine fungieren als Nucleasen, die die DNA bzw. RNA zerstören und damit zur Zellyse führen (RILEY und CHAVAN 2007).

Es konnte sogar gezeigt werden, dass Bakteriophagen Bakterienzellen zur Zellyse führen, um die Freisetzung von Colizin zu stimulieren und zu gebrauchen, damit Colizin wiederum die artgleiche Bakterienpopulation angreift (RILEY and CHAVAN 2007).

Nisin ist ein Bakteriozin, gebildet von *Lactococcus lactis* (*Streptococcus lactis*), welches mit Breitbandwirkung, jedoch nur gegenüber grampositiven Bakterien, wirkt. Nisin zählt zu den Lantibiotika, die als Peptid-Antibiotika nach der integrierten Aminosäure Lanthionin benannt sind (JAMES et al. 1991).

Bakteriozine können die Oberflächenrezeptoren an den Zellmembranen erkennen und darüber intrazellulär die Proteinsynthese hemmen bzw. die DNA im Zellkern destruieren und somit zur Zellyse führen (OUWEHAND und VESTERLUND 2004; RILEY 2011). Andere wirken durch das selektive Transportieren von Ionen durch die Zellmembran und verändern dadurch intrazelluläre Stoffwechselforgänge. Durch diese Fähigkeit werden sie auch als Ionophoren eingesetzt (SCHINK 2007).

Viele Milchsäurebakterien sind befähigt, Bakteriozine zu bilden. Reutericyclin ist ebenfalls ein bekanntes Bakteriozin, gebildet durch einige Stämme von *Lactobacillus reuteri*. Auch seine antimikrobielle Wirkung richtet sich vor allem gegen grampositive Bakterien, da die äußere Membran bei gramnegativen Bakterien als Barriere zu fungieren scheint (GÄNZLE et al. 2000).

d) *Bakteriophagen*

Bakteriophagen gelten als häufigstes infektiöses Agens in allen Lebensräumen (WHITMAN et al. 1998) mit einer Quote der Wirtsbesiedlung von 10:1 (WOMMACK et al. 1999). Sie besitzen die Fähigkeit, die Lyse und den Untergang von prokaryotischen Wirtszellen wie Bakterien und Archaea zu induzieren und sind daher bedeutend in der Modulation der Struktur und Funktion von bakteriellen Gemeinschaften (GORSKI et al. 2003; BRÜSSOW et al. 2004; ZHANG et al. 2006; ROHWER und THURBER 2009).

Seit jüngster Zeit gelten Bakteriophagen nicht ausschließlich als potentiell pathogen sondern zeigen in der Interaktion mit dem bakteriellen Mikrobiom bedeutende nützliche Eigenschaften in der Codierung von Merkmalen, die es den Bakterien erleichtern in der Umgebung zu überleben. Die Gemeinschaft wird stabilisiert, um die Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Störungen zu steigern (BARR et al. 2013; MODI et al. 2013; TIWARI et al. 2014; OGILVIE und JONES 2015). 2009 gründete sich eine internationale wissenschaftliche Organisation in Europa, mit dem Ziel neue Therapieansätze mit Bakteriophagen zu entwickeln (Phages for Human Applications Group Europe, www.p-h-a-g-e.org). In einem Artikel diskutiert BRÜSSOW (2017) über eine mögliche Phagen-Therapie als Ersatz der Antibiotika-Therapie.

Über den horizontalen Gentransfer schleusen Bakteriophagen Informationen in die prokaryotische Wirtszelle, die dadurch Fähigkeiten gewinnt, um sich an veränderte Lebensräume anzupassen. Die Energieaufnahme wird verbessert, um diese Informationen zu konservieren (PAEPE et al. 2014). Das trägt dazu bei, das Fortbestehen wichtiger Informationen zu sichern, wenn Populationen durch widrige äußere Umstände schrumpfen. Diese Überlebensstrategie in der Symbiose von Bakteriophagen und Bakterien wird auch als kritisch in der Bildung von Antibiotikaresistenzen angesehen (OGILVIE et al. 2013; PAEPE et al. 2014). Durch die Übermittlung von Genommaterial von einem Bakterium auf andere Bakterien wird zwangsläufig ein Resistenzreservoir in Bakteriophagen geschaffen (REYES et al. 2010; MINOT et al. 2011; MODI et al. 2013; OGILVIE et al. 2013).

Des Weiteren können einige Phagen im gemäßigten, ruhenden Zustand vorliegen, sie werden dann als Prophage bezeichnet (BOSSI et al. 2003; BROWN et al. 2006). Welche Mechanismen greifen, damit Prophagen vom gemäßigten in den virulenten Zustand wechseln, ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird angenommen, dass Temperaturänderung, oxidativer Stress und

DNA-Schäden, die das Hauptrepressorprotein der Prophage zerstören und den Eintritt in den lytischen Zyklus auslösen, Signale der Prophageninduktion sind (BOSSI et al. 2003). Es gibt aber Hinweise darauf, dass gewisse pathogene Bakterien Prophagen für ihren Zweck modulieren können, um die Anzahl an kommensalen Bakterien zu verringern und sich so eine bessere Position zur Kolonisierung zu verschaffen (ZHANG et al. 2000; MEESEN-PINARD et al. 2012). Andererseits ist auch die Stimulation der Produktion von giftigen Substanzen durch die Modulation der O-antigen-Komponente von Lipopolysacchariden (LPS) in Mikroorganismen wie *Salmonella*, *E. coli* sowie *Shigella* beschrieben worden (ZHANG et al. 2000). Aber auch umgekehrt haben einige Beispiele gezeigt, dass kommensale Bakterien in der Lage sind konkurrierende Mikroorganismen mit Hilfe von Bakteriophagen zu lysieren, um eine Dysbakteriose zu verhindern (BROWN et al. 2006; BARR et al. 2013). Eine signifikante Bestätigung der Existenz dieser Mechanismen fehlt aber bisher noch.

BARR et al. (2013) zeigten außerdem in einem *in vitro*-Versuch, dass Phagen mit Hilfe der Oberfläche der Schleimschicht eine antimikrobielle Verteidigungsbarriere schaffen können. Es wurde gezeigt, dass Phagen die Möglichkeit besitzen, sich mit Hilfe von Ig-like-Domänen an ihrer Oberfläche an das Netz aus Glykoproteinen der Schleimschicht zu heften und damit die Schleimhautkolonisation begrenzen sowie Wechselwirkungen mit Bakterien eingehen können (BARR et al. 2013). Die Studie von BARR et al. (2013) stellte gleichzeitig die Korrelation der Zunahme der Schichtdicke der Muzinschicht im Zusammenhang mit der Phagendichte dar. Die Phagendichte war im Vergleich zu nicht-mukosalen Oberflächen bzw. geringer mukosaler Schichtdicke signifikant reduziert (BARR et al. 2013).

Der einflussnehmende Faktor der Replikation wurde durch die modifizierte Abwesenheit von Wirtsbakterien ausgespart. Inwieweit die Abhängigkeit der Phagendichte von der Muzinschicht *in vivo* zutrifft, ist noch nicht gezeigt (BARR et al. 2013).

e) pH-Wert

Die Abschnitte des Gastrointestinaltrakts unterscheiden sich außer in ihrer Morphologie und Funktion auch durch den intraluminalen pH-Wert. Dieser wird durch das Milieu mit den sezernierten Enzymen sowie Puffern und Säuren beeinflusst (MEYER und COENEN 2014). Von oral beginnend herrscht je nach Spezies ein pH-Wert 5-6 im Mundraum, der im Bereich des Magens unter pH 3 in den stark sauren Bereich absinkt und erst im Dünndarm in den neutralen Bereich auf pH-Wert 7 ansteigt (ARGENZIO 1975; MEYER und COENEN 2014). Der intragastrale pH-Wert bei Pferden mit Heufütterung über 24 Stunden betrug im Median 2,69 (1,57 - 4,02) (DAMKE et al. 2015). Innerhalb des Dünndarms wurden pH-Werte von $8,0 \pm 0,1$ sowie $3,9 \pm 0,7$

(1h postprandial) und distal im Bereich des Caecums ein pH-Wert von $6,7 \pm 0,2$ gemessen, ähnlich dem Colon transversum mit einem pH-Wert von $6,5 \pm 0,3$ (GLATTER et al. 2016).

Aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Magen ist von einer spärlichen mikrobiellen Besiedlung auszugehen, wobei bisher auch nur wenige Mikroorganismen wie *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus spp.*, *Sarcina spp.* sowie *Streptococci spp.* in Konzentrationen von $10^1 - 10^3$ CFU/ml nachgewiesen wurden (HEPBURN 2004; COSTA et al. 2015a).

Untersuchungen bei Menschen mit Dysphagie, die über längere Zeit mit Ernährungssonden ernährt wurden, zeigten eine mikrobielle Überwucherung im Bereich des Magens und des proximalen Duodenums (CABRE und GASSULL 1993). Grund dafür können Effekte der pH-Modulation sowie antibiotische Resistenzen sein, wobei beobachtet wurde, dass besonders *E. coli*-Bakterien bei niedrigem pH-Wert sehr gut überleben können (O'MAY et al. 2005). Eigentlich müssten die eingedrungenen Protonen das Zytoplasma der *E. coli*-Bakterien ansäuern, welches über Verschiebungen der Stoffwechselfvorgänge dann zur Zelllyse führen würde. ILGÜ et al. (2016) erkannten jedoch den Mechanismus mit dem *E. coli*-Bakterien ihr Säure-Resistenz-System aufrechterhalten: Durch die Umwandlung von Aminosäuren wie L-Arginin in das Molekül Agmatin, welches an Protonen gebunden ist und über das Transportprotein AdiC ausgeschleust wird, sind *E. coli*-Bakterien in der Lage das Überleben im sauren Milieu zu sichern (ILGÜ et al. 2016).

Daneben können übermäßig aus der Nahrung anfallende Abbauprodukte und / oder deren verzögerter Abtransport aufgrund fehlender Peristaltik den physiologischen pH-Wert-Gradienten im Magen- und Darmtrakt verschieben. Dies wiederum begünstigt das Wachstum pathogener oder opportunistischer mikrobieller Arten wie z.B. das vermehrte Auftreten von Hefen wie *Candida spp.* (GOTTLIEB et al. 1994). Außerdem sinkt der pH-Wert mit vermehrtem Aufkommen von kurzkettigen Fettsäuren aus mikrobieller Fermentation (MOUNTZOURIS et al. 2002; O'MAY et al. 2005). Dahingegen führt die vermehrte proteolytische Spaltung von Aminen durch *Bacteroides spp.* oder *Clostridium spp.* durch das vermehrte Vorkommen von Ammoniak, Sulfiden sowie Phenol zum Anstieg des pH-Werts und damit zur Alkalisierung des intestinalen Milieus (MOUNTZOURIS et al. 2002).

Neben Bakterien sind alle anderen Mikroorganismen gleichermaßen pH-abhängig im Wachstum und Vorkommen, was bisher nur marginal untersucht wurde. Bakteriophagen beispielsweise zeigen eine besondere pH-Wert-Abhängigkeit und sind bei pH-Wert 5 - 9 besonders aktiv, wohingegen sie bei einem pH-Wert unter 3 und über 11 inaktiv vorliegen (KERBY et al. 1949).

f) Gallensäuren

Für die Verdauung von Nahrungsfetten emulgieren Gallensäuren die wasserunlöslichen Lipide zu Mizellen, so dass eine Resorption über das Darmepithel erfolgen kann. Anschließend werden 95 - 98 % der in das Duodenum sezernierten Gallensäuren im Ileum rückresorbiert und durchlaufen den enterohepatischen Kreislauf (RUSSEL 2003; RIDLON et al. 2005; HOFMANN 2009). Die verbleibenden 2 - 5 % der Gallensäuren werden mit dem Kot physiologisch ausgeschieden. Vorwiegend im Grimmdarm werden diese Gallensalze durch spezialisierte Bakterien konjugiert und die Aminosäuren Glycin und Taurin abgespalten (BEGLEY et al. 2005; RIDLON et al. 2005, 2016). Es handelt sich um auf 7 α -dehydroxylation-spezialisierte Bakterien, die die konjugierte Primär-Gallensäure zu Deoxycholsäure und Lithocholsäure umwandeln (RIDLON et al. 2005, 2016).

Es konnte gezeigt werden, dass mit Induktion einer AAD gleichzeitig eine Reduktion der Deoxycholsäure und Lithocholsäure vorlag (ANTUNES et al. 2011; THERIOT et al. 2014, 2016). Weitere Studien ergaben, dass Gallensäuren die Sporenreifung und das Wachstum von *C. difficile* beeinflussen können (WILSON et al. 1982; WILSON 1983). Die Auskeimung kann durch die unkonjugierten Metabolite der Gallensäure gehemmt werden. Deoxycholsäure und Lithocholsäure sind starke Inhibitoren von Sporenauswuchs (FRANCIS et al. 2013B; WEINGARDEN et al. 2015). Daher wird vermutet, dass bei einer Reduktion von Deoxycholsäure und Lithocholsäure die Ausreifung von Sporen positiv beeinflusst wird. Diese Vermutung unterstützen bisher jedoch nur *in vitro*-Untersuchungen (BUFFIE et al. 2014).

g) Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien sind bedeutend für eine antimikrobielle Wirkung im Darm. Sie produzieren über Fermentation von Kohlenhydraten Milchsäure neben Essigsäure, Propionsäure, Ethanol und Kohlendioxid (OUWEHAND und VESTERLUND 2004). Diese Mischung aus Säuren sorgt für einen synergistischen Effekt. Es fiel auf, dass schwache Säuren eine stärkere antimikrobielle Wirkung bei niedrigem pH-Wert erzeugen können (ROTH et al. 1993). Daher wird vermutet, dass durch die Milchsäure der pH-Wert temporär im Milieu absinkt und Essig- und Propionsäure so zu einer stärkeren antimikrobiellen Wirkung kommen. Das konnte auch in einer Hemmung der Wachstumsrate von *Salmonella spp.* gezeigt werden (VAN IMMERSEEL et al. 2006). Sowohl Essig- als auch Propionsäure besitzen eine stärkere antimikrobielle Aktivität als Milchsäure, was durch den höheren pKa im Vergleich zur Milchsäure erklärt werden kann (OUWEHAND und VESTERLUND 2004; ROTH und ETTLE 2005). Propionsäure verfügt über eine stärkere Wirkung gegen Hefen und Schimmelpilzen, aber auch Essigsäure ist ein starker Inhibitor (OUWEHAND und VESTERLUND 2004; PELAEZ et al. 2012). Die Milchsäurebakterien können darüber hinaus

in Anwesenheit von kleinen Mengen Sauerstoff Wasserstoffperoxid generieren, welches ebenfalls über die Hemmung des Glukosetransportes (Glykolyse) eine bakteriostatische Wirkung auf manche Bakterien entfalten kann (OUWEHAND und VESTERLUND 2004).

Außerdem beeinflusst die Bildung von Wasserstoffperoxid das Immunsystem des Wirtes über die Aktivierung und Induktion der vermehrten Transkription von Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ), welcher Einfluss auf Entzündungen und die Hämostase der Mukosa nimmt (VOLTAN et al. 2008).

Weiterhin ist gezeigt worden, dass durch Stämme von Milchsäurebakterien wie *Lb. plantarum* 299v die Synthese von MUC2 und MUC3 in HT-29-Zellen (Enterozyte-like Phenotype) gefördert wird bei gleichzeitiger Hemmung der Bindung von pathogenen *E. coli*-Stämmen wie E2348/69 (EPEC) (MACK et al. 1999). Auch bei *E. faecium* konnte eine Steigerung der MUC2-Bildung sowie eine Hemmung von *C. difficile* erreicht werden (PEDICORD et al. 2016). Darüberhinaus hemmen die Milchsäurebakterien über die Bildung von Stickstoff bzw. Stickstoffmonoxid das Bakterienwachstum (MORITA et al. 1997; XU und VERSTRAETE 2001; KARAHAN et al. 2005; IVEC et al. 2007). Außerdem sind einige Milchsäurebakterien mit Bakteriozinen ausgestattet (MARCO et al. 2007, 2009; RAFTIS et al. 2011). Da Milchsäurebakterien sowohl für die Lebensmittelherstellung als auch für die Anwendung als Probiotikum sehr bedeutend sind, konnten bereits sehr viele Informationen über ihren Einfluss und ihre Eigenschaften zusammengetragen werden (TURPIN et al. 2010; ARENA et al. 2017).

2.1.3.3 Metabolische Funktion

Der enzymatische Abbau von organischen Materialien wird beim Menschen und vielen Tierarten wie Hund und Katze hauptsächlich über körpereigene Verdauungsenzyme realisiert. Beim Pferd besitzt die mikrobielle Fermentation eine größere Bedeutung, sodass 60 - 70 % des Energieerhaltungsbedarfes aus der Energie aus mikrobiell erzeugten Fermentationsprodukten bereitgestellt werden (ARGENZIO et al. 1974, 1975; BERGMANN 1990).

Säugetiere mit herbivorer Ernährungsweise sind besonders auf Fermentationsprodukte angewiesen, da hauptsächlich organische Substanzen anfallen, die im oberen Verdauungstrakt nicht durch körpereigene Enzyme hydrolisiert werden können. Nur der untere Verdauungstrakt steht für die mikrobielle anaerobe Fermentation zur Verfügung. Zusammengefasst gehören zu diesen organischen Substanzen, die nicht durch körpereigene Enzyme verdaubar sind, Kohlenhydrate wie Zellulose, Hemizellulose, Pektin, Inulin, Lignin sowie resistente Stärke. Diese werden zu kurzkettigen, flüchtigen Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat sowie in geringerem Maße auch zu Succinat und Laktat abgebaut und zur Energieversorgung verschiedener Gewebe absorbiert (ARGENZIO 1974, 1975; CUMMINGS und MACFARLANE

1991). Das Aufkommen der unterschiedlichen, flüchtigen Fettsäuren variiert in Abhängigkeit von der aufgenommenen Futterart und -menge (MEYER und COENEN 2014). Jedoch stellen Acetat, Propionat und Butyrat mehr als 85 % der produzierten, kurzkettigen Fettsäuren dar (CUMMINGS und MACFARLANE 1991; TOPPING und CLIFTON 2001; HOOPER et al. 2002; MCMANUS et al. 2002; MACFARLANE und MACFARLANE 2003; WONG et al. 2006; ZOETENDAL und DEVOS 2014).

Die Resultate von GLATTER et al. (2016) zur Messung der Fermentationsprodukte beim Pferd pro Darmkompartiment bestätigten die höchsten Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren in den Anteilen des proximalen Colons, also des ventralen Colons, bei den Pferden der Kontrollgruppe. Überraschenderweise waren aber höhere Werte von Acetat und Butyrat im Bereich des Magens bei der Fütterung von Inulin gegenüber den Kontrollpferden mit einer geringgradigen Senkung des gastralen pH-Wertes messbar. In der präbiotischen Verwendung von Inulin gilt dies als Risikofaktor für Magenläsionen (GLATTER et al. 2016).

Während Acetat und Propionat eher als Energielieferant für Gehirn, Herz und Muskeln gelten, liefert Butyrat hauptsächlich die Energie für die Colonepithelzellen (ROEDIGER 1980, CUMMINGS et al. 1987, BERGMAN 1990, GILL und ROWLAND 2002, MONTAGNE et al. 2003, WONG et al. 2006). Außerdem unterstützt Butyrat die Regulation der Zellproliferation und -differenzierung, in dem es wachstumsfördernden Einfluss auf die Epithelzellen der Colonozyten hat, was sich besonders bei der Ausbildung des Darmepithels innerhalb der ontogenetischen Entwicklung vom Jungtier zum Adulten bemerkbar macht (CUMMINGS und MACFARLANE 1991). Auch wurden immunmodulatorische Eigenschaften nachgewiesen (ROEDIGER 1980; HAMER et al. 2008) sowie die Tendenz das Risiko von Darmkrebserkrankungen unter dem Einfluss von Butyrat zu senken (WILLIAMS et al. 2003).

Über die Erhöhung von Ballaststoffen und Kohlenhydratverbindungen wie Oligofruktose, Lactulose und Inulin in der Nahrungszufuhr kann intraluminal eine Erhöhung der Butyrat-Konzentration erreicht werden (TERADA et al. 1992; CAMPPELL et al. 1997). Ein Mangel an Butyrat bedeutet einen Mangel an Energie für die Darmepithelzellen und kann dadurch entzündliche Darmerkrankungen begünstigen (BARCENILLA et al. 2000, PRYDE et al. 2002, DUNCAN et al. 2007, LOUIS et al. 2010, BUI et al. 2014).

Bakterien des Clostridium-Clusters XIVa wie *Roseburia spp.*, *Eubacterium rectale* sowie zum Cluster IV gehörige Vertreter wie *Faecalibacterium spp.* gelten als typische Butyratlieferanten (BARCENILLA et al. 2000; PRYDE et al. 2002; DUNCAN et al. 2007; LOUIS et al. 2010; BUI et al. 2014). Auch *Lactobacillus spp.* und *Bifidobacterium spp.* sind in der Lage die Bildung von Butyrat zu steigern und werden über Probiotika zu diesem Zweck bereits therapeutisch eingesetzt (OUWEHAND et al. 2002). Acetat dient wiederum als Energiequelle für einige Butyrat-

produzierenden Bakterien (WONG et al. 2006; VIPPERLA und O'KEEFE 2012). Genauso fungiert Acetat als Ausgangstoff in der Lipogenese oder Cholesterinbiosynthese des Wirtsorganismus bei der Umwandlung zu Acetyl-Coenzym A. Auch Propionsäure unterstützt u.a. das Darmepithel mit Energie über den Zellstoffwechsel, in dem es über Oxalessigsäure und Pyruvat für die Glukoneogenese genutzt werden kann (MEYER und COENEN 2014).

Weiterhin sind modulatorische Eigenschaften von kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren über die Stimulation von neuroendokrinen Zellen im Darmepithel entdeckt worden, die wiederum über die Sezernierung von endogenen Botenstoffen die Insulinproduktion des Pankreas aktivieren bzw. die Bildung von Glukagon reduzieren (CANI und DELZENNE 2009; VRIEZE et al. 2012).

Neben flüchtigen Fettsäuren entstehen aus der Fermentation von Gerüststoffen der Polysaccharide Gase wie Wasserstoff, Kohlendioxid und Methan. Inwieweit die Methanogenese in der Energiegewinnung genutzt werden kann, bedarf noch genauerer Forschung. Prädominante Substrate in der Methanbildung sind Wasserstoff und Kohlendioxid, aber auch Acetat, die über hydrogenotrophe bzw. acetoklastische Methanogenese durch synthotrophe Mikroorganismen, vorrangig Archaea, zu Methan abgebaut werden (DEPPENMEIER 2002). JOBLIN (1999) zeigte in der Eliminierung von Protozoen aus dem System eine Reduzierung der Methanproduktion durch das Fehlen des Wasserstoffs, was beweist, dass Wasserstoff hauptsächlich durch Protozoen produziert wird. Gleichzeitig erfolgt eine Reduzierung von Archaea-Stämmen (JOBLIN 1999), denn Archaea sind über die acetoklastische Methanogenese auf Wasserstoff zur Energiegewinnung angewiesen (JOBLIN 1999). In einem weiteren Experiment wurden in einem Pansenökosystem durch Defaunation die Protozoen entfernt bzw. die Protozoenzahl gesenkt mit dem Ergebnis, dass sich die Methanproduktion ebenfalls je nach Ernährung um bis zu 50 % reduzierte (MARTIN et al. 2010). Das bestätigt die Abhängigkeit verschiedener Mikroorganismen untereinander und von den Gegebenheiten des intraluminalen Milieus. Es beweist, dass die Fermentationsprodukte sich mit dem intestinalen Mikrobiom im balancierten Zustand befinden. Abgesehen davon ist die Produktion von Methan bei monogastrischen Tieren im Vergleich zu Wiederkäuern wesentlich geringer. So produziert ein Pferd lediglich 80 Liter Methan pro Tag und eine 500 kg schwere Kuh etwa 230 Liter Methan pro Tag (JENSEN 1996).

Nahrungsfette gelangen physiologischerweise nicht in den Blind- und Grimmdarm, lediglich solche, die indirekt an Gallensäuren gebunden und für die Ausscheidung vorgesehen sind. Gallensalze können das mikrobielle Milieu stören, jedoch kommen mit Hydrolasen ausgestattete Bakterien vor, die Gallensalze dekonjugieren können (JONES et al. 2008, ZOETENDAL und DEVOS 2014).

Zur allgemeinen Energiebilanz tragen auch Futterproteine bei. Abgestorbene Bakterien, endogene Proteine sowie Harnstoff aus dem Stickstoffkreislauf sammeln sich in den distalen

Darmabschnitten an. Dort werden diese Proteine durch proteolytische Spaltung und Harnstoff durch bakterielle Urease zu Aminen, Ammoniak und Kohlendioxid gespalten und absorbiert (MEYER und COENEN 2014). Sie sind somit Teil der Energiebilanz, ihr Anteil daran fällt jedoch im Vergleich zu Kohlenhydraten bedeutend geringer aus (MACFARLANE et al. 1992).

Darüberhinaus gelten die anfallenden Endsubstanzen, wie z. B. Ammoniak, je nach Menge und Dauer der Exposition, auch als potentiell toxisch für Colonozyten (NOUSIAINEN 1991). Untersuchungen beim Schwein haben gezeigt, dass Ammoniak sich negativ auf die Villushöhe des Darmepithels auswirkt (NOUSIAINEN 1991) und beim Menschen die Stärke der Kolonschleimschicht bei gleichzeitigem Verlust der Barrierefunktion abnehmen lässt (TODEN et al. 2005, 2006).

Neben der Bereitstellung von Energie durch mikrobielle Fermentation unverdaulicher (durch körpereigenen Enzyme nicht spaltbarer) organischer Substanzen, tragen die Mikroorganismen auch wesentlich zur Vitaminsynthese (Vitamin K, Folsäure, Cobalamin, Riboflavin, Thiamin) bei. Auch sind sie an der Absorption von Calcium-, Magnesium- und Eisenionen beteiligt (ROLFE 1984; HOOPER und GORDON 2001; HOOPER et al. 2002; MARTENS et al. 2002).

2.1.3.4 Immunologische Funktion

Intestinale Mikroorganismen haben einen wesentlichen Einfluss auf das darmassoziierte lymphatische Gewebe (englisch GALT= gut-associated lymphoid tissue), welches einen sehr großen Teil des Immunsystem im Organismus repräsentiert.

Mit der Etablierung und Besiedelung des Gastrointestinaltrakts bei Neugeborenen beginnt die erste Konfrontation mit dem angeborenen Immunsystem. Die Permeabilität des Darmes ist bei Fohlen zu Beginn noch hoch, um die Resorption von Immunglobulinen, die über das Kolostrum aufgenommen werden, zu gewährleisten. Das Darmepithel leistet in den ersten Tagen eine extreme Proliferation. Sie führt dazu, dass sich ein intaktes Darmepithel ausbilden kann, welches gleichzeitig die resorptiven Aufgaben erfüllt (selektive Permeabilität) und als Barriere fungiert.

Die Schleimhautoberfläche ist durch die Nahrungsaufnahme und die Besiedlung mit Mikroorganismen im ständigen Kontakt zu Antigenen und körperfremdem Material. Mehrere immunologische Strukturen bieten der Schleimhautoberfläche dabei Schutz vor Invasion. Das Epithel des Darmes fungiert als wichtige organisierte Barriere an der Oberfläche der Schleimhaut, sie ist über Tight Junctions fest verbunden und die Enterozyten stehen für die Resorption von Nahrungsbestandteilen, Mineralien sowie Wasser zur Verfügung. Die Epithelzellen halten den immunologischen Informationsaustausch über das Sezernieren von Zytokinen und Chemokinen aufrecht, die die lymphoiden Epithelzellen ansprechen, die wiederum über Interleukine (IL-22) die Produktion von Defensinen stimulieren können (O'NEIL et al. 1999; ECKMANN 2005).

Die Paneth-Körnerzellen (siehe 2.1.3.2b Antimikrobielle Peptide) sind spezialisierte Drüsenzellen, die in den Krypten zwischen den Darmzotten lokalisiert sind. Sie befinden sich innerhalb des Darmepithels. Dort schützen sie über die Bildung und Sezernierung von antimikrobiell wirksamen Substanzen (merokrine Sekretion), wie Lysozym, Defensine, Peptidasen sowie Laktoferrin, die Stammzellen und die neugebildeten Epithelzellen (SARKER und GYR 1992; OUELLETTE und BEVINS 2001).

Aus der Region der Krypten heraus regeneriert sich das Darmepithel und stößt überalterte Epithelzellen an der Zottenspitze ab (Apoptose). Dem Darmepithel anliegend fungiert die Mukusschicht als zusätzliche Barriere (JOHANSSON et al. 2008), die zusätzlich antibakteriell wirksame Substanzen wie Defensine in der Mukusschicht konservieren kann (DUPONT et al. 2014).

In der Tela submucosa und Lamina propria sind weitere immunologisch wichtige Strukturen wie Ansammlungen von lymphoiden Follikeln, die sogenannten Peyersche Platten (Noduli lymphoidei aggregati) enthalten, die neben isolierten Lymphfollikeln im Bereich des Dünndarms besonders im Ileum vorkommen und als das eigentliche GALT bezeichnet werden. Innerhalb der Lymphfollikel der Peyerschen Platten befinden sich vor allem B-Lymphozyten, die sich nach Antigenpräsentation zu Plasmazellen ausdifferenzieren und Immunglobulin A (IgA) sezernieren sowie auch T-Lymphozyten. Damit es zur Antigenpräsentation kommen kann, befinden sich über den Peyerschen Platten zwischen den Enterozyten spezialisierte Epithelzellen wie die M-Zellen (englisch: microfold cells), die durch das Fehlen von Muzin und Mikrovilli an der Oberfläche befähigt sind, Antigene direkt zu kontaktieren. Von der Basis der M-Zellen werden die Antigene über dendritische Zellen entweder an die Peyerschen Platten weitergeleitet oder eigenständig von den dendritischen Zellen aufgenommen. Durch ihre filigranen Zellfortsätze erreichen sie paraepithelial die Oberfläche (JANEWAY 2002). Diese Antigene werden anschließend naiven T-Zellen präsentiert und eine T-Zell-abhängige Immunantwort eingeleitet. Ähnlich den dendritischen Zellen, können auch Makrophagen effektiv Antigene präsentieren. Im peripheren Raum der Lamina propria lagern zahlreiche Makrophagen, Lymphozyten und dendritische Zellen, die über Phagozytose und Antigenpräsentation einen wichtigen Beitrag zur adaptiven Mukosaabwehr im Darm leisten. Zeitgleich sorgen regulatorische T-Zellen sowie dendritische Zellen dafür, dass bei apathogenen Antigenen eine Toleranz der Abwehrmechanismen eingeleitet wird, anstatt Entzündungsprozesse auszulösen. Kommt es zur Plasmazelldifferenzierung sowie Ausschüttung von IgA, können die Enterozyten die Antikörper per Transzytose nach apikal transportieren und geben an die Oberfläche IgA-gekoppeltes Rezeptorprotein ab. Dadurch wird eine schnelle proteolytische Spaltung von IgA verhindert und eine Anreicherung in der

Muzinschicht ermöglicht (LÜLLMANN-RAUCH 2003, 2015). Immunglobuline haben eine hohe Antigenspezifität und neutralisieren über die Bindung Pathogene und Toxine.

Die kontinuierliche Anwesenheit von Mikroorganismen erschwert Untersuchungen zum Zusammenspiel von kommensalen Bakterien und der Darmimmunität. Es gibt Studien, in denen versucht wurde mit Hilfe von keimfreien Mäusen die IgA-Immunantwort abhängig von einer mikrobiellen Neukolonisation nachzuvollziehen, wobei eine dynamische Anpassung der spezifischen IgA-Bildung mit Zunahme der Kolonisation beobachtet wurde (HAPFELMEIER et al. 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen von IgA die proinflammatorischen Signalwege sowie die bakterielle Expression von Epitopen reduziert (PETERSON et al. 2007). Auch wurde im Tierexperiment festgestellt, dass unter keimfreien Bedingungen keine intestinalen Entzündungen *per se* entstehen und vermutlich die kommensale Darmflora auch Darmentzündungen stimulieren kann (HEIMESAAT et al. 2006).

Das intestinale mukosale Immunsystem ist im gesunden Zustand im Gleichgewicht zwischen Toleranz und Immunität. Die Mechanismen zur Toleranz trotz des ständigen Antigenkontaktes aus kommensaler Flora und Nahrungsantigenen sind Gegenstand gegenwärtiger Forschung. QIAO et al. (1991) beobachteten, dass T-Zellen der Lamina propria schwieriger über T-Zellrezeptoren zu stimulieren waren und dort außerdem eine vergleichsweise höhere Apoptoserate als im peripheren Immunsystem festzustellen war (BOIRIVANT et al. 1996). Darüberhinaus wird eine dominierende antiinflammatorische Sezernierung von Chemokinen wie IL-10 und TGF- β von regulatorischen T-Zellen und Epithelzellen, die die Aktivierung von Makrophagen und anderen T-Zellen hemmen, vermutet (TARGAN et al. 1995; BRAUNSTEIN et al. 1997). Über die Spezifität der Antigenerkennung in der humoralen Immunantwort wird weiterhin selektiv auf pathogene Keime reagiert (DUPONT et al. 2014).

2.2 Das equine Mikrobiom

Mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden wurden als dominierende Bakterienstämme *Firmicutes* und *Bacteroidetes* als sowohl intestinal als auch in Fäzes beim Pferd nachgewiesen (DALY et al. 2001; SHEPHARD et al. 2012; STEELMANN et al. 2012; DOUGAL et al. 2013; MOREAU et al. 2014; HANSEN et al. 2015; PROUDMAN et al. 2015; COSTA et al. 2015a). Diese Ergebnisse ähneln den Untersuchungen bei anderen Säugetieren (ECKBURG et al. 2005; GILL et al. 2006; XENOULIS et al. 2008; OLIVEIRA et al. 2013; WANG et al. 2017), wobei ausschließlich die Phylum *Firmicutes* konstant sowohl intestinal als auch in Fäzes mit prozentual deutlichem Abstand zu nachfolgenden Stämmen auffindbar war. In den Untersuchungen von DOUGAL et al. (2014) waren in Fäzes durchschnittlich *Firmicutes* mit 45 %, *Bacteroidetes* mit 37 % und mit 0,5 - 3,5 % weitere Stämme bestehend aus *Proteobacteria*, *Spirochaetae* und *Actinobacteria* messbar.

Intestinal im Colon des Pferdes konnten *Firmicutes* mit 46 % und *Bacteroidetes* mit 43 % und im Ileum *Firmicutes* mit 70 %, *Proteobacteria* mit 14 % sowie *Bacteroidetes* mit 10 % aus 10 darmgesunden Pferden nachgewiesen werden (DOUGAL et al. 2013). Der *Firmicutes*-Stamm dominierte auch in den Ergebnissen von COSTA et al. (2015a) mit über 40 % in allen Darmabschnitten der untersuchten Pferde. Auf unterer Taxonomieebene variieren allerdings die Ergebnisse unter den verschiedenen Autoren.

Innerhalb des Phylum *Firmicutes* ist die Klasse *Clostridia* in der ermittelten bakteriellen Population überdurchschnittlich häufig (COSTA et al. 2015a). Generell gelten die Anaerobier als maßgebliche Vertreter der intestinalen mikrobiellen Gemeinschaft (SCHOSTER et al. 2013; SADETBOURGETEAU et al. 2014; DOUGAL et al. 2014; COSTA et al. 2015a; JULLIAND und GRIMM 2016).

Im Fütterungsversuch von DE FOMBELLE et al. (2003) wurden u.a. Konzentrationen von Anaerobiern in diversen Lokalisationen des Pferdedarmes bestimmt. Dabei ergab sich eine durchschnittliche Konzentration der Anaerobier von $7,4 \times 10^7$ - $3,7 \times 10^9$ CFU/ml in jedem Segment (DE FOMBELLE et al. 2003), wobei anteilig davon niedrigere Bakterienkonzentrationen der Anaerobier im großen Colon im Vergleich zum Caecum des Pferdes unabhängig von der Futtermittelration zu messen waren (DE FOMBELLE et al. 2003).

Zellulolytische Bakterien, die besonders für die Verwertung von Rohfaserbestandteilen zuständig sind, wurden separat mit Konzentrationen von $5,9 \times 10^4$ - $1,6 \times 10^6$ CFU/ml im Bereich des Grimmdarms sowie $3,0 \times 10^2$ CFU/ml präzäkal erfasst (DE FOMBELLE et al. 2003). Wichtige Vertreter sind *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* und *Ruminococcus albus* (HASTIE et al. 2008), die auch schon im Pansen nachgewiesen wurden (HUNGATE 1966; WEIMER 1996). Eine quantitative Prädominanz von zellulolytischen Bakterien hatte sich bisher nicht bestätigt (JULLIAND et al. 1999; HASTIE et al. 2008; JULLIAND und GRIMM 2016). Dennoch wird diskutiert, ob Veränderungen in Qualität und Quantität von zellulolytischen Bakterien Milieuveränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft primär anzeigen können (DOUGAL et al. 2013; JULLIAND und GRIMM 2016).

Als butyratbildende Bakterien gelten Familien aus der Klasse der *Clostridia* wie die Familien *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* (DOUGAL et al. 2014; COSTA et al. 2015a) sowie *Prevotellaceae* und *Fibrobacteraceae* (DOUGAL et al. 2014).

Die Konzentrationen von *Lactobacillus spp.* und *Streptococcus spp.* waren in der Untersuchung von DE FOMBELLE et al. (2003) geringer und besonders stark von der Rationszusammenstellung abhängig. Für die Laktobazilli waren die Konzentrationen im Pferdemaagen am höchsten. Die Konzentrationen von *Streptococcus spp.* waren über den Gastrointestinaltrakt gleichmäßig verteilt. Die Konzentrationen von Milchsäurebakterien waren ebenfalls abhängig von der anatomischen

Lokalisation, wobei die höchsten Messergebnisse im Magen ermittelt wurden (DE FOMBELLE et al. 2003).

Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms, vorzugsweise auf unterer Taxonomie-Ebene, hängen von einflussnehmenden Faktoren wie der Fütterungsration, dem Alter der Pferde sowie der methodischen Auswertung der Testergebnisse ab. So zeigten Tierfütterungsversuche mit gleichzeitiger mikrobieller Analyse von Fäzes oder Ingesta aus Darmsegmenten Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung bei verschiedenen Rationen (KERN et al. 1973; WILLING et al. 2009; BIDDLE et al. 2013; DOUGAL et al. 2014; FERNANDES et al. 2014; MURRAY et al. 2014; HARLOW et al. 2015; HANSEN et al. 2015; VENABLE et al. 2017) bzw. in Abhängigkeit vom Alter der Pferde (DOUGAL et al. 2014; COSTA et al. 2016; SCHOSTER et al. 2017).

Bezüglich der Qualität und Quantität von anderen mikrobiellen Organismen und ihrer funktionellen Bedeutung in der kommensalen Flora ist noch nicht viel bekannt.

Protozoen, Archaea und anaerobe Pilze ließen sich sowohl in Caecum, rechtem dorsalen Colon sowie Fäzes des Pferdes nachweisen (DOUGAL et al. 2012), wobei die Konzentrationen von Protozoen und methanogenen Archaeen im rechten dorsalen Colon signifikant höher lagen als im Caecum oder in Fäzes (DOUGAL et al. 2012).

ORPIN (1981) konnte bei der Untersuchung auf anaerobe Pilze drei verschiedene Isolate von Phycomycetenpilzen sowie die Spezies *Piromyces citronii* aus dem Blinddarm des Pferdes isolieren. DOUGAL et al. (2012) zeigten in ihrer Untersuchung, dass in allen untersuchten Regionen (Caecum, rechtes dorsales Colon, Fäzes) anaerobe Pilze über q-PCR nachgewiesen werden konnten, es bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Lokalisationen. Aus dem Caecuminhalt des Pferdes konnten Konzentrationen für anaerobe Pilze von 10^2 - 10^3 /ml bestimmt werden (ORPIN 1981; JULLIAND et al. 1999).

2.2.1 Unterschiede des Mikrobioms innerhalb verschiedener Kompartimente

Der voluminöse Gastrointestinaltrakt des Pferdes wird in Studien zur Fermentation und mikrobiellen Besiedlung in seine verschiedenen Kompartimente wie den einhöhligen Magen, Dünndarmabschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum), das Caecum, großes Colon (*Colon ascendens*), kleines Colon (*Colon descendens*) und das Rektum differenziert. Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota zwischen den Segmenten in zahlreichen Untersuchungen wurden festgestellt (DE FOMBELLE et al. 2003; HASTIE et al. 2008; SADET-BOURGETEAU and JULLIAND 2010; DOUGAL et al. 2011; DOUGAL et al. 2012; COSTA et al. 2012; SCHOSTER et al. 2013; DOUGAL et al. 2013; DOUGAL et al. 2014; FERNANDES et al. 2014; COSTA et al. 2015a; HANSEN et al. 2015; PHILIPPEAU et al. 2015; HARLOW et al. 2016; COSTA et al. 2016).

MACKIE und WILKINS (1988) überprüften die totale kultivierbare Bakterienkonzentration in den verschiedenen Segmenten des Verdauungstraktes des Pferdes und kamen für das Duodenum mit $2,0 \times 10^6$ CFU/g, das Jejunum mit $29,0 \times 10^6$ CFU/g sowie das Ileum mit $38,4 \times 10^6$ CFU/g zu deutlich niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zum Caecum mit $25,9 \times 10^8$ CFU/g und Colon mit $6,1 \times 10^8$ CFU/g.

Als wahrscheinliche Gründe für diese Diversität werden Milieugegebenheiten wie pH-Wert, Fließgeschwindigkeiten der Ingesta, Anatomie sowie selektive Drücke diskutiert (CAMP et al. 2009). Jedoch widersprechen sich auch die Studienergebnisse der einzelnen Autoren. Beispielweise sind Ähnlichkeiten in der Zusammensetzung und Menge zwischen Caecum und rechtem ventralen Colon festgestellt worden (DALY et al. 2001; DE FOMBELLE et al. 2003; SCHOSTER et al. 2013). Ebenso wurden Übereinstimmungen zwischen Proben aus dem rechten dorsalen Colon und Fäzes gefunden, die jedoch von den Ergebnissen des Caecums abweichen (HASTIE et al. 2008; SADET-BOURGETEAU et al. 2011; DOUGAL et al. 2012, 2013). DE FOMBELLE et al. (2003), FAUBLADIER et al. (2006), MÜLLER et al. (2008) sowie SCHOSTER et al. (2013) konnten keine Diversitätsveränderungen von Proben aus dem rechten ventralen Colon zu Proben aus der Beckenflexur (Flexura pelvina des Colon ascendens) erkennen. Als mögliche Ursachen für diese widersprüchlichen Ergebnisse werden verschiedene Analysetechniken gleichermaßen diskutiert wie die angewendeten Konservierungsmethoden der Proben (HASTIE et al. 2008). Auch weitere Faktoren wie Futteraufnahme, Alter und individuelle Unterschiede zwischen den Pferden können Einfluss genommen haben. Diese Aspekte werden vor allem hinsichtlich der Frage diskutiert, ob aus einer Beprobung der Fäzes Rückschlüsse auf Veränderungen der intestinalen mikrobiellen Zusammensetzung im gesamten Darm gezogen werden dürfen. Auch da gibt es keine konsistente Meinung der Autorenschaft, denn obwohl Konzentrationen von beispielsweise Anaerobiern sowie Milchsäurebakterien in Fäzes höher als im rechten ventralen Dickdarm zu messen waren (DE FOMBELLE et al. 2003; MÜLLER et al. 2008), zeigten andere Untersuchung stimmige Ergebnisse zwischen Proben aus Colon und Fäzes (HASTIE et al. 2008; DOUGAL et al. 2012).

2.3 Einflussfaktoren

Die kommensale Darmflora unterliegt Schwankungen beeinflusst durch Nahrungsaufnahme, Lebensalter sowie Individualität der mikrobiellen Zusammensetzung (BERG 1996; MARTEAU et al. 2001; MUELLER et al. 2006; ANDERRSON et al. 2008). Verschiedene Auswertungen der bakteriellen Diversität sowohl in Fäzes (BLACKMORE et al. 2013; O'DONNELL et al. 2013) als auch in Ingesta aus verschiedenen Darmsegmenten vom Pferd (DALY et al. 2001; DOUGAL et al. 2012, 2013; SCHOSTER et al. 2013; SADET-BOURGETEAU et al. 2014; COSTA et al. 2015a)

bestätigten diverse Unterschiede innerhalb der qualitativen bakteriellen Zusammensetzung durch interindividuelle Varianz.

Die unterschiedlichen Analysemethoden wie die kulturbasierte Technik (MACKIE and WILKINS 1988; DE FOMBELLE et al. 2003), PCR mit Temperaturgradientengelelektrophorese (FAUBLADIER et al. 2006), RT-PCR mit Gelelektrophoreseanalysen (GRØNVOLD et al. 2010), molekulare Fingerprint-Techniken (TRFLP) (DOUGAL et al. 2012; BLACKMORE et al. 2013; SCHOSTER et al. 2013) und die „Next Generation“- Technik mit Hochdurchsatzsequenzierung mit DNA-Sequenzierung (COSTA et al. 2012; DOUGAL et al. 2013; O'DONNELL et al. 2013; COSTA et al. 2015a) konnten diese individuell abweichenden Erscheinungen in der Zusammensetzung ebenfalls darstellen.

Diese Unterschiede betreffen vor allem die unteren Ebenen der Taxonomie, da Bakterienstamm und -klasse meist nicht davon betroffen sind. Auf der Suche nach einflussnehmenden Veränderungen der intestinalen Mikrobiota und der Vertreter einer gesunden autochthonen Darmflora beim Pferd, stellten sich bestimmte Bakterienarten dar, für die eine Schlüsselfunktion vermutet wird (DOUGAL et al. 2014; JULLIAND und GRIMM 2016; VENABLE et al. 2017). Genauere Funktionen dieser Bakterien sind noch unklar. Erstrebenswert wäre eine primär anzeigende Funktion bei Veränderungen dieser Bakterien, damit perspektivisch Verfahren zur Frühdiagnostik von Veränderungen in der autochthonen Darmflora und therapeutische Ansätze zu deren Unterstützung entwickelt werden könnten.

2.3.1 Fütterung

Für die kontinuierliche Nahrungsaufnahme von Pferden ist Grobfutter (Grünfutter, Silage, Heulage, Heu und Stroh) von essentieller Bedeutung. Der equine Verdauungstrakt ist für die Verwertung von Gerüstkohlenhydraten ausgelegt. Was über körpereigene Verdauungsenzyme nicht abgebaut werden kann, wird über mikrobielle Fermentation für den Organismus nutzbar gemacht. Ändert sich die Substrataufnahme, ist eine reaktive Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung der autochthonen Darmflora notwendig.

Eine Prädominanz von zellulolytischen (fibrolytischen) Bakterien war beim Pferd jedoch nicht feststellbar (JULLIAND et al. 1999; DE FOMBELLE et al. 2003, HASTIE et al. 2008). Mit Veränderungen der mikrobiellen Zusammensetzung in Abhängigkeiten verschiedener Futterrationen wurden bereits einige Tierfütterungsstudien beim Pferd durchgeführt (BIDDLE et al. 2013; MOREAU et al. 2014; MURRAY et al. 2014; PHILLIPEAU et al. 2014; DOUGAL et al. 2014; FERNANDES et al. 2014; HANSEN et al. 2015; HARLOW et al. 2015; VENABLE et al. 2017). So beeinflussen energiereiche Rationen die strukturelle Kohlenhydratverdauung im Bereich der distalen Darmabschnitte (VARLOUD et al. 2004), aber auch im Magen war bereits überwiegend

viel Marker für die scheinbare Verdaulichkeit durch pelletiertes Futter messbar (VARLOUD et al. 2004).

Bei plötzlicher Fütterungsumstellung war eine schnelle Anpassung der bakteriellen Mikrobiota festzustellen (FERNANDES et al. 2014). Dabei bekamen die Pferde zunächst ausschließlich eine aus Getreide bestehende Ration gefüttert und wurden dann auf die Weide gebracht. Nach vier Tagen hatte sich bei diesen Pferden das bakterielle Spektrum in der Analyse von Fäzes dem bakteriellen Spektrum der Kontrolltiere auf der Weide angepasst (FERNANDES et al. 2014).

RESPONDEK et al. (2008a) untersuchten die Veränderungen der intestinalen Mikrobiota bei erhöhtem Stärkeeintrag durch die Nahrung, wobei es bei erhöhter Gabe eines Gerstengemisches zur intestinalen Erhöhung der Anaerobier, Laktobazillen, Streptokokken sowie Milchsäurebakterien im Bereich des Blind- und Grimmdarms kam. Dieser Effekt war bei zusätzlicher Gabe eines präbiotischen Futtermittels, bestehend aus Oligosacchariden, nicht feststellbar, da keine Erhöhung von Laktobazillen und Streptokokken in den Ingestaprobieren erfolgte (RESPONDEK et al. 2008a). MOREAU et al. (2014) konnten diese Ergebnisse unterstützen, indem sich nach der Transplantation eines Stärkegemisches direkt ins Caecum ebenfalls die Konzentration von *Lactobacillus spp.* sowie *Streptococcus spp.* erhöhten.

Ein weiteres Forschungsfeld bilden Untersuchungen zu Veränderungen der autochthonen Darmflora bei Pferden mit fütterungsbedingter Hufrehe oder Induktion dieser Erkrankung über einen vermehrten Stärkeeintrag vergleichend mit prä- und probiotischen Substanzen, die in der Lage sind die Entwicklung einer Azidose innerhalb des Blind- und Grimmdarms zu hemmen (WILLING et al. 2009; BIDDLE et al. 2013; HANSEN et al. 2015).

Die Ergebnisse dieser Fütterungsstudien sind teilweise widersprüchlich bezüglich der Veränderung der Mikrobiota in Bezug auf deren Quantität und Qualität. Daher wird eine einheitliche und systematische Gestaltung von Fütterungsversuchen bezüglich Studiendesign, Versuchstieren, Zeitabläufen und Methodik für zukünftige Untersuchungen gefordert (VENABLE et al. 2017).

Die Fermentation von Gerüstkohlenhydraten, die durch körpereigene Enzyme nicht abgebaut werden können, wird durch die mikrobielle Besiedlung beeinflusst. Die vermehrte Bildung von mikrobiell flüchtigen Fettsäuren ist neben der Fütterung besonders von der Anwesenheit bestimmter Mikroorganismen abhängig. Acetat wird beispielsweise bei vermehrter Aufnahme von Zellulose produziert, während über Oligosaccharide oder Pektine die Bildung von Butyrat gefördert wird. Vertreter der Klasse der *Clostridia* z. B. die Familien *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* (DOUGAL et al. 2014; COSTA et al. 2015a) sowie *Prevotellaceae* und *Fibrobacteraceae* (DOUGAL et al. 2014) gelten als Förderer der Butyratbildung. Somit können diese Bakterien Colonozyten indirekt regenerierend, wachstumsfördernd sowie immunmodulatorisch

beeinflussen (VERNIA et al. 2003; KUMAR et al. 2009) und den Darmepithelzellen besonders als Energielieferanten dienen (ROEDIGER 1980; CUMMINGS and ENGLYST 1987; HAMER et al. 2008).

2.3.2 Alter

Bezüglich der Veränderungen der autochthonen Darmflora in verschiedenen Altersgruppen beim Pferd sind bisher lediglich Fohlen intensiver untersucht worden. Mit der Neubesiedlung des Gastrointestinaltrakts bis zur Etablierung finden mehrere Wechsel der Mikroorganismen statt, die verdrängt werden oder kein Habitat mehr nutzen können. In Mekonium und Fäzes wurden nach der Geburt besonders Umweltkeime und Vertreter der mütterlichen Mikrobiota gemessen (JULLIAND et al. 1996). Außerdem ist der Anteil aerober und fakultativ anaerober Mikroorganismen im Vergleich zu Adulten erhöht (SAKAITANI et al. 1999, YUYAMA 2004). Je älter die Fohlen wurden, desto mehr Anaerobier waren nachzuweisen (SAKAITANI et al. 1999, YUYAMA 2004). In Kotproben einiger Tage alter Fohlen wurden *Clostridia*, *Enterococci*, *Enterbacteriaceae*, *Lactobacilli*, *Streptococci* und *Staphylococci* gefunden.

In einer Prävalenzstudie konnte der Nachweis von *C. difficile* bei 30 % der gesunden normalen Fohlen unter 13 Lebenstagen erbracht werden (BAVERUD et al. 2003). Bei älteren Fohlen zwischen einem und sechs Monaten waren allerdings die Befunde wieder negativ für *C. difficile* (BAVERUD et al. 2003).

Sowohl *C. perfringens* als auch *C. difficile* wurden von JULLIAND et al. (1996) in Fäzes von wenige Tage alten Fohlen ohne pathologische Wirkung identifiziert.

DOUGAL et al. (2014) fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass es bei älteren Equiden zu einer auffälligen Abnahme der bakteriellen Diversität innerhalb des via DNA-Sequenzierung ermittelten Spektrums der Mikrobiota kam. Zwar war keine bakterielle Spezies signifikant reduziert, es konnte jedoch eine signifikante Abnahme des Artenreichtums, übereinstimmend mit humanmedizinischen Untersuchungen (HOPKINS et al. 2002; BIAGI et al. 2010), festgestellt werden (DOUGAL et al. 2014). Die Gründe dafür sind noch spekulativ, doch möglicherweise könnten langsamere Fließgeschwindigkeiten und die damit verbundene stärkere Füllung des Darmtraktes die Abnahme erklären (DOUGAL et al. 2014).

2.3.3 Medikamente

Inwieweit Medikamente direkten Einfluss auf die intestinale mikrobielle Besiedlung nehmen, ist bisher nicht hinreichend erforscht. Medikamente, die auf das enterale Nervensystem oder auf die Stimulation von Becherzellen wirken, könnten indirekt Einfluss auf die Darmflora nehmen.

Einen direkten Einfluss auf die intestinale Mikrobiota haben höchstwahrscheinlich Antibiotika, jedoch ist der Kenntnisstand zur Auswirkung unterschiedlicher Antibiotika auf die Darmflora noch sehr lückenhaft. Jedes Antibiotikum, das in der Pferdepraxis genutzt wird, birgt ein potentiell Risiko für das Auslösen einer AAD (BARR et al. 2013). Weiterhin sind prokinetische Effekte von bestimmten Antibiotika beschrieben worden (ROUSSEL et al. 2003; MCGORUM und PIRIE 2009).

Beispielsweise können Erythromycin und Azithromycin eine Steigerung der Defäkationsrate bewirken (ROUSSEL et al. 2003; BROAD und SANGER 2013). Auch nach der Applikation von Kaliumpenicillin wurden Erhöhungen der myoelektrischen Aktivität im Bereich der Beckenflexur gemessen (ROUSSEL et al. 2003). Des Weiteren führen Erythromycin sowie Azithromycin konzentrationsabhängig zu einem intrazellulären Calciumanstieg und damit zur vermehrten Expression des Motilinrezeptors, die zu einer prokinetischen Aktivität des Magens führt (BROAD und SANGER 2013).

Aminoglykoside stehen im Verdacht, die Toxinproduktion von enterischen Pathogenen direkt zu stimulieren und damit zu einer AAD beizutragen (VILEI et al. 2005).

Generell wird unter antibiotischem Einfluss eine Förderung von enteropathogen Keimen als auslösende Faktoren vermutet (MCGORUM und PIRIE 2009). Überempfindlichkeits- und Toxizitätsreaktionen auf antimikrobielle Wirkstoffe scheinen eher unwahrscheinliche Ursachen für AAD zu sein (HÖGENAUER et al. 1998).

2.4 Störungen der intestinalen Mikrobiota

2.4.1 Dysbiose

Eine Dysbiose ist eine Destabilisierung der autochthonen intestinalen Mikrobiota (SHI et al. 2017). Es entsteht entweder ein Ungleichgewicht zwischen kommensalen und opportunistischen Bakterien oder es entwickelt sich eine Verschiebung mit Verdrängung von mehreren kommensalen Bakterien durch Überwucherung einzelner Spezies. Diese können als klinisches Merkmal Diarrhoe bzw. Kotveränderungen mit gleichzeitiger Hyperaktivität der Motilität und erhöhten Fließgeschwindigkeiten hervorrufen. Der Begriff Dysbakteriose ist diesbezüglich nicht ganz korrekt, da vermutlich auch andere Mikroorganismen neben den Bakterien, wie beispielsweise Hefen oder Pilze beeinflusst werden.

Generell beschreibt die Dysbiose lediglich die Milieuveränderungen und die dadurch hervorgerufene Konsistenzänderung der Fäzes. Primäre pathologische Organveränderungen werden nicht in diesem Zusammenhang gesehen. Pferde mit einer reinen Dysbiose zeigen zumeist ein ungestörtes Allgemeinverhalten. Es sind keine konkreten auslösenden Ursachen bekannt. Vermutet wird eine einseitige Nahrungsaufnahme, die eine Vermehrung von gewissen

mikrobiellen Spezies im Darm fördert oder ein vermehrter Eintrag von einzelnen Mikroorganismen über die Nahrung sowie pH-Wert-Verschiebungen oder andere Organerkrankungen, die das Darmmilieu sekundär beeinflussen. Dennoch sind bakterielle Dysbalancen begünstigende Faktoren für die Manifestierung pathogener Bakterien (LEY et al. 2006).

Da das kommensale Mikrobiom die Reifung der Darmschleimhaut reguliert und mit dem Immunsystem interagiert (SCHOSTER 2015; SHI et al. 2017), können pathogene Mikroorganismen diese Situation nutzen, um zu proliferieren und zu Immunitätsstörungen sowie pathologischen Veränderungen am Darm zu führen.

2.4.2 Antibiotika-assoziierte Diarrhoe

Der Einfluss der Antibiotikatherapien kann zu Beeinträchtigungen der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota beim darmgesunden Pferd führen (BARTLETT 1992; WEESE 2000; GUSTAFSSON 2004, BAVERUD et al. 1997, MCGORUM und PIRIE 2009, 2010; BARR et al. 2013). Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass infolge einer antibiotischen Behandlung eine Kolonieresistenz herbeigeführt werden kann, die enteropathogenen Bakterien eine Nische ermöglicht, um sich gegenüber kommensalen Bakterien zu behaupten bzw. diese zu verdrängen (CHANG et al. 2008; BARTLETT 2010; ANTHARAM et al. 2013).

In der Humanmedizin ist vor allem der Zusammenhang der Entstehung einer akuten Colitis und der Nachweis von *C. difficile*-Enterotoxin A/B infolge einer Behandlung mit Antibiotika untersucht worden (BARTLETT 1992, 2002; MC FARLAND 2008; COHEN et al. 2010).

In der Veterinärmedizin gibt es ebenfalls diverse Studien, die jedoch teils widersprüchliche Ergebnisse vorweisen. Beispielsweise berichteten BAVERUD et al. (1997) von einer akuten Colitis während der Antibiotikatherapie bei zehn von 25 adulten Pferden mit Nachweis von *C. difficile*-Enterotoxin. HERHOLZ et al. (1999) publizierten das Auftreten einer akuten Colitis bei acht von acht Pferden nach der Gabe einer Kombination aus Penicillin und Gentamicin. Bei allen acht Pferden, die verstarben, konnte das β 2-Toxin von *C. perfringens* nachgewiesen werden. Bei Gabe von Lincomycin oder Erythromycin erkrankten mehrere Pferde an Colitis mit deutlicher Erniedrigung von grampositiven und anaeroben Vertretern der mikrobiellen, autochthonen Darmflora sowie deutlicher Erhöhung von *C. difficile* und *C. perfringens* (GUSTAFSSON et al. 1997). Während der Therapie mit Tetracyklinen wurden ebenfalls Erhöhungen von *C. perfringens* bei gleichzeitiger Verringerung von natürlich vorkommenden Kommensalen festgestellt (WHITE und PRIOR 1982). WILSON et al. (1996) untersuchten den Einsatz von Trimethoprim-Sulfadiazin (TMS) in Beziehung zur Prävalenz von Diarrhoe beim Pferd, wobei kein signifikanter Einfluss auf die Darmflora festzustellen war. Die Prävalenz von Diarrhoe erschien vergleichbar zu anderen

Antibiotika, lediglich unter der Therapie von TMS mit Penicillinen konnten ein erhöhtes Auftreten von Diarrhoen infolge längerer Medikationsdauer registriert werden (WILSON et al. 1996).

In einer Falldatenstudie zur AAD publizierten BARR et al. (2013) zusammengetragene Ergebnisse aus drei größeren Pferdekliniken in den Vereinigten Staaten von Amerika. Es wurden 5251 Antibiotikaeinsätze bei Pferden mit acht Monopräparaten und sechs Kombinationsvarianten von Antibiotika untersucht. Mit einer Prävalenz von 0,6 % war das Risiko einer AAD bei antibiotischer Behandlung niedrig, die Mortalitätsrate lag jedoch bei 18,8 % (BARR et al. 2013). Sie berichteten, dass von 32 Pferden mit diagnostizierter AAD bei vier Pferden *C. difficile* und bei drei Pferden Salmonellen nachgewiesen wurden (BARR et al. 2013). Dabei wurden hauptsächlich Kombinationstherapien aus Gentamicin und Penicillin (n = 7) sowie Enrofloxacin (n = 7) und Doxycyclin (n = 4) eingesetzt (BARR et al. 2013). Es gibt Vermutungen, dass Antibiotika mit eingeschränkter Aktivität gegenüber Anaerobiern wie potenzierte Sulfonamide, Fluorchinolone und Aminoglykoside wahrscheinlich ein niedrigeres Risiko bergen eine AAD zu induzieren (GUSTAFSSON et al. 1999).

Dennoch wurde in sieben Fällen mit Enrofloxacin eine AAD mit einer Prävalenz von 5,4 % induziert (BARR et al. 2013). Die Ursachen sind wahrscheinlich multifaktoriell. Sowohl die Wahl des Antibiotikums als auch deren Kombination können die Entstehung einer AAD forciert haben. Die eingesetzte Dosis und die Therapiedauer sowie die Grunderkrankung selbst sind neben der Fütterung und dem Stress durch Transport und Hospitalisierung einflussnehmende Faktoren. Darüberhinaus sind neben antimikrobiellen Eigenschaften von Antibiotika auch prokinetische Einflüsse bekannt und untersucht worden (ROUSSEL et al. 2000, 2003; MCGORUM und PIRIE 2009, 2010).

BARR et al. (2013) diskutierten die Gründe einer AAD-Entwicklung wie folgt: Mit der Veränderung der residenten Darmflora stellt sich eine Störung des intestinalen Metabolismus von Kohlenhydraten, flüchtigen Fettsäuren und Gallensäuren ein, die eine osmotische Diarrhoe induzierte und enteropathogenen Keimen die Chance gibt, sich gegenüber instabilen Kommensalen zu behaupten (BARR et al. 2013). Daher sind neben dem Auftreten von Kotveränderungen während einer Antibiotikatherapie auch Verschiebungen in der mikrobiellen Diversität der autochthonen Darmflora bedeutend.

HARLOW et al. (2013) zeigten eine Reduzierung der Anzahl zellulolytischer Bakterien sowie der Gattung *Lactobacillus* unter antibiotischer Behandlung mit Trimethoprim-Sulfadiazin (oral) und Ceftiofur. COSTA et al. (2015b) berichteten unter der Therapie mit Trimethoprim-Sulfadiazin, nach oraler Gabe, die meisten Veränderungen in der Zusammensetzung und auch eine Abnahme des Artenreichtums der intestinalen, bakteriellen Mikrobiota. Letzteres konnte auch durch die

Verwendung von Penicillin und Ceftiofur (beide intramuskulär appliziert) festgestellt werden (COSTA et al. 2015b). Jedoch wurde keine Diarrhoe oder Colitis durch die letzteren Antibiotika ausgelöst (COSTA et al. 2015b).

Die bisherigen Studien zeigten, dass die Prävalenz einer AAD im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Erkrankungen gering ist, dennoch scheint eine umsichtige Verwendung von Antibiotika notwendig, da auch Antibiotika mit niedrigem Risiko an der Entwicklung einer AAD beteiligt sein können (BARR et al. 2013).

2.4.3 Colitis

Die akute Colitis des Pferdes ist eine gastrointestinale Erkrankung, die je nach Schweregrad deutliche pathologische Veränderungen am Darm wie Entzündung der Darmschleimhaut und Submukosa unterschiedlichen Ausmaßes hervorruft (MC CONNICO 2003).

Klinisch zeigen die Pferde ein mittel- bis hochgradig gestörtes Allgemeinverhalten, Kolik, Diarrhoe, Pyrexie und Dehydratation bis hin zum Kreislaufversagen. Die Mukosa sowie Submukosa ist ödematös, die Darmlymphknoten aktiviert und das Darmlumen mit Flüssigkeit gefüllt. Nicht zuletzt ist eine Endotoxämie am Krankheitsverlauf beteiligt. Die Letalitätsrate variiert von 10 - 70 %, abhängig von der Virulenz des Erregers sowie der Aggressivität der Therapie (MURRAY 1992, LARSEN 1997, FEARY und HASSEL 2006).

Die Auslösefaktoren einer Colitis können unterschiedlich sein. Die Infektionen werden durch darmpathogene Bakterien wie *Salmonella spp.*, toxinbildende Stämme von *Clostridia spp.* und enterotoxische *Escherichia coli* sowie durch Infektionen mit *Neorickettsia risticii* ausgelöst (MURRAY 1992, LARSEN 1997, FEARY und HASSEL 2006). Weiterhin führen auch parasitäre Pathogene wie *Cyathostomum* und andere Strongyliden zur Entzündungen der Darmschleimhaut (FEARY und HASSEL 2006). Außerdem besitzen auch Medikamente wie NSAIDs oder Antibiotika wie beispielsweise Tetrazykline, Makrolide, Cephalosporine, Clindamycin sowie Lincomycin sowie Arsen- oder Cantharidinvergiftungen das Potential eine Colitis hervorzurufen (MC CONNICO 2003). Mechanische Irritationen, die zur Entzündung der Darmschleimhaut führen, können durch aufgenommenen Sand im Darmlumen verursacht werden (MAIR 2002). Aber auch unterschiedlichste Stressfaktoren können tendenziell ein Risiko für diese Erkrankung darstellen (MC CONNICO 2003).

In der Literatur wird *C. difficile* als eine wichtige bakterielle Ursache für Diarrhoe und Enterocolitis bei Pferden beschrieben (DIAB et al. 2013). Sowohl Fohlen als auch adulte Pferde sind gleichermaßen für diese Infektion anfällig (WEESE et al. 1999, 2001; BAVERUD 2002). Weitere Umstände wie Hospitalisierung und antimikrobielle Behandlung gehören zu den Risikofaktoren (BAVERUD 2002; DIAB et al. 2013). Die klinischen Anzeichen und die pathologischen

Veränderungen am Darm sind nicht spezifisch. Die Übertragung findet über die hochresistenten Sporen von *C. difficile* statt. Die Infektionsquellen können Pferdekot, kontaminierte Böden sowie Pferdeboxen sein. *C. difficile* ist jedoch auch bei gesunden Pferden nachweisbar. Die Prävalenz aus dem Darminhalt isolierter *C. difficile* differiert in aktuellen Studien zwischen 7,01 % in 742 Fäzesproben bei MEDINA-TORRES et al. (2011) und 8 von 15 gesunden Pferden (53,3 %) bei SCHOSTER et al. (2012). Der Nachweis von Toxin A (Enterotoxin) und/oder Toxin B (Zytotoxin) in Darminhalt oder Fäzes stellt eine zuverlässige Methode zur Sicherung der ätiologischen Diagnose der Erkrankung dar (FEARY and HASSEL 2006; SILVA et al. 2013). Bei Fohlen ist die Infektion mit *C. difficile* eher in den proximalen Darmanteilen (proximale Enteritis) lokalisiert und bei adulten Pferden lokalisiert sie sich eher in den distalen Darmabschnitten wie Caecum und Colon ascendens (DIAB et al. 2013). In der Humanmedizin gilt diese Infektion als gesicherte mögliche Komplikation einer antibiotischen Behandlung (KHANNA und PARDI 2012).

C. perfringens ist ebenfalls ein grampositives und streng anaerobes Stäbchen, welches Enterocolitiden bei Pferden ebenso hervorrufen kann wie auch bei Hunden, Kälbern, Lämmern, Kaninchen, Schweinen und Menschen (SONGER 1996). Am häufigsten ist *C. perfringens* mit der Enterocolitis bei neugeborenen Fohlen assoziiert (FEARY und HASSEL 2006). *C. perfringens*-Subtypen produzieren verschiedene Proteintoxine (α , β , ϵ , ι) anhand der die fünf Subtypen (A - E) von *C. perfringens* zugeordnet werden können (WEESE et al. 2001a).

Die Erkenntnisse über die Eigenschaften dieser Toxine in Verbindung mit Erkrankungen beim Pferd sind noch limitiert (FEARY und HASSEL 2006). Typ C wird gelegentlich in Fäzes gesunder Pferde und in der Umwelt nachgewiesen und könnte potentiell pathogen sein (UZAL et al. 2012). Subtyp A mit seinem β 2-Toxin korreliert mit der Entstehung einer Enterocolitis, wobei dieser Subtyp auch in Fäzes von gesunden Pferden isoliert werden konnte (MCGORUM et al. 1998; FEARY und HASSEL 2006).

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich mit der Bedeutung der Clostridientoxine in Beziehung zu schwerwiegenden Enterocolitiden und Colitiden bei juvenilen und adulten Pferden und möglichen Nachweisgrenzen. Die publizierten Ergebnisse sind verschieden und abhängig von der Altersstruktur, Region, Saison sowie Nachweismethode. Generell konnten Isolate von *C. perfringens* in Fäzes bei 54 % gesunder Zuchtstuten und Fohlen gewonnen werden (TILLOTSON et al. 2002). Auch GOHARI et al. (2014) fanden in ihrer Untersuchung der Kotproben von 55 Pferden bei fast der Hälfte variable Zahlen von *C. perfringens*-Isolaten, wobei der Genotyp A in Übereinstimmung mit anderen Publikationen am häufigsten vorkam (DONALDSON und PALMAR 1999; WEESE et al. 2001a; TILLOTSON et al. 2002). SCHOSTER et al. (2012) konnten lediglich bei einem von 15 Pferden im Bereich des Colon ascendens (links, ventral) *C. perfringens* Typ A isolieren.

Ein weiteres Toxin, welches lediglich weniger als 5 % aller *C. perfringens* Typ A-Isolate produzieren und welches als *C. perfringens* Enterotoxin (CPE) bezeichnet wird (WEESE et al. 2001a; GAO und MC CLANE 2012), ist Gegenstand aktueller Forschung. CPE bindet an Claudinrezeptoren, die eine Komponente der Tight Junctions sind (GAO und MC CLANE 2012) und verändert die Oberflächenstrukturen, so dass aktive Poren entstehen, die letztendlich zum Zelltod führen (GAO und MC CLANE 2012; ROBERTSON et al. 2007). Diese Eigenschaft könnte die schwerwiegenden Schäden am Darmepithel, wie Desquamation, Nekrosen und Permeabilitätsstörungen, die zu hochgradigen Flüssigkeitsansammlungen im Darmlumen führen sowie die klinischen Symptome, Spasmen und hochgradige Diarrhoen, erklären.

Dennoch besteht noch keine Klarheit über die Bedeutung sowie den quantitativen Nachweis von CPE bzw. CPE-produzierenden *C. perfringens* im Hinblick auf die schwerwiegenden Formen der Colitis beim Pferd (GOHARI et al. 2014).

Bei gesunden Pferden können Konzentration von $<10^3$ CFU/g von *C. perfringens* in Fäzes gefunden werden (FEARY und HASSEL 2006). Die ätiologische Diagnose einer *C. perfringens*-Infektion kann laut WIERUP (1987) bei einer Konzentration von 10^4 - 10^5 CFU/g in Fäzes beim Pferd mit klinischen Anzeichen einer Colitis gestellt werden. Post mortem kann sich *C. perfringens* stark im Darm vermehren, daher sind die Befunde postmortal während einer Sektion entnommener Proben eher vorsichtig im Hinblick auf eine Infektion zu interpretieren. Als Gold-Standard gilt die Bestimmung von Clostridien-Toxinen im Darmlumen, dennoch ist der Nachweis des Toxingens nicht notwendigerweise mit einer Toxinexpression verbunden (FEARY und HASSEL 2006). Im Unterschied zu anderen Ursachen einer Colitis scheint eine Clostridieninfektion nicht ansteckend zu sein.

Die Infektion mit *Salmonella spp.* kann ebenfalls zu schwerer Colitis führen, wobei die Salmonellen in *S. enterica* und *S. bongori* unterschieden werden. Besonders die Unterart *S. enterica Enterica* besitzt das Potential, eine ansteckende, schwere, allgemeine Infektion mit hoher Tendenz zur akuten Diarrhoe (hämorrhagische Enteritis/Enterocolitis/Colitis) bei Menschen und Haussäugetieren hervorzurufen (FEARY und HASSEL 2006). Dabei ist der häufigste Serotyp, *S. Typhimurium*, nicht wirtsspezifisch und in der Entstehung von gastrointestinalen Erkrankungen beteiligt (WEESE et al. 2001b; SELBITZ 2006). Die Virulenz des Stammes sowie die Abwehrlage des Pferdes bestimmen die Entwicklung der Infektion (WEESE et al. 2001b). Akute Infektionen führen zu katarrhalischen bis hämorrhagischen Darmentzündungen. Chronische Infektionen können diphtheroid-nekrotisierende Enteritiden entstehen lassen (SELBITZ 2006). Es gibt latente Träger, die den Erreger zwar ausscheiden, aber nicht erkranken, bis größere Stressfaktoren eine Erkrankung induzieren können (SELBITZ 2006).

Die Häufigkeit in Pferdepopulationen ist schwierig abzuschätzen. In den USA gab es eine Prävalenzstudie mit 0,8 % Positiven von 8417 Kotproben aus 972 Pferdebetrieben (TRAUB-DARGATZ et al. 2000). Eine Studie aus Großbritannien und Irland ermittelte eine Prävalenz von 1,0 % bei 304 Fohlen mit Diarrhoe (BROWNING et al. 1991).

Das Nachweisverfahren einer Salmonelleninfektion beim Pferd stützt sich immer noch auf die kulturelle Methode (mit Antibiotogramm), die allerdings 1 - 5 Tage dauern kann. Moderne Verfahren wie PCR und Antigen-Capture-ELISA verkürzen den Zeitaufwand erheblich und sind zum Teil sensitiver, bei anderen Tierarten haben sich bereits ELISA-Verfahren mit Antikörpernachweis durchgesetzt (SELBITZ 2006). Für den sicheren Nachweis ist aufgrund der intermittierenden Ausscheidung der *Salmonella spp.* eine mehrmalige Kotuntersuchung empfehlenswert.

2.5 Therapie

Das generelle Vorgehen bei Durchfallerkrankungen basiert wie bei allen anderen Tierarten auf der symptomatischen Therapie. Beim Pferd kann es aufgrund des voluminösen Blind- und Grimmdarms sehr schnell zu massiven Flüssigkeitsverlusten bei Diarrhoen kommen, weshalb sich die Colitis des Pferdes hinsichtlich Mortalität und Morbidität von anderen Tieren unterscheidet (FEARY und HASSEL 2006). Allgemein gilt es diesen Flüssigkeitsverlust sowie Verschiebungen im Säure-Base-Haushalt schnell auszugleichen, des Weiteren müssen andere Symptome wie Kolik, Fieber sowie Hypoglykämie entsprechend behandelt werden. Für die Abklärung eines infektiösen Geschehens sind bakteriologisch-mykologische, parasitologische bzw. virologische Kotuntersuchungen sinnvoll. Ist eine Erhöhung der inneren Körpertemperatur, Tachypnoe und Tachykardie vorhanden, kann von einer Infektion/Endotoxämie oder Septikämie ausgegangen werden. Hämatologische Untersuchungen mit Leukozytose oder Leukopenie und Erhöhung der Akut-Phase-Proteine in Verbindung mit den bakteriologischen und/oder Toxinbefunden erhärten die Diagnose, die eine antibiotische Behandlung rechtfertigt.

2.5.1 Antibiotika

Der Einsatz und die Auswahl von Antibiotika verlangen eine Begründung. Gerade bei gastrointestinalen Erkrankungen ist eine antibiotische Therapie genau abzuwägen, vor allem wenn kein pathogener Erreger vorliegt. Jedoch kann es als Komplikation von Infektionen oder Entzündungen der Darmwand mit Schädigung der Darmbarriere zur Septikämie bzw. Endotoxämie kommen, die wiederum eine rasche antibiotische Therapie erfordert. Allerdings kann eine Colitis auch als unerwünschte Wirkung einer Antibiotikatherapie entstehen (GRØNVOLD et al. 2010). Hat das Pferd zum Zeitpunkt der Vorstellung bereits eine Diarrhoe, ist

schon von einer bestehenden Destabilisierung der mikrobiellen Besiedlung der Darmschleimhaut auszugehen. Inwieweit Antibiotika diese Destabilisierung begünstigen, ist noch ungewiss.

Mit dem bakteriellen Erregernachweis lässt sich die Wahl von speziellen Antibiotika konkretisieren und nach Antibiogramm bestimmen. Der Antibiotikaeinsatz bei einer Salmonelleninfektion ist umstritten, da Antibiotika die Proliferation und aktive Ausscheidung bei latent infizierten Pferden fördern können (TRAUB-DARGATZ 1990). Es gibt wenig positive Erfahrungen zu einer erfolgreichen antimikrobiellen Therapie der Salmonellose beim Pferd (FEARY und HASSEL 2006; SELBITZ 2006). Ausgenommen sind Komplikationen wie eine Septikämie oder der Zustand immungeschwächter Tiere, bei denen eine antibiotische Behandlung indiziert ist. In der Literatur wird der systemische Einsatz von Enrofloxacin (5,0 mg/kg, 1 x täglich) empfohlen (FEARY und HASSEL 2006). Die Fluorchinolone weisen ein günstiges, schmales Wirkungsspektrum mit bakterizider Aktivität auf, sodass nur minimale Auswirkungen auf die kommensale Flora zu erwarten sind (FEARY und HASSEL 2006). Auch wird der Einsatz von Aminoglykosiden wie Gentamicin als Schmalspektrumantibiotikum mit Wirkung gegen gramnegative Bakterien von einigen Autoren befürwortet (FEARY und HASSEL 2006), um die autochthone Darmflora nur wenig zu stören. In der Behandlung von Clostridieninfektionen ist eine systemische antibiotische Breitbandtherapie vor allem gegenüber Anaerobiern, besonders bei Eintreten einer Septikämie bzw. einer starken Neutropenie, sinnvoll (FEARY und HASSEL 2006). Insbesondere Penicilline in Kombination mit einem Aminoglykosid sind hier zur Erzielung einer ausreichenden Wirkung gegen Anaerobier geeignet (FEARY und HASSEL 2006). Besonders bei der durch Clostridien ausgelösten Enterocolitis des Fohlens wird die zusätzliche Verwendung von Metronidazol (10 - 15 mg/kg dreimal täglich, oral) in der Therapie empfohlen (MCGORUM et al. 1998; FEARY und HASSEL 2006), wobei auch die intravenöse Applikation von Metronidazol in der Humanmedizin gute Wirkung zeigte (FEARY und HASSEL 2006). Dennoch wies eine Publikation auf eine Reduzierung des Schweregrades einer Typhlocolitis bei Pferden hin, bei denen in der Standardtherapie kein Gentamicin bei β 2-toxischen *C. perfringens* verwendet wurde (VILEI et al. 2005). VILEI et al. (2005) vermuteten deshalb eine eingetretene reduzierte Expressierung des bakteriellen Toxin-Gens durch ein gehemmtes Antibiotika-assoziiertes ribosomales Frameshifting (VILEI et al. 2005).

Alarmierend ist die Resistenzlage bei einigen Antibiotika bezüglich enteropathogenen Erregern (MCGOWAN 2001). Bei der Salmonellose sind sogar Mehrfachresistenzen von Antibiotika vor allem aus den Bereichen der Lebensmittelhygiene und Humanmedizin bekannt (BfR 2009). So wurden teilweise Salmonellenstämme mit Resistenzen gegen Gentamicin, Trimethoprim, besonders Chloramphenicol, aber auch Fluorchinolone isoliert (VARMA et al. 2005; BfR 2009). Auch in Deutschland ist in den letzten Jahrzehnten eine Zunahme von resistenten

Salmonellenisolaten im Rahmen von Lebensmittelinfektionen aufgefallen speziell bei *S. Typhimurium* sowie *S. Enteritidis* (HELMS et al. 2002; VARMA et al. 2005; BfR 2009). Resistenzen von *C. perfringens* gegen Metronidazol sind bisher nicht dokumentiert. Bei *C. difficile*-Infektionen ist allerdings das Auftreten von resistenten Stämmen, sowohl beim Pferd als auch beim Menschen, festgestellt worden (FEARY und HASSEL 2006), daher ist auf die umsichtige Verwendung von Metronidazol in der Therapie hinzuweisen. Des Weiteren stellten COSTA et al. (2012) und SCHOSTER et al. (2017) eine Dominanz der Gattung *Clostridia* innerhalb der kommensalen Darmflora bei gesunden Pferden fest und plädieren aus diesen Gründen für einen ebenfalls vorsichtigen therapeutischen Einsatz von Metronidazol.

2.5.2 Probiotika

Nach PARK und FLOCH (2007) werden probiotische Substanzen als Therapeutikum bei gastrointestinalen Erkrankungen bzw. auch zur Pro- und Metaphylaxe bei antibiotischen Behandlungen angewandt, um einer entstandenen oder drohenden Destabilisierung der mikrobiellen Besiedlung der Darmschleimhaut entgegenzuwirken. Über Wachstumsförderung und proliferative Faktoren stabilisieren sie die autochthone Darmflora gegenüber pathogenen und/oder opportunistischen Bakterien. Probiotika werden allgemein als „lebende Mikroorganismen, die, wenn sie in adäquaten Mengen verabreicht werden, dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen bringen“ definiert (FAO/WHO, 2002). Wie der genaue Mechanismus in dieser Unterstützung der autochthonen Darmflora funktioniert, ist noch nicht bekannt. Es ist beobachtet worden, dass keine direkte Ansiedlung von den probiotischen Mikroorganismen stattfindet und nur eine temporäre Nachweisbarkeit vorhanden ist. Sie scheinen über pH-Wert-Beeinflussung, Produktion von Stoffwechselprodukten, Interaktionen mit dem Immunsystem sowie Produktion von Bakteriozinen zu agieren und nicht zuletzt pathogene Keime von der Darmschleimhaut zu verdrängen (ROLFE 2000; SCHOSTER et al. 2014).

Probiotika werden als Futtermittelzusatzstoffe für spezifische Tierarten in Europa durch die EU-Verordnung Nr. 1831/2003 begrenzt auf zehn Jahre zugelassen. Vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) werden regelmäßig Informationen über Futtermittel mit zugelassenen probiotischen Zusatzstoffen und deren Rechtsgrundlage herausgegeben. Zu den derzeit für Pferde zugelassenen Probiotika gehören Hefearten wie *S. cerevisiae*, Milchsäurebakterien wie *E. faecium* und *Lb. rhamnosus* oder aber auch *E. coli* (ZENTEK et al. 2008; SCHOSTER 2015). Als Darmflorastabilisator für Pferde sind derzeit ausschließlich Futtermittel mit dem Zusatz von *S. cerevisiae* erhältlich, welches die Ballaststoffverdaulichkeit verbessern soll. Es sind nur wenige wissenschaftliche Studien verfügbar, die den Einsatz von Probiotika an größeren Fallzahlen und mit Kontrollgruppen beim Pferd untersuchen, auch

Unterschiede in Art und Dosierung erschweren Vergleiche (WEESE 2003; SCHOSTER et al. 2014; SCHOSTER 2015; COVERDALE 2016).

Beispielsweise bei der Bekämpfung von Salmonellenausscheidern gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Zwei Studien konnten beim Einsatz von Probiotika keinen Hinweis auf die Auswirkung der Salmonellenausscheidung feststellen (PARRAGA et al. 1997; KIM et al. 2001). Eine andere Studie zeigte eine Reduktion der Salmonellenausscheidung um 65 % (WARD et al. 2004).

Durch die Instabilität der juvenilen autochthonen Darmflora und des Immunsystems von Neugeborenen sollte die Therapie mit Probiotika bei Fohlen sogar nur unter besonderer Vorsicht angewandt werden (WEESE und ROUSSEAU 2005; SCHOSTER et al. 2016). SCHOSTER (2015) schlägt vor, mehr Mikroorganismen als probiotische Substanzen zu untersuchen, die in der autochthonen Darmflora von Pferden quantitativ bedeutsam vorhanden sind wie beispielsweise apathogene *Clostridia*.

2.5.3 Präbiotika

Präbiotika sind nicht durch körpereigene endogene Enzyme spaltbare Substrate, die lediglich durch selektive mikrobielle Fermentation abbaubar sind. Diese präbiotischen Spaltprodukte sollen die intestinale Flora stabilisieren und selektiv wachstumsfördernd wirken. ROBERFROID et al. (2010) definierten die Wirkung von Präbiotika wie folgt: „selektive Stimulation des Wachstums und/oder der Aktivität einer oder einer begrenzten Anzahl von Mikroorganismen im Darm, die ihrem Wirt gesundheitliche Vorteile verleihen“.

In der Regel werden diätische Kohlenhydrate vom Inulin-Fruktan-Typ oder Galacto-Oligosaccharide eingesetzt. Fruktane vom Inulin-Typ sind Polymere der Fructose, die durch β -2,1-Bindung mit einer terminalen α -verknüpften Glucose verbunden sind (WILSON und WHELAN 2017). Fructo-Oligosaccharide sind kürzere Ketten mit einem Polymerisationsgrad 2 - 8. Im Gegensatz gehört Inulin zu den längeren Ketten mit einem Polymerisationsgrad 2 - 60 (ROBERFROID et al. 2010).

Zur Gewinnung von Fruktanen kann aus Pflanzen, beispielsweise Topinambur, Inulin extrahiert werden oder aber durch partielle Hydrolyse gewonnen bzw. enzymatisch aus Saccharose gelöst werden (ROBERFROID et al. 2010). Neben Inulin und Oligofructose ist auch Lactulose als präbiotische Substanz einsetzbar. Alle diese Substanzen können vor allem Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.* sowie *Bifidobacterium spp.* wachstumsfördernd stimulieren (ROBERFROID et al. 2010).

Galacto-Oligosaccharide (GOS) wiederum sind Polymere von Galactose verknüpft mit einem terminalen Glucose-Monomer. Pflanzliche GOS, beispielsweise Raffinose, Stachyose oder

Verbascose aus Bohnen und Hülsenfrüchten (XIAOLI et al. 2008; BRUMMER et al. 2015), bestehen aus Galactose, Glucose und Fructose (dreifach verknüpft), wobei der Galactosylrest auf Saccharose übertragen wurde. Jedoch sind sie nicht spezifisch einsetzbar, da sie von mehreren Bakterien gespalten werden können. Es wird daher auf kommerziell hergestellte β -GOS gesetzt, welche durch enzymatischen Transfer von β -Galactosidase auf Lactose entstehen und selektiv Bifidobakterien im Wachstum fördern (VULEVIC et al. 2004; SPLECHTNA et al. 2006; PARK and OH 2010; WILSON und WHELAN 2017).

Die Fähigkeiten zur Fermentation von Präbiotika durch Bakterien konnten genomisch detektiert werden (VULEVIC et al. 2004). Spezifische Gencluster innerhalb des bakteriellen Genoms kodieren für die saccharolytischen Enzyme, die Bakterien produzieren können, um präbiotische Substrate zu metabolisieren (WILSON und WHELAN 2017). Somit können Substratspezifitäten in der Fermentation von Bakterien erfasst werden. Dies ist wichtig für die selektive Einsetzbarkeit von präbiotischen Mitteln.

In einem *in vitro*-Versuch konnte gezeigt werden, dass β -GOS Bifidobakterien spezifisch fördern, in dem Bifidobakterien an Stelle von Glucose bevorzugt Oligo- und Disaccharide in einem gemischten Medium verstoffwechseln. Die Wachstumsrate für Bifidobakterien war gegenüber anderen Bakterien erhöht, wenn β -GOS im Vergleich zu anderen präbiotischen Substanzen eingesetzt wurden (TZORTZIS und VULEVIC 2009). Außerdem konnte eine hohe Aktivität der β -Galactosidase in Bifidobakterien genetisch identifiziert werden, die meisten Stämme von Bifidobakterien produzieren mehr als ein Isotyp dieses Enzyms, was eine schnelle und breite Enzymreaktion in Anwesenheit von β -GOS erlaubt (VULEVIC et al. 2004).

Das klinische Konsensus-Statement zu Probiotika und Präbiotika aus dem Bereich der Humanmedizin beschreibt außerdem den Effekt „präbiotischer Messbarkeit“ von Produkten (GIBSON et al. 2017). Präbiotische Effekte sind messbar und einzuordnen, wenn Präbiotika selektiv mikrobiell verwertet werden und deren spezifischen Produkte im Experiment entweder über das Wachstum von definierten Bakterien oder über deren Produktmengen gemessen werden (GIBSON et al. 2017). Produkte, die einen Gesundheitseffekt beim Wirtsorganismus bewiesenermaßen erbringen, sind kurzkettige Fettsäuren wie Acetat, Butyrat und Propionat (CANANI et al. 2011; KOH et al. 2016). Das vermehrte Vorkommen von kurzkettigen Fettsäuren führt zu einem sinkenden luminalen pH-Wert mit der Hemmung säureempfindlicher pathogener Mikroorganismen in diesem Milieu. Andererseits können die präbiotisch geförderten Bakterien Bindungsstellen besetzen sowie die Bildung von Bakteriozinen stimulieren und die Muzinproduktion aktivieren (BERG et al. 2005; ZENTEK et al. 2008; RESPONDEK et al. 2008a; ENDO et al. 2009).

Dennoch ist die Steigerung der flüchtigen Fettsäuren wie Acetat, das hauptsächlich von Bifidobakterien produziert wird, wie Butyrat, produziert von *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* sowie Propionat, welches vermehrt durch *Propionibacterium spp.* und *Bacteroidetes* gebildet wird, in der Wirkung bedeutsamer (YANG et al. 2013).

Der Einsatz von Präbiotika wird daher vorwiegend bei der Reduzierung von Fäulnisstoffen sowie vermehrter Gasbildung im Darm untersucht (RESPONDEK et al. 2008a; HOLSCHER et al. 2015) sowie in Zusammenhang mit akuten bis chronischen Entzündungen der Darmschleimhaut und bei Dysbiosen erforscht (GIBSON et al. 2004; CANANI et al. 2012; MACHIELS et al. 2014; DELCOUR et al. 2016; GIBSON et al. 2017).

Ähnliche Untersuchungen wurden auch beim Schwein (LIU et al. 2008; CHE et al. 2011) sowie beim Hund (APANAVICIUS et al. 2007) durchgeführt und außerdem konnte auch eine Erhöhung der Insulinsensitivität bei Hund und Pferd mit Präbiotika erreicht werden (RESPONDEK et al. 2008b; RESPONDEK et al. 2011).

Neben der chemischen Zusammensetzung von Präbiotika beeinflusst auch die präbiotische Dosis die Fermentation in entscheidendem Maße. Zur Anwendung bei Tieren beträgt die Dosis von Präbiotika zwischen 10 - 20 % der gesamten Nahrungsaufnahme über mindestens 14 - 21 Tage (MORGAN et al. 2007; RESPONDEK et al. 2008a; LIU et al. 2008; VERBRUGGHE et al. 2009; RESPONDEK et al. 2011; SOHAIL et al. 2012; GHOSH und MEHLA 2012; HALAS und NOCHTA 2012). Beim Menschen werden eher 1 - 4 % der gesamten Nahrungsaufnahme angestrebt (VALCHEVA und DIELEMAN 2016).

Die bisherigen Untersuchungen bei Pferden zeigen noch unstimmige Ergebnisse. So waren Erhöhungen von Fermentationsprodukten bei niedrigen (8 g/Tag) und hohen Dosen (24 g/Tag) von präbiotischen Substanzen bei Jährlingen zu messen (BERG et al. 2005). Bei anderen Untersuchungen an adulten Pferden gab es jedoch keine Änderungen der Fermentationsprodukte im Bereich des Caecums und Colons bei deutlich höherer Präbiotikadosis (30 g/Tag) (RESPONDEK et al. 2008a). Die Abhängigkeit von den Dosierungen und der Zusammensetzung der Präbiotika sowie die unterschiedlichen angewandten Analysemethoden erschweren die Interpretation und den Vergleich der Ergebnisse.

Die Fermentation beginnt bereits im proximalen Verdauungstrakt und ist nicht nur auf distale Darmabschnitte begrenzt, da schon in den Atemgasen Fermentationsgase messbar waren (COENEN et al. 2006).

GLATTER et al. (2016) untersuchten daher den Einfluss von Inulin auf den pH-Wert und die Mengen gebildeter flüchtiger Fettsäuren in den unterschiedlichen Abschnitten des equinen Magen-Darm-Traktes im Fütterungsexperiment. Die Dosierung der verwendeten präbiotischen Substanzen lag bei 0,2 g Inulin/kg KM/Tag über Topinampurmehl und entsprach genau den

derzeitigen Empfehlungen für präbiotische aktive Substanzen für Pferde (JULLIAND und ZEYNER 2009). Zuzüglich des Präbiotikums wurde Wiesenheu in bedarfsgerechten Mengen gefüttert; die Kontrolltiere erhielten ausschließlich Wiesenheu. In den vergleichenden Messungen des pH-Wertes fielen keine Unterschiede auf. Bei den Messungen der Fermentationsprodukte in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts konnten überraschenderweise ein erhöhtes Anfallen an Fermentationsprodukten im Magen nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich eine erhöhte mikrobielle Aktivität im Bereich des Magens und proximalen Anteilen verglichen mit den distalen Abschnitten, wo der Einfluss viel geringer ausgeprägt war (GLATTER et al. 2016).

Welche Risiken von eingesetzten Präbiotika ausgehen, ist noch weitestgehend unbekannt. Bei Pferden steht eine übermäßige Aufnahme von Fruktanen im Verdacht Hufrehe hervorzurufen (POLLITT und VAN EPS 2002; VAN EPS und POLLITT 2006; MÖBELER 2004). Es wurde gezeigt, dass Inulin bei Pferden sowohl präzäkal als auch zäkal sehr schnell fermentiert wird, wodurch sich die Produktion von Laktat und kurzkettigen Fettsäuren schnell erhöhte (PLUMHOFF 2004; COENEN et al. 2006). Intestinale Störungen könnten so durch das plötzliche hohe Aufkommen von Laktat und kurzkettigen Fettsäuren provoziert werden (PLUMHOFF 2004; COENEN et al. 2006).

Deshalb wird bei Pferden wird somit ein sorgsamer Umgang in Bezug auf Dosierung und Anwendungsdauer von präbiotischen wirksamen Kohlenhydratsubstanzen im Hinblick auf das Risiko der Entstehung von Dysbiosen und Hufrehe empfohlen (BAILEY et al. 2003; PLUMHOFF 2004).

2.5.4 Huminsäuren

Huminsäuren sind Hauptbestandteile der Huminstoffe, einer Gruppe dunkelgefärbter, organischer Naturstoffe aus dem Boden (SOUCI 1956; SOMMER 1960). Huminsäuren stellen keine klassische homogene chemische Verbindung dar, für die es eine definierte Strukturformel gibt. Sie sind durch ihre unterschiedliche Entstehungsweise durch Humifizierungsprozesse von pflanzlichen, tierischen und organischen Substanzen eher eine heterogene Zusammensetzung einer schwachen Säure mit hohen Pufferkapazitäten und Komplexbildungseigenschaften (KÜHNERT et al. 1982). Sie enthalten 60 % organisch gebundenen Kohlenstoff, 4 - 7 % Wasserstoff, 27 - 40 % Sauerstoff, 5 % Schwefel sowie geringe Mengen Stickstoff (bis 3,5 %) und setzen sich zu einem dreidimensionalen Makromolekül mit Molmassen von 25.000 bis 100.000 g/mol zusammen (BENTZ 1982; EISENER 1983; BODES-FISCHER 1985; BECKER 1987; STEIN 1994).

Der zentrale Teil und die peripheren Strukturen der Makromoleküle werden durch phenolische Gruppen verknüpft (BERGMANN 1978; KÜHNERT et al. 1982, 1989). Diese phenolischen

Strukturen der Huminsäuren besitzen die Fähigkeit, die Prostaglandin-E-Synthese zu hemmen und erzeugen damit medizinisch gesehen einen antiphlogistischen Effekt (BRENG et al. 1981; FAN TSHUNG-CHU et al. 1981). Dennoch werden Huminsäuren hauptsächlich zur Therapie von Magen-Darm-Erkrankungen eingesetzt. Als Futterzusatzstoff werden sie in der Veterinärmedizin therapeutisch bei unspezifischen Durchfallerkrankungen angewendet, bei denen der Verdacht auf bakterielle oder virale Infektionen besteht (STEIN 1994) bzw. es toxische Substanzen zu absorbieren gilt. Die Neigung zur Komplexbildung von Huminstoffen und Huminsäuren wird bereits industriell und landwirtschaftlich genutzt (LÖHMANNSRÖBEN et al. 1999). Da sie vermehrt Wechselwirkungen mit organischen Substanzen eingehen und eine erhöhte Puffer- und Adsorptionskapazität aufweisen, könnten diese Eigenschaften auch medizinisch erfolgreich als Adsorbans nutzbar gemacht werden (GOLBS 1983; KÜHNERT et al. 1989; STEIN 1994). Weiterhin zeigen sie floraregulierende Eigenschaften über die Bindung von Enzymen durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Huminsäuren und Proteinen (BRENG 1977). Damit lassen sich die nachgewiesenen inhibitorischen Aktivitäten auf darmpathogene Keime (VOIGT und BERGMANN 1977) sowie die milde bakterio-statische Wirkung (ANSORG und ROCHUS 1978, ZHANG et al. 2000b) erklären. Außerdem bedecken sie durch das Anhaften von kleinsten Partikeln auf dem Schleimhautepithel die Schleimhautoberfläche und können daher geschädigte Mukosazellen filmartig überziehen und schützen (KÜHNERT 1979; KÜHNERT et al. 1989).

Pharmazeutisch werden Huminsäuren bislang als ungefährliche Substanzen eingestuft, da keine toxischen Effekte bei oraler Applikation bekannt sind (KÜHNERT et al. 1989; STEIN 1994). Außerdem wird wegen der geringen Resorptionsrate nicht von einer Akkumulation in den Organen ausgegangen (KÜHNERT et al. 1989; STEIN 1994; KÜHNERT et al. 1994; LANGE et al. 1996; Produktinformation PHARMAWERK WEINBÖHLA 2000; BÜSING et al. 2014). Durch die gute Wasserlöslichkeit und geringe Molmasse verteilen sich die Kolloide der Huminsäuren filmartig im Darm. Das Vorhandensein mehrerer C-Atome im Molekül schließt einen Übertritt per Diffusion mit hoher Wahrscheinlichkeit aus, da ein Übertreten von wasserlöslichen Molekülen für mehr als vier C-Atome an biologischen Membranen schwierig ist. Jedoch können kleinste Partikel über Pinozytose in die Blut- und Lymphgefäße gelangen oder aufgrund des alkalischen pH-Wertes eventuell im Bereich des Duodenums aufgenommen werden (GOLBS 1983).

BÜSING et al. (2014) fanden heraus, dass bei adulten Schweinen nach oraler Applikation von Huminsäuren keine Resorption über die Darmwand nachweisbar war, jedoch konnte bei Jungtieren (Absetzern) eine Resorption über die duodenale Darmwand und Einlagerung in den Darmzotten festgestellt werden (BÜSING et al. 2011). Ein Zusammenhang mit der Entwicklung

der Darmwand und den Zellkontakten der Tight Junctions zwischen den Epithelzellen ist dabei jedoch nur eine Vermutung.

2.5.5 Fäkale Mikrobiota-Transplantation

Die fäkale Mikrobiota-Transplantation (FMT) ist eine altbekannte, jedoch wiederentdeckte und aktuell modifizierte Therapie bei gastrointestinalen Störungen. Bereits im 4. Jahrhundert wurde diese Transplantationsvariante im Kampf gegen Lebensmittelvergiftungen der Menschen in der Dong-jin-Dynastie in China erfolgreich eingesetzt (ZHANG et al. 2012; MULLEN et al. 2016). Im 17. Jahrhundert dokumentierte der Anatom Fabricius Aquapendente erste Beobachtungen darüber, wie an Durchfall erkrankte Tiere bewusst die Fäzes von anderen Tieren (Koprophagie) aufnahmen (MULLEN et al. 2016). Auch die heutzutage noch angewandte Methode der Pansensaftransplantation bei der Pansenazidose des Wiederkäuers ist ein Therapieverfahren der mikrobiellen Transplantation von einem gesunden Spendertier auf das erkrankte Tier (DE PETERS und GEORGE 2014). MULLEN et al. (2016), FEARY und HASSEL (2006) sowie SCHOSTER et al. (2014) publizierten bereits über den Gebrauch dieser Therapieform bei Pferden mit Colitis.

In der Humanmedizin erhielt eine kleinere Studie von VAN NOOD et al. (2013) größeres Ansehen, da sie gute Erfolge in der Behandlung von *C. difficile*-Infektion beim Menschen mit einer Kombination aus antibiotischer Therapie und FMT im Vergleich zu einer alleinigen antibiotischen Behandlung erzielten (VAN NOOD et al. 2013). Mittlerweile ist die Behandlungsmethode der FMT in der Humanmedizin einzig bei der *C. difficile*-Infektion zugelassen und anerkannt (MULLEN et al. 2016), weil die infizierten Patienten nicht immer auf eine antibiotische Behandlung ansprechen (GUO et al. 2012; RAO und YOUNG 2015). Dennoch wird die FMT weiterhin in der Behandlung von chronischen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa beforscht. Derzeit sind recht unterschiedliche Erfolgsberichte veröffentlicht (MOAYYEDI et al. 2015; ROSSEN et al. 2015). In der Humanmedizin wurden die Regularien für die Spender sowie die Behandlungsstrategien mit FMT in den letzten Jahren deutlich modifiziert und mit wissenschaftlichen Erkenntnissen untermauert (ZHANG et al. 2012; BRANDT und ARONIADIS 2013). Es gibt mehrere Studien zur Auswahl geeigneter Spender sowie zur Risikoabschätzung von übertragbaren Erkrankungen (GREHAN et al. 2010; GOUGH et al. 2011; GUO et al. 2012; BRANDT und ARONIADIS 2013; SMITS et al. 2013). Außerdem gibt es neue Studienansätze hin zur Darreichungsform der FMT als Kapseln, anstelle von der Applikationsmethode ins Darminnere per Endoskopie oder Sonde (PETROF und KHORUTS 2014).

In der Pferdemedizin wird für die Durchführung einer FMT zur Suche nach einem geeigneten gesunden Spendertier empfohlen, klinische und labormedizinische Untersuchungen inkl. des

parasitologischen und bakteriologischen Screenings der Fäzes durchzuführen. Ein geeignetes Pferd muss gegen alle anzeigepflichtigen Seuchen insbesondere gegen Equine Infektiöse Anämie getestet werden, um als Spendertier zur Verfügung zu stehen. Anschließend werden über eine rektale Entnahme Fäzes gewonnen und daraus eine Suspension mit handwarmen Wasser auf zwei bis drei Liter hergestellt. Diese Suspension wird dem Patienten mit zusätzlich zwei Litern warmem Wasser per Nasenschlundsonde eingegeben (FEARY und HASSEL 2006; MULLEN et al. 2016). Aus eigener Erfahrung ist eine Filtration zur Entfernung der größeren Faserbestandteile vorher nötig, um ein Verstopfen der Sonde zu verhindern. Eine tägliche Wiederholung dieser Prozedur über weitere drei bis vier Tage wird empfohlen (MULLEN et al. 2016). Bei -20 °C eingefrorenes und kryokonserviertes FMT aus der Humanmedizin erzielte eine ähnliche Wirksamkeit wie die frische Suspension (HAMILTON et al. 2012; SATOKARI et al. 2015).

Umfangreiche Erfahrungswerte zur Therapie der FMT fehlen noch sowie die Anwendbarkeit bei verschiedenen Diagnosen. Bisherige Indikationen sind antibiotikainduzierte Colitis oder undifferenzierte Darmentzündungen mit Durchfall (MULLEN et al. 2016), wobei perspektivisch auch *C. difficile*-Infektionen sowie chronisches Ausscheiden von *Salmonella spp.* in Studien vorstellbar wären. Es wurde teilweise beobachtet, dass die normale kommensale Darmflora eine über IL-16 induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten über die Darmschleimhaut stimuliert (HASEGAWA et al. 2012). Mit einer FMT besteht die Möglichkeit vor septikämischen Komplikationen zu schützen, jedoch sind noch einige Untersuchungen notwendig, so z. B. welchen Einfluss die Magensäure oder die enzymatische Verdauung auf die Applikationsform der equinen FMT hat, wie erheblich das Transplantatrisiko bezüglich der Übertragungen von anderen Erkrankungen sein kann oder wie hoch die Gefahr einer eintretenden Bakteriämie einzuschätzen ist. Besonders bei Fohlen könnte der Einsatz risikobehaftet sein, da deren Darmflora und Immunsystem sensibler auf mikrobiellen Fremdeintrag reagieren, was eine unerwünschte Immunreaktion stimulieren kann (WEESE und ROUSSEAU 2005; SCHOSTER et al. 2016).

2.6 Molekulargenetische Methoden zur Analyse der Mikrobiota

Durch die große Variation der Kultivierbarkeit von Keimen sowie die begrenzte Detektion über die Kultur für bestimmte mikrobielle Organismen und den sehr hohen Zeitaufwand in der Analyse waren Forschungen innerhalb der intestinalen Mikrobiota zu Diversität und Quantität in der Vergangenheit erschwert worden (AMANN und FUCHS 2008; COSTA et al. 2015a). Die modernen Methoden aus dem Fachbereich der Molekularbiologie beschleunigen derzeit Analysen und vor allem die Detektion neuer Phyla.

2.6.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) integriert klassische Verfahren der Zytogenetik als auch neue molekulargenetische Technik (BULLERDIECK 2006). Es ist möglich mit der FISH direkt und spezifisch Nukleinsäuren (DNA, RNA) direkt in den Zellen, Zellkomponenten und Chromosomen nachzuweisen. Dabei werden doppelsträngige Nukleinsäuren zuerst temperaturabhängig denaturiert und mit der denaturierten Sonde komplementär an die Nukleinsäure gebunden (PRICE 1993; AMANN et al. 2001; WAGNER et al. 2003). Zur Detektion enthält die Sonde einen fluoreszierenden Marker (DE LONG et al. 1989).

Die *in situ* Hybridisierung benötigt dabei keine vorangestellte Isolierung von Nukleinsäuren sondern die Nukleinsäuren werden in ihrer ursprünglichen Struktur, am Zellkern oder an Chromosomen gebunden, hybridisiert und anschließend werden die einzelsträngigen Nukleinsäuren durch die komplementäre Basenpaarbindung zu einem Doppelstrang wieder zusammengefügt (Doppelhelix-Struktur) (JOHN et al. 1969; PARDUE und GALL 1969).

Als Gensonden werden bevorzugt rRNA-gerichtete Sonden, also synthetisch hergestellte ribosomale RNA-Oligonukleotidsonden verwendet, die nicht weniger als 15 und nicht mehr als 30 Basenpaare enthalten. Dieser Kompromiss ergibt sich einerseits aus der Spezifität, die sich mit zunehmender Länge der Sonde erhöht und andererseits aus der Tatsache, dass damit die Fähigkeit verloren geht die Zellwand von Bakterien zu durchdringen (MOTER und GÖBEL 2000). Die Fluoreszenzfarbstoffmarkierung erfolgt am 5'-Ende des Stranges. Das Prinzip der FISH-Technik wurde von DE LONG et al. (1989) erstmalig publiziert.

Gegenüber der Kultur ermöglicht die FISH eine schnellere Identifizierung von Mikroorganismen, wenn speziell nach ihnen gesucht wird. Die Detektion erfolgt nur zielgerichtet über die Auswahl spezieller markierter Sonden, eine Suche nach unbekanntem Mikroorganismen ist daher nicht möglich. Dennoch lassen sich Nachweise direkt im Material erbringen (AMANN et al. 1995; BLASCO et al. 2003).

Für die Auswertung ist ein Epifluoreszenzmikroskop notwendig, dessen Anschaffung kostenintensiv ist. Darüber hinaus ist die methodische Bearbeitung mit FISH zügig realisierbar (KEMPF et al. 2000). Die Auswahl der Sonden ist über im Internet frei zugängliche Datenbanken wie beispielsweise „ProbeBase“ (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>) möglich (ALM et al. 1996; LOY et al. 2007). In den letzten Jahren sind für die Detektion nach Bakterienspezies diverse speziesspezifische wie auch genus- und familienübergreifende Sonden publiziert worden (AMANN et al. 1990; LANGENDIJK et al. 1995; MANZ et al. 1996; MEIER et al. 1999; KEMPF et al. 2000). AMANN et al. (1990) veröffentlichten die stammübergreifende Eubakterien-Sonde, die

hauptsächlich für die Domäne *Bacteria* (EUB338) nutzbar ist. Spezifischer für die Gattung *Bifidobacterium spp.* ist die Oligonukleotidsonde Bif164 von LANGENDIJK et al. (1995) einsetzbar. Üblicherweise werden für die Detektion von Prokaryoten vorrangig 16S- und seltener 23S-rRNA als Zielsequenz für rRNA-zielgerichtete Oligonukleotid-Sequenzen herangezogen (AMANN et al. 1990, AMANN et al. 2001; WAGNER et al. 2003; ZWIRGLMAIER 2005; SWIDSINSKI 2006). Die ribosomale RNA ist als Zielstruktur gut geeignet, da in vitalen und stoffwechselaktiven Bakterienzellen weit höhere Mengen an rRNA pro Zelle vorliegen (LUDWIG und SCHLEIFER 1994). Daher wird empfohlen das Material möglichst zeitnah zu untersuchen, denn je mehr Bakterienzellen absterben oder ruhen, umso schwächer wird das Signal sein und kann die Detektion so möglicherweise verfälschen (OTTOW 2011).

Neben der Lebensfähigkeit der Bakterien bestimmen weitere Faktoren das Gelingen der FISH. Bedeutsam ist dabei die Durchlässigkeit der bakteriellen Zellwand für das Sondenmaterial. Mit Zugabe von Lysozym kann die aus Peptidoglykanen bestehende Zellwand von grampositiven Bakterien lysiert werden, jedoch sind individuelle Lysezeiten für spezifische Sonden/Erreger anzuwenden, damit die Bakterien vital bleiben (AMANN et al. 1990). Des Weiteren ist die Hybridisierungstemperatur genau für die Sonde zu berechnen, denn es findet keine Hybridisierung bei zu niedrigen Temperaturen statt, aber auch bei zu hohen Temperaturen kann die Hybridisierung fehlerhaft verlaufen (BROWN 2002). Zusätzlich kann die Anwendung von Formamid die Hybridisierungstemperatur um 0,63 °C je Prozentanteil senken und die Bildung von DNA/RNA-Hybriden begünstigen (HOFF et al. 2007). Werden pro Hybridisierungsansatz mehrere Sonden verwendet, sollten nur bestimmte Kombinationen gewählt werden. Außerdem sind die Fluorochrome stark lichtempfindlich, daher sollte die Präparation und Auswertung in abgedunkelten Räumen stattfinden oder gewisse Eindeckmedien mit Fluoreszenzschutz ergänzend verwendet werden (MOTER und GÖBEL 2000). Zuletzt können bestimmte Materialien für eine Autofluoreszenz sorgen und in der Auswertung störend sein (ALBER 1999).

Im Fachbereich der Veterinärmedizin wurden in den letzten Jahren einige Publikationen unter Verwendung der FISH-Methode publiziert. Mit Fokussierung auf den Gastrointestinaltrakt wurde die eubakterielle Sonde bei Hunden, die an Colitis erkrankt waren, untersucht (MANSFIELD et al. 2009) und bei Kälbern das Vorkommen von *Bifidobacterium spp.* analysiert (VLKOVÁ et al. 2008). Bei Pferden wurde mit Hilfe der FISH die Veränderung der Darmflora bei der Entwicklung von Hufrehe charakterisiert (MILINOVICH et al. 2007). Darüber hinaus gab es diverse Untersuchungen zu anderen infektiösen Erkrankungen wie Dermatitis oder Abort, in denen die FISH als ein möglicher Erregernachweis genutzt wurde (BOYE et al. 2006; KLITGAARD et al. 2008). Eine umfangreiche Studie über den Direktnachweis von veterinärpathogenen Erregern mittels FISH veröffentlichte GEY (2010).

2.6.2 Andere Methoden

Während die kulturbasierte Differenzierung nach Morphologie, Anzucht- und Vermehrungsverhalten sowie Stoffwechsel- und Hämolyseeigenschaften unterscheidet, basieren molekulargenetische Methoden auf dem Grundprinzip der Differenzierung aus dem genomischen Material. So können auch Speziesidentifizierungen von kulturierten Bakterien gelingen. Aufgrund der Tatsache, dass nicht alle Bakterien kultivierbar sind, erleichtert die molekulargenetische Verfahrensweise die Suche nach neuen Phyla erheblich. Als hochsensitive Methode gilt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der DNA-Material erst isoliert und dann amplifiziert wird. Die Polymerase-Kettenreaktion wird anschließend über eine Gelelektrophorese sichtbar gemacht (AMANN et al. 1995). Für die Verwendung des PCR-Produktes erfolgt danach die Aufreinigung und Sequenzierung. Jedoch können sowohl lebende als auch tote Bakterienzellen detektiert werden (JOSEPHSON et al. 1993; MASTERS et al. 1994), da die DNA lange nachweisbar bleibt, auch nachdem alle lebensfähigen Organismen eliminiert worden sind (MASTERS et al. 1994; DEERE et al. 1996; HELLYER et al. 1999). Für das sichere Nachweisen von lebensfähigen (stoffwechselaktiven) Formen besteht die Möglichkeit mRNA zu verwenden (JOU et al. 1997; OTTOW 2011). Für die RNA wird über die reverse Transkriptase eine komplementäre DNA-Sequenz geschrieben und diese dann ebenfalls amplifiziert. Die Realtime-PCR ist mittlerweile ein vollautomatisches Verfahren über fluoreszierende Gensonden, wobei während des Ablaufens der Reaktionen in Echtzeit Daten erstellt werden. Zudem laufen weitere Identifizierungen über rRNA-16S-Sequenzierung oder 23S-Sequenzierung (AMANN et al. 1995), Massenspektrometrie sowie Hochdurchsatzsequenzierung, die ohne das gesuchte Gesamtgenom vorher zu kennen, ungerichtet sequenzieren, alternativ zur 1-Gen-Fokussierung (KIRCHER und KELSO 2010; REUTER et al. 2015).

BIRCH et al. (2001) verglichen sowohl PCR, RT-PCR und Nukleinsäuren-Sequenz-Amplifikation und stellten heraus, dass die Persistenz von Nukleinsäuren nach Hitzetötung der Zellen noch bis zu 30 Stunden nach deren Tod im Gegensatz zur Kontrolle im Kulturmedium nachgewiesen werden konnte. Daher wird empfohlen dies bei der Verwendung molekularbiologischer Technologien in Studien zu beachten und nicht restlos auf das Kulturmedium zu verzichten (BIRCH et al. 2001).

3. Ergebnisse

3.1 Publikation

Nicole Graneß, Alexander Swidsinski, Monika Krüger, Katharina Ehlers, Corinna Arnold, Gerald Fritz Schusser

Quantitative Analyse der fäkalen bakteriellen Mikrobiota mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bei Pferden unter Antibiotikatherapie und Präbiotikumapplikation

Berl Münch Tierärztl. Wschr 2018, aop.

Eigenanteil:

Das Forschungsprojekt hatte Prof. Dr. Gerald Fritz Schusser der Doktorandin Nicole Graneß überlassen und die Disposition wurde gemeinsam erarbeitet. Prof. Dr. Krüger und Dr. Swidsinski haben Nicole Graneß in die Probenanalytik eingearbeitet. Die Auswahl, Erfassung und Aufbereitung der Patientendaten für die vorliegende Studie wurden eigenständig von Nicole Graneß durchgeführt. Die Probensammlung erfolgte durch Nicole Graneß mit Unterstützung von Dr. Arnold und Dr. Ehlers. Die Bearbeitung der Proben, Transport und Probenanalytik im Molekularlabor der Abteilung Gastroenterologie der Charité Berlin wurden selbständig von Nicole Graneß absolviert. In der Auswertung der Daten wurde Nicole Graneß von Dr. Swidsinski unterstützt. Die gesammelten Daten wurden von Nicole Graneß statistisch ausgewertet und die Ergebnisse als Tabellen und Abbildungen für die Verwendung im Manuskript von ihr bearbeitet. Das Manuskript wurde von Nicole Graneß verfasst, wobei Prof. Dr. Gerald Fritz Schusser unterstützend mitwirkte. Der Eigenanteil von Nicole Graneß an der Publikation beträgt 95%.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr
DOI 10.2376/0005-9366-17051

© 2018 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
schusser@vetmed.uni-leipzig.de

Eingegangen: 16.06.2017
Angenommen: 21.12.2017

Online first: 13.02.2018
<http://vetline.de/facharchiv/158/3222>

Zusammenfassung

Summary

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2018/17051 \$ 15.00/0

Medizinische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig¹
Molekulargenetisches Labor, Gastroenterologie, Charité Humboldt Universität, Berlin²
Bio CHECK, Labor für Veterinärdiagnostik und Umwelthygiene GmbH, Leipzig³

Quantitative Analyse der fäkalen bakteriellen Mikrobiota mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bei Pferden unter Antibiotikatherapie und Präbiotikumapplikation

Analysis of the fecal microbiome in horses in association with antibiotic and prebiotic treatment

Nicole Graneß¹, Alexander Swidsinski², Monika Krüger³, Katharina Ehlers¹, Corinna Arnold¹, Gerald F. Schusser¹

In dieser Studie wurde der Einfluss der Antibiotika Amoxicillin und Gentamicin sowie eines Präbiotikums, das Huminsäuren WH67, Topinambur, Grün- und Reismehl enthielt, auf die fäkale, bakterielle Mikrobiota untersucht. Es wurden 62 Pferde in vier Gruppen untersucht. In den Gruppen 1 und 2 waren 17 und 11 darmgesunde Pferde und in den Gruppen 3 und 4 24 und 10 Pferdepatienten, die antibiotisch behandelt wurden. Alle Pferde hatten freien Zugang zu Heu und Wasser, die Pferde aus den Gruppen 2 und 4 erhielten zusätzlich einmal täglich das Präbiotikum über 7 Tage. Kotproben wurden initial (Tag 0) vor Beginn der Supplementierung und antibiotischen Behandlung sowie an den Tagen 3, 5 und 7 gesammelt. Diese wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) analysiert und Bakterienzahlen über ein Epifluoreszenzmikroskop strukturiert gezählt. Es wurde die *Bacteria*-spezifische Sonde EUB338 gewählt, außerdem CF319a für die Cytophaga-Flavobacteria-Klasse des Phylum Bacteroidetes sowie eine *Bifidobacterium*-spezifische Sonde Bif164. Der Einfluss der Antibiotika in Gruppe 3 erzeugte eine nicht signifikante Verringerung ($p = 0.1842$) der *Bacteria*-Zahl zum Tag 3, die ab Tag 5 wieder anstieg. Das Präbiotikum in Gruppe 4 bewirkte eine Erhöhung der *Bacteria*-Zahl am Tag 7. Die Bifidobacteriaceae zeigten keine Änderung der Bakterienzahlen in den Gruppen. Die Cytophaga-Flavobacteria-Klasse der Gruppe 3 reagierte auf antibiotische Behandlung nicht. Bei den gesunden Pferden mit Präbiotikum (Gruppe 2) kam es zu einer geringfügigen Erhöhung der Bakterienzahlen für EUB338-detektierbare Bakterien im Vergleich zu Gruppe 1. Amoxicillin und Gentamicinsulfat können somit bezüglich der Auslösung einer antibiotikaassoziierten Diarrhoe als sichere Antibiotika angesehen werden.

Schlüsselwörter: Antibiotika-assoziierte Diarrhoe, Colitis, FISH, Präbiotikum, Pferd

The study investigated the influence of the antibiotics amoxicillin and gentamicin in the fecal bacterial microbiota, as well as the effect of a prebiotic containing humic acids WH67, Jerusalem artichoke and rice flour. 62 horses were included and were divided into four groups, all fed with hay and free access to water. Group 1 contained 17 healthy horses and 11 healthy horses formed group 2 which received prebiotic over a period of 7 days. Group 3 included 24 equine patients which were treated with the antibiotics amoxicillin and gentamicin. Group 4 included 10 horse patients which were treated with antibiotics and prebiotic orally once daily. Fecal samples were collected on days 0, 3, 5 and 7. The fecal specimens were analyzed using fluorescence in situ hybridization (FISH) and numbers of bacteria were counted by an epifluorescence microscope. The specific probe EUB338 was selected to detect most bacteria of the domain *Bacteria*, the probe CF319a for detection of Cytophaga-Flavobacteria class, Phylum Bacteroidetes, and the probe Bif164 for detection of *Bifidobacterium*. Under the influence of these antibiotics, the numbers of *Bacteria* in group 3 decreased not significantly ($p = 0.1842$) on day 3 and stabilized until day 7 in comparison to

group 1. The numbers of *Bacteria* in group 4 decreased until day 5 but increased on day 7. The numbers of Cytophaga-Flavobacteria class in group 3 remained consistent. In healthy horses of group 2 prebiotic increased the numbers of the bacteria detectable with EUB338 and CF319a probes. Thus amoxicillin and gentamicin could be classified as safe antibiotics with no concern of induction of antimicrobial-associated diarrhea.

Keywords: microbiota, antibiotic-associated diarrhea, colitis, FISH, prebiotic, horse

Einleitung

Darmgesundheit ist derzeit nicht nur in der Humanmedizin ein aktuelles Thema, auch in der Veterinärmedizin erfährt es in den letzten Jahren zunehmendes Interesse. Beim Pferd ist die Bedeutung besonders groß, da gastrointestinale Erkrankungen wie Kolik und Diarrhoe (speziell Enteritis, Enterocolitis, Typhlocolitis und Colitis) schwerwiegende akute Krankheiten mit progressiven Verläufen in allen Altersgruppen bei Equiden darstellen (Reed, 2010). Speziell diese Erkrankungen sowie auch die Hufrehe des Pferdes oder Grass Sickness beziehen sich auf Störungen der symbiotischen Beziehung (Dysbiose) zwischen Mikroorganismen im Darm und dem Wirtsorganismus (Al Jassim und Andrews, 2009; Garrett et al., 2002; Milinovich et al., 2007; Costa et al., 2012). Eine Dysbakteriose stellt ein Ungleichgewicht zwischen den kommensalen und pathogenen Bakterien dar (Shi et al., 2017). Da das kommensale Mikrobiom die Reifung der Darmschleimhaut reguliert und mit dem Immunsystem interagiert (Schoster, 2015; Shi et al., 2017), können pathogene Mikroorganismen zu Immunitätsstörungen führen. Bakterielle Dysbalancen, also ein stärkeres Wachstum opportunistischer Darmbakterien gegenüber der Normalflora, sind begünstigende Faktoren für die Manifestierung pathogener Bakterien (Ley et al., 2006).

Als bekannte darm-pathogene Bakterien gelten *Salmonella* spp., toxinbildende Stämme von *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* und enterotoxische *Escherichia coli*. Diese pathogenen Keime können beim Pferd eine schwere Colitis mit wässrigem Durchfall, hochgradiger Dehydratation, Septikämie und schließlich Exitus letalis hervorrufen (Feary und Hassel, 2006).

Auch der Einfluss von Antibiotikatherapien kann zu Beeinträchtigung der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota beim gesunden Pferd führen. Antibiotikaassoziierte Diarrhoe (AAD) infolge antibiotischer Behandlung mit antimikrobiellen und prokinetischen Einflüssen auf die intestinale Darmflora und die Darmmotilität sind bereits in mehreren Studien beim Pferd beschrieben (Roussel et al., 2000; Weese, 2000; Roussel et al., 2003; Gustafsson, 2004; McGorum und Pirie 2009; McGorum und Pirie, 2010; Barr et al., 2013).

Die Problematik der AAD ist bereits länger bei verschiedenen Substanzen beobachtet worden (Bartlett, 1992; Weese, 2000; Gustafsson, 2004). Zusammenhänge wurden beim Einsatz von Trimethoprim-Sulfadiazin (oral) und Ceftiofur (Harlow et al., 2013) oder Penicillin (Grønvald et al., 2010) beobachtet, wobei Harlow et al. (2013) eine Reduzierung der Anzahl an zellulolytischen (fibrolytischen) Bakterien sowie der Gattung *Lactobacillus* unter antibiotischer Behandlung feststellten. Inwieweit eine Verschiebung der intestinalen Mikroflora zu Problematiken führte, war nicht genau abschätzbar. Unter dem Einsatz von Tetracyklinen waren Erhöhungen

von *Clostridium perfringens* bei gleichzeitiger Verringerung von natürlich vorkommenden Kommensalen festzustellen (White und Prior, 1982). Bei Gabe von Erythromycin erkrankten vier von sechs Pferden an Colitis mit deutlicher Reduzierung von Vertretern der grampositiven und anaeroben, mikrobiellen Normalflora und deutlicher Erhöhung der koloniebildenden Einheiten der Anaerobia *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens* (Gustafsson et al., 1997). In der jüngsten Studie von Costa et al. (2015b), wurde aufgezeigt, dass Procainpenicillin intramuskulär, Ceftiofur intramuskulär oder Trimethoprim-Sulfadiazin oral verabreicht Diversitätsänderungen der intestinalen bakteriellen Mikrobiota hervorrief. Trimethoprim-Sulfadiazin verursachte eine signifikante Reduzierung der intestinalen Bakteriendiversität. Diarrhoe oder Colitis wurden jedoch nicht ausgelöst (Costa et al., 2015b).

Um durch Antibiotika entstandene Destabilisierungen der mikrobiellen Besiedlung der Darmschleimhaut und dadurch eine Begünstigung der Proliferation von pathogenen oder opportunistischen Bakterien hervorzurufen, soll der Einsatz von Probiotika oder Präbiotika über eine Wachstumsförderung und Stabilisation der normalen Darmflora (Mikrobiom) helfen (Park und Floch, 2007).

Probiotika werden definiert als „lebende Mikroorganismen, die, wenn sie in adäquaten Mengen verabreicht werden, dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen bringen“ (FAO/WHO, 2002). Probiotika enthalten lebensfähige Mikroorganismen, die direkt auf das Darmmilieu einwirken. Sie siedeln sich nicht direkt an und sind nur temporär lebensfähig, beeinflussen aber den pH-Wert und die anaerobe Darmflora (Rolfe, 2000; Schoster et al., 2014). Als Futtermittelzusatzstoffe werden sie in Europa durch die EU-Verordnung Nr. 1831/2003 für einen begrenzten Zeitraum von 10 Jahren für spezifische Tierarten und Indikationen zugelassen. Eingesetzte Mikroorganismen in Probiotika für Pferde sind Hefearten wie *Saccharomyces cerevisiae*, Milchsäurebakterien wie *Enterococcus faecium* und *Lactobacillus rhamnosus* oder aber auch *Escherichia coli* (Zentek et al., 2008; Schoster, 2015). Die Liste der Futtermittel mit zugelassenen Zusatzstoffen, herausgegebenen vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittel (BVL), beinhaltet für Pferde als Darmflorastabilisator ausschließlich *Saccharomyces cerevisiae*, welcher die Ballaststoffverdaulichkeit verbessern soll. Randomisierte Kontrollstudien über den Einsatz von Probiotika sind derzeit noch im Anfangsstadium und Vergleiche sind durch unterschiedliche Produkte und Dosierungen schwierig, zumal die Dosierungsempfehlungen aus der Humanmedizin bezogen werden (Schoster, 2015). Bisher sind nur unzureichende Ergebnisse über eingesetzte Bakterien und Pilze (Hefen), Mengen und Herstellung der Produkte vorhanden (Schoster et al., 2014; Coverdale, 2016). Schoster et al. (2015) und Weese und Rouseau (2005) betonten sogar

die Gefahr beim Einsatz von Probiotika bei Jungtieren durch die noch fehlende Stabilität der eigenen Mikroflora. Produkte, die nur zur Wachstumsförderung der intestinalen Darmflora bzw. den probiotischen Stämmen dienen und keine lebenden oder abgetöteten Mikroorganismen enthalten, werden als präbiotisch wirksame Substanzen bezeichnet. Präbiotika sind vorwiegend nicht durch körpereigene Enzyme spaltbare Substrate mit definierter Wirkung der „selektiven Stimulation des Wachstums und/oder Aktivität einer oder einer begrenzten Anzahl von Mikroorganismen im Darm, die ihrem Wirt gesundheitliche Vorteile verleihen“ (Roberfroid et al., 2010). Eingesetzte Stoffe wie Inulin, Lactulose und Oligofruktose sollen vor allem Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. sowie *Bifidobacterium* spp. stimulieren, die wiederum durch ihren Einfluss auf den luminalen pH-Wert, das Besetzen von Bindungsstellen, die Bildung von Bakteriozinen, die Stimulation der Muzinbildung sowie auf die Steigerung der Stoffwechselprodukte Laktat und flüchtige Fettsäuren die autochthone Mikroflora des Darms stabilisieren (Berg et al., 2005; Zentek et al., 2008; Endo et al., 2009). Inulin beispielsweise ist seit über 10 Jahren als Präbiotikum in der Tierfütterung bekannt. Untersuchungen zeigten, dass Fruktane, wie Inulin, nur durch mikrobielle Fermentation abgebaut werden können, insbesondere durch Bifidobakterien, aber auch Lactobazillen, Clostridien oder Streptokokken (Roberfroid und Delzenne, 1998), deren Bakterienkonzentrationen unter dieser Fütterung stiegen. Jedoch stehen übermäßige Aufnahmemengen der Fruktane im Verdacht Hufrehe hervorzurufen (Pollitt und van Eps, 2002; Mößler, 2004), da Inulin sehr schnell präzäkal als auch zäkal mit Steigerung der Produktion von Laktat und kurzkettigen Fettsäuren fermentiert wird, deren schneller Anstieg wiederum zu intestinalen Störungen führen kann (Plumhoff, 2004; Coenen et al., 2006). Daher sollten die Auswirkungen von präbiotisch wirksamen Kohlehydratsubstanzen im Hinblick auf die Auslösung von Dysbiosen oder Hufrehe nicht unterschätzt werden (Bailey et al., 2003; Plumhoff, 2004). Glatter et al. (2016) überprüften den Einfluss von Inulin in der Pferdefütterung auf Änderungen des pH-Wertes bzw. die Quantität von gebildeten flüchtigen Fettsäuren und konnten nur marginale Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen feststellen. Das in der vorliegenden Studie verwendete Präbiotikum enthält Topinambur. Der gemessene Gehalt an Inulin in dem eingesetzten Topinamburmehl liegt innerhalb der Empfehlungen von präbiotisch aktiven Substanzen für Pferde mit 0,2 g pro kg KM (Julliand und Zeyner, 2008). Hauptbestandteile im eingesetzten Präbiotikum sind hochmolekulare Huminsäuren mit > 10000 Dalton. Die dunkelgefärbten, organischen Naturstoffe aus dem Boden (Souci, 1956; Sommer, 1960) sind bereits längere Zeit in der Tierfütterung als Futterzusatzstoff, besonders bei unspezifischen Durchfallerkrankungen, im Einsatz. Neben den floraregulierenden Eigenschaften der Huminsäuren sind die Stabilisierung der Mukusbarriere, der Schutz des Darmschleimhautepithels (Golbs, 1983; Götze, 1986), die antimikrobielle Wirkung (Zhang et al., 2000) und die Adsorption von toxischen Substanzen (Golbs, 1983; Kühnert et al., 1989; Stein, 1994) und Wasser aus dem Darmlumen durch Huminsäuren beschrieben. Huminsäuren werden pharmazeutisch als ungefährlich eingestuft, da eine Absorption und Akkumulation in Organen nicht nachgewiesen wurde (Kühnert et al., 1989; Stein,

1994; Kühnert et al., 1994; Lange et al., 1996; Produktinformation Pharmawerk Weinböhla, 2000; Buesing et al., 2014).

Neben dem Einsatz von Pro- und Präbiotika hat die Zusammensetzung der Rationen ihren ganz eigenen Einfluss auf die Homöostase der equinen, intestinalen Mikroflora. Da das Pferd hauptsächlich Grobfutter (Grünfutter, Silage, Heulage, Heu und Stroh) verdaut, ist von einer Prädominanz zellulolytischer (fibrolytischer) Bakterienarten auszugehen. In wissenschaftlichen Untersuchungen der intestinalen Mikrobiota des Pferdes waren die Vertreter der zellulolytischen Bakterien der Spezies *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* und *Fibrobacter succinogenes* nicht dominant (Julliand et al., 1999; Julliand und Grimm, 2016). Dennoch wird den Ruminokokken eine Schlüsselfunktion in der intestinalen Mikrobiota zugeschrieben (Julliand und Grimm, 2016). In den jüngsten Untersuchungen in Hinblick auf futtermittelabhängige Veränderungen des Mikrobioms in den Fäzes beim Pferd verglichen Dougal et al. (2014) faserreiche, faser- und ölrreiche sowie faser- und stärkereiche Rationen. Jedes der 17 Pferde bekam die drei unterschiedlichen Rationen gefüttert. Dabei zeigten sich signifikante Veränderungen der qualitativen Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota bei den verschiedenen Rationen und gleichzeitig eine reduzierte Vielfalt des Mikrobioms bei älteren Equiden. Der Stamm Firmicutes dominierte mit 45 %, gefolgt von Bacteroidetes mit 37 % und von den Phyla Proteobacteria, Spirochaetae und Actinobacteria mit 0,5–3,5 % in der Fäzes dieser Pferde (Dougal et al., 2014). Costa et al. (2015a) lieferten mit der neuen Hochdurchsatzsequenzierungsmethode Ergebnisse bezüglich der intestinalen Mikrobiota in verschiedenen Kompartimenten des Pferdedarmes. Sie bestätigten die stark variiende Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms in den einzelnen Abschnitten des Pferdedarmes sowie das dominierende Auftreten des Phylum Firmicutes in der bakteriellen Population in allen untersuchten intestinalen Kompartimenten sowie in Fäzes (Costa et al., 2015a). Auf Klassenebene der Taxonomie waren Clostridia-Vertreter überdurchschnittlich repräsentiert, vor allem im Bereich des Blinddarmes und des Grimmdarmes (Colon ascendens). Einen weiteren Zusammenhang in der Abhängigkeit der Substrataufnahme besteht im Maß und Umfang der intestinalen mikrobiellen Fermentation von Gerüstkohlenhydraten, die durch körpereigene Enzyme nicht abgebaut werden können. Die Quantität der gebildeten flüchtigen Fettsäuren (FFS) ist stark abhängig von der Fütterung. Fällt mehr Zellulose an, steigt der Gehalt an Acetat, während Oligosaccharide oder Pektine die Bildung von Butyrat fördern. Butyrat gilt als bedeutende Energiequelle für Darmepithelzellen (Roediger, 1980; Cummings und Englyst, 1987; Hamer et al., 2008) und zeigte in In-vitro- und In-vivo-Modellen wachstumsfördernde und immunmodulatorische Einflüsse auf Epithelzellen der Colonozysten (Vernia et al., 2003; Kumar et al., 2009). Ebenso begünstigen Bakterien aus der Klasse der Clostridia wie die Familien Lachnospiraceae und Ruminococcaceae (Dougal et al., 2014; Costa et al., 2015a) sowie Prevotellaceae und Fibrobacteraceae (Dougal et al., 2014) die Bildung von Butyrat. Aufgrund dieser Gegebenheiten sind Anaerobier besonders bedeutsam und werden als Hauptbestandteile der intestinalen, mikrobiellen Gemeinschaft angesehen (Dougal et al., 2013, 2014; Costa et al., 2015a). Schließlich zeigten Glatter

et al. (2016) unter Inulinfütterung beim Pferd nur eine insgesamt geringfügige Steigerung der Produktion an Butyrat.

Zu Beginn der Erforschung der Mikrobiota standen kulturbasierte Methoden im Vordergrund, doch die Kultivierbarkeit der Keime variierte sehr stark (Costa et al., 2015a; Amann und Fuchs, 2008; Costa et al., 2015a). Moderne Methoden aus dem Fachbereich der Molekularbiologie beschleunigen die Analysen und die Suche nach neuen Phyla. Seit Einführung der DNA-Sequenzierung und mit Vorhandensein großer Datenbanken des sequenzierten Materials ist es möglich, kulturunabhängig das Genom von Mikroorganismen zu detektieren und zu analysieren. Aktuell ermöglicht die Hochdurchsatzsequenzierung die Detektion des gesamten Genoms einer Spezies (Kircher und Kelso, 2010; Reuter et al., 2015). Mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist es ebenfalls möglich, direkt und spezifisch Nucleinsäuren (DNA, RNA) in Zellen, Zellkomponenten und Chromosomen nachzuweisen. Die FISH-Technik wird in dieser Studie zum Nachweis von ribosomaler RNA (rRNA) der Bakterienspezies verwendet (16S-rRNA-Gensequenzdaten). Die FISH ermöglicht damit eine schnelle Identifizierung der Bakterienspezies unter Verwendung von rRNA-spezifischen Oligonukleotidsonden (Amann et al., 2001).

In dieser Studie wurde zur Identifizierung und Quantifizierung der Bakterien in Fäzes von Pferden das FISH-Protokoll nach Swidsinski et al. (2005) und Swidsinski (2006) eingesetzt. Ziel der ersten Studie war die quantitative Analyse der fäkalen Mikrobiota mithilfe ausgewählter Oligonukleotidsonden spezifischer Bakterien bei darmgesunden Pferden und kranken Pferden mit Antibiotikatherapie. Im zweiten Teil der Untersuchung wurde die Wirkung eines Präbiotikums auf die fäkale Mikrobiota bei Pferden mit Antibiotikatherapie geprüft.

Material und Methoden

Pferde

Die Kotproben zur Untersuchung der Mikrobiota stammten aus folgenden Gruppen:

- Gruppe 1: N = 17, darmgesunde Pferde, kein AB, kein Präbiotikum
- Gruppe 2: N = 11, darmgesunde Pferde, kein AB, Präbiotikum
- Gruppe 3: N = 24, Pferde mit Vorerkrankungen, AB-Therapie, kein Präbiotikum
- Gruppe 4: N = 10, Pferde mit Vorerkrankungen, AB-Therapie, Präbiotikum

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Charakteristika der Pferde in den vier Gruppen. Für die Aufnahme der Pferde in die Gruppen 1 und 2 durfte keine gastrointestinale Krankheit bekannt und die Kotkonsistenz musste physiologisch sein. Weiterhin wurde vor Aufnahme der Tiere in eine der Gruppen die Zahngesundheit überprüft. Die Zuteilung der Pferde erfolgte in Gruppe 1 und Gruppe 2 und in umgekehrter Gruppenfolge. Bei den Pferdepatienten in Gruppe 3 und Gruppe 4 waren folgende Erkrankungen diagnostiziert worden: Septikämie, Endometritis, Aspirationspneumonie, Bronchitis, Pneumonie, Hepatopathie, Enteritis, Enterocolitis sowie Colitis (Tab. 1). Wie für die ersten beiden Gruppen erfolgte auch hier die Zuordnung randomisiert. Die eingesetzten

Antibiotika waren Amoxicillin (15 mg/kg, i. v., 2x/d) und Gentamicinsulfat (6,6 mg/kg, i. v./d) in Kombination. Die Pferde waren nicht vorbehandelt, sondern die Diagnose wurde erst in der Medizinischen Tierklinik gestellt und eine Behandlung angeschlossen. Die erste Kotprobenentnahme erfolgte vor der ersten Antibiotikagabe. Nach der ersten Antibiotikagabe erfolgte anschließend die Applikation des Präbiotikums für Gruppe 4. Das Einverständnis der Besitzer, das Präbiotikum oral zu verabreichen, lag vor.

In die Studie wurden 62 Pferde einbezogen. 32 Pferde waren zwischen 3 und 17 Jahre alt, 24 Pferde über 18 Jahre alt und 3 Pferde in der Altersgruppe 6 Monate bis 2 Jahre sowie 3 Fohlen unter 6 Monaten (3 Wochen, 3 Monate und 5 Monate alt). Es wurden 25 Stuten, 32 Wallache und 5 Hengste untersucht. In der Studienpopulation dominierte das Deutsche Warmblutpferd mit 33 Vertretern (Tab. 1). Die Gruppe 1 umfasste 17 darmgesunde Pferde. Elf weitere darmgesunde Pferde bildeten die Gruppe 2 mit Supplementierung des Präbiotikums. Pferdepatienten der Medizinischen Tierklinik, die antibiotisch behandelt wurden, bildeten die übrigen Gruppen mit 24 Pferden in Gruppe 3 mit ausschließlicher Antibiotikatherapie und mit 10 Pferden für Gruppe 4, die Antibiotika plus Präbiotikum erhielten. Fünf Pferde mit akuter Colitis und Inappetenz in den ersten drei Tagen des Klinikaufenthaltes wurden aus der Gruppe 4 ausgeschlossen, weil diese Pferde das Präbiotikum nicht aufnahmen.

Fütterung

Alle Pferde wurden während der Untersuchungsphase mit Heu in bedarfsgerechten Mengen (1,5 kg/100 kg Körpermasse (KM)/Tag) gefüttert und hatten freien Zugang zu Wasser. Auf Fütterung von Kraftfutter wurde bei den gesunden Pferden einheitlich verzichtet. Die erkrankten Pferde stammten aus inhomogenen Haltungsbedingungen. Innerhalb der Medizinischen Tierklinik war die Basis der Heufütterung (3 Rationen/Tag) bei 1,5 kg/100 kg KM/Tag.

Das eingesetzte pelletierte Präbiotikum ist eine Mischung aus Grün- und Reismehl, Huminsäuren WH67 und Topinamburpulver. Der Rohfasergehalt liegt bei 30 %. Der unverdauliche Anteil kommt zu unterschiedlichen Anteilen aus den genannten Quellen (WH Pharmawerk Weinböhla GmbH, 01689 Weinböhla, Deutschland). Die Präbiotika wurden für alle Applikationen der Gruppe 2 und Gruppe 4 von dem Pharmawerk Weinböhla GmbH geliefert. Der Huminsäureanteil lag bei 15 % und der Anteil an Topinambur-, Grün- und Reismehl war bei 70 %. Die Dosierung des Präbiotikums erfolgte nach Herstellerempfehlung von 1,5 g/kg KM über eine Applikationsdauer von 7 Tagen einmal täglich, nach Abschätzung der Zeit des durchschnittlichen Klinikaufenthaltes von Pferden in der Tierklinik.

Probengewinnung

Die klinische Studie wurde für einen Zeitraum von 2 Jahren durchgeführt (Januar 2015 bis Januar 2017). Die Kotproben wurden rektal entnommen. Die Kotprobenmenge von 1 g wurde unverzüglich in 30 ml modifizierter Carnoy-Lösung verbracht und bei Zimmertemperatur gelagert. Die Kotproben wurden bei Einlieferung des Patienten bzw. zu Beginn der Untersuchung genommen (Tag 0) sowie am 3. und 5. Tag. Die erste Kotprobe wurde vor Gabe der Antibiotika genommen, wobei nur Pferde

TABELLE 1: Anzahl der Pferde in den Gruppen, Alter und Geschlecht. Gruppe 1: darmgesunde Pferde ohne Präbiotikumapplikation, Gruppe 2: darmgesunde Pferde mit Präbiotikumapplikation, Gruppe 3: Pferde mit der beschriebenen Krankheitsursache und Antibiotikabehandlung ohne Präbiotikumverabreichung, Gruppe 4: kranke Pferde mit Antibiotikabehandlung und Präbiotikumverabreichung.

Gruppe	Rasse	Alter	Geschlecht	Krankheit	Tage Antibiotika	
Gruppe 1	Araber-Mix	20 J.	Stute			
	Warmblut	15 J.	Wallach			
	Warmblut	10 J.	Wallach			
	Warmblut	14 J.	Wallach			
	Isländer	16 J.	Wallach			
	Vollblut-Mix	16 J.	Stute			
	Paint Horse	10 J.	Wallach			
	Warmblut	23 J.	Wallach			
	Vollblut	22 J.	Wallach			
	Warmblut	13 J.	Stute			
	Warmblut	16 J.	Stute			
	Haflinger-Mix	10 J.	Wallach			
	Shire Horse	10 J.	Hengst			
	Friese	10 J.	Stute			
	Irish Tinker	20 J.	Wallach			
	Araber	3 J.	Wallach			
	Warmblut	20 J.	Wallach			
Gruppe 2	Traber	16 J.	Wallach			
	Warmblut	24 J.	Stute			
	Haflinger	9 J.	Wallach			
	Warmblut	6 J.	Wallach			
	Friese	18 J.	Wallach			
	Warmblut	9 J.	Wallach			
	Islandpferd	27 J.	Stute			
	Islandpferd	26 J.	Wallach			
	Warmblut	27 J.	Wallach			
	Warmblut	12 J.	Wallach			
	Irish Tinker	14 J.	Wallach			
	Gruppe 3	Haflinger	19 J.	Wallach	Aspirationspneumonie	5 Tage
		Shetlandpony	9 J.	Stute	Septikämie	3 Tage
		Shetlandpony	27 J.	Stute	Colitis	3 Tage
Warmblut		3 J.	Wallach	Pneumonie	7 Tage	
Warmblut		9 J.	Stute	Colitis, Endotoxämie, Hufrehe, †	3 Tage	
Warmblut		24 J.	Wallach	Hepatopathie	3 Tage	
Warmblut		3 Wo.	Hengst	Pneumonie	5 Tage	
Warmblut		1 J.	Hengst	Enterocolitis, †	1 Tag	
Warmblut		11 J.	Wallach	Bronchitis	5 Tage	
Araber-Mix		20 J.	Stute	Endometritis	5 Tage	
Traber		16 J.	Wallach	Aspirationspneumonie	6 Tage	
Warmblut		24 J.	Stute	Septikämie	6 Tage	
Warmblut		15 J.	Wallach	Virusinfektion	3 Tage	
Warmblut		19 J.	Stute	Hepatopathie	5 Tage	
Warmblut		10 J.	Hengst	exsudative Pleuritis	8 Tage	
Warmblut		3 Mo.	Stute	Pneumonie	10 Tage	
Warmblut		4 J.	Stute	Colitis, Endotoxämie, Hufrehe, †	3 Tage	
Warmblut		7 Mo.	Hengst	Pneumonie	7 Tage	
Warmblut		18 J.	Wallach	Colitis	5 Tage	
Warmblut		26 J.	Stute	Aspirationspneumonie	3 Tage	
Friese	9 J.	Wallach	Malignes Ödem	10 Tage		
Warmblut	1 J.	Wallach	Colitis, †	1 Tag		
Minishetlandpony	7 Mo.	Stute	Colitis, †	5 Tage		
Islandpferd	14 J.	Wallach	Septikämie, †	2 Tage		
Gruppe 4	Haflinger	19 J.	Stute	Colitis, Endotoxämie, Hufrehe, †	5 Tage	
	Warmblut	8 J.	Stute	Colitis, †	6 Tage	
	Irish Hunter	9 J.	Stute	Bronchitis	5 Tage	
	Warmblut	21 J.	Stute	Colitis	5 Tage	
	Reitpony	18 J.	Stute	Endometritis	7 Tage	
	Warmblut	25 J.	Stute	Endometritis	5 Tage	
	Traber	17 J.	Wallach	Aspirationspneumonie	6 Tage	
	Warmblut	21 J.	Stute	Phlegmone	5 Tage	
	Warmblut	10 J.	Wallach	Colitis, Endotoxämie, Hufrehe, †	9 Tage	
	Reitpony	15 J.	Stute	Colitis	8 Tage	

† gestorben bzw. euthanasiert

in die Gruppe 3 und 4 inkludiert wurden, die bei Aufnahme in die Medizinische Tierklinik Leipzig noch kein Antibiotikum erhalten hatten. Als abschließende Probe mit mindestens einem Tag ohne Behandlung mit Antibiotika wurde die Probe am 7. Tag gewertet. Dauerte die antibiotische Behandlung länger als sieben Tage, wurde die Probe einen Tag nach Ende der antibiotischen Therapie entnommen und zu den Proben des 7. Tages gezählt. Die modifizierte Carnoy-Lösung wurde als Gemisch in folgendem Verhältnis hergestellt: 6 Teile Ethanol absolut, 6 Teile Eisessig, 1 Teil Chloroform extra pur (Swidsinski, 2006). Die Kotprobe war darin 14 Tage sicher lagerungsfähig.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Diese Untersuchungen wurden im Molekulargenetischen Labor für polymikrobielle Infektionen und bakterielle Biofilme, Gastroenterologie der Charité Berlin, durchgeführt.

Die Kotproben wurden in der modifizierten Carnoy-Lösung homogenisiert und das Sediment auf Objektträgern aufgetragen, getrocknet und mithilfe der FISH untersucht (Swidsinski, 2006; Swidsinski et al., 2005). Dabei werden markierte, synthetisch hergestellte Oligonukleotidsonden verwendet, die sich komplementär zur ribosomalen RNA der zu detektierenden Bakterien spezifisch binden. Die Oligonukleotidsonde wurde mit einem Cy3-reaktiven Fluoreszenzfarbstoff (Sulfoindocyaninsäure) am 5'-Ende synthetisiert (MWG Biotech,

Ebersberg, Deutschland). Sofern eine komplementäre Bindung stattfindet, erfolgt eine Identifizierung und Quantifizierung mittels Epifluoreszenzmikroskop. Die Hybridisierung wurde anhand des Protokolls von Swidsinski (2006) und Swidsinski et al. (2005) durchgeführt. Vier Domänen-, Gruppen- und rRNA-spezifische FISH-Sonden (Oligonukleotidsonden, Tab. 2)

TABELLE 2: Oligonukleotidsonden, die in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendet wurden (Brosius et al., 1981)

Zielgruppe	Bezeichnung der Sonde	Sequenz der Sonde (5' to 3')	Zielposition (rRNA)	Referenz
Domäne <i>Bacteria</i> (phylumübergreifend)	EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S (338–355) ^a	Amann et al., 1990
Gattung <i>Bifidobacterium</i>	Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	16S (164–181) ^a	Langendijk et al., 1995
Phylum Bacteroidetes: Klassen: Cytophaga und Flavobacteria	CF319a	TGGTCCGTGCTCAGTAG	16S (319–336) ^a	Manz et al., 1996
Phylum Firmicutes	LGC354ab	YGGAAGATCCCTACTGC	16S (354–371) ^a	Meier et al., 1999

^a *Escherichia coli*-rRNA-Nummerierung

wurden bei den Kotproben aller Pferde angewendet. Die EUB338-Universal-Bakteriensonde wurde verwendet, um praktisch alle relevanten Bakterien (*Bacteria*) zu detektieren. Die CF319a-Sonde dient zum Nachweis des Phylums Bacteroidetes und dessen zwei Klassen Cytophaga und Flavobacteria als Vertreter gramnegativer Bakterienarten. Eine *Bifidobacterium*-spezifische Sonde Bif164 wurde eingesetzt für die Gattung *Bifidobacterium* der Familie Bifidobacteriaceae, die zu den grampositiven Pionier- bzw. Erstbesiedlern des Intestinaltraktes gehören und daher für die Untersuchung interessant waren. Die vierte Sonde (LGC354ab) wurde für die Zielgruppe des Phylums Firmicutes eingesetzt. In Tabelle 2 sind die verwendeten Oligonukleotidsonden für die FISH-Analyse mit den zugehörigen Referenzen aufgelistet. Die Formamidkonzentrationen und Hybridisierungstemperaturen wurden entsprechend der Sondenbeschreibungen (Referenzen) gewählt. Eine zusätzliche Hybridisierung unter Verwendung eines Permeationsschrittes mit Lysozym wurde nicht mehr durchgeführt.

Mikroskopische Bakterienquantifizierung

Die In-situ-Quantifizierung von Fäkalbakterien wurde durch FISH und 4, 6-Diamidino-2-phenylindol-Färbung (DAPI) unter einem Nikon e600 Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Tokyo, Japan) visualisiert und mit einer Nikon DXM1200 Kamera fotografiert. Die Dokumentation erfolgte mit Software Access, Microsoft Office. Die Zählung von Bakterien wurde nur durchgeführt, wenn Hybridisierungssignale klar und morphologisch als Bakterienzellen durch Identifikation mit universellen und gruppenspezifischen FISH-Sonden und DAPI-Färbung unterscheidbar waren. Für jede gruppenspezifische FISH-Sonde wurde eine eigene Sedimentanalyse der Fäzes angefertigt. Zur Orientierung in der 200- und 400fachen Mikroskopvergrößerung wurde nach aufgelockerten, nicht überlagerten Faserstrukturen gesucht. Die Zählung der Bakterien wurde auf der Grundlage von Amann et al. (1995), Swidsinski (2006) sowie Swidsinski und Loening-Baucke (2017) mit Beachtung der Verdünnungsstufe durch die Inkubation der Probe in modifizierter Carnoy-Lösung (30 ml) ausgeführt. Die Ermittlung der Bakterienzahlen erfolgte visuell in einem der quadratischen Felder des Augennetzes des Okulars des Mikroskops. Eine Bakterienanzahl basiert auf der Erkenntnis, dass 10 µl einer bakteriellen Suspension mit 10⁷ Bakterienzellen/ml auf einem Objektträger eine Kreisfläche mit einem Durchmesser von einem Zentimeter ergeben. Ein mikroskopisches Feld bei 1000facher Vergrößerung hat einen Durchmesser von 200 µm. Daraus ergeben sich 40 Bakterien pro mikroskopischen Feld (Amann et al., 1995; Swidsinski und Loening-Baucke, 2017). Über das mikroskopische Feld wurden 10

Felder des Augennetzes entlang des Gradienten der Verteilung gezählt und durch 10 geteilt. Die Verdünnung von 1 g Kot in 30 ml Carnoy-Lösung wurde ebenfalls berücksichtigt. Die Bakterienanzahl n x 10⁸/ml Kotprobe wurde ermittelt aus = (mittlere, gezählte Anzahl der Bakterien im mikroskopischen Feld x 2500 x 100 x 3 x 10/ml. In Fällen, in denen einzelne Bakterienzellen aufgrund hoher Bakterienzahlen morphologisch nicht unterscheidbar waren und die Fluoreszenz zu einer homogen fluoreszierenden Masse konfluerte, wurde der Bakterienzahl ein Wert von > 10¹² pro ml zugewiesen (Swidsinski, 2006; Swidsinski et al., 2005). Wenn einzelne Bakterienzellen nicht innerhalb des Bakterienteppechs unterscheidbar waren, aber einzelne Lücken erkannt werden konnten, wurde eine Bakterienzahl mit einem Wert von > 10¹¹ pro ml bewertet. Waren Bakterien im ganzen Sediment nicht in Kolonien organisiert und nur ganz vereinzelt sichtbar bzw. außerhalb des zählbaren Feldes sehr vereinzelt darstellbar, so wurde die Probe als Nullwert markiert, was bedeutet, dass die Detektionsgrenze bei dieser FISH erreicht war und die Anzahl < 10⁶/ml lag (Swidsinski et al., 2005; Swidsinski, 2006).

Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter Verwendung des statistischen Softwareprogramms R (R Core Team, 2016) sowie GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Der Shapiro-Wilk-Test wurde verwendet, um die Normalverteilung zu beurteilen. Keiner der Datensätze folgte einer Normalverteilung. Daher wurden Mediane und interquartile Bereiche für die Bakterienzahlen berechnet. Die Ergebnisse werden als Median mit dem ersten Quartil (Q1) und dem dritten Quartil (Q3) dargestellt.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde für den Vergleich zwischen den Gruppen, die unabhängige Stichproben darstellen, als nichtparametrischer Test durchgeführt, außerdem wurden Unterschiede innerhalb der Gruppen als abhängige Stichproben, mit dem Wilcoxon-Test berechnet und p < 0,05 für beide Tests als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 471 Sedimentanalysen durchgeführt. Einen Überblick der Sedimentanalysen (Probenanzahl) pro Sonde pro Probenart ist in Tabelle 3 dargestellt. Innerhalb der Gruppe 1 mit 17 Pferden konnten zu Beginn (Tag 0) je 16 Proben für die Sonden EUB338 (Abb. 1) und Bif164 sowie 15 Proben für die CF319a-Sonde analysiert werden. Für Gruppe 2 mit insgesamt 11 Pferden waren es je 11 Proben für die ersten beiden

TABELLE 3: Bakterienanalysen der Kotproben mithilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, wobei die Oligonukleotidsonden EUB338, Bif164 und CF319a Verwendung fanden. Auflistung der Untersuchungstage, Anzahlen der gesammelten Proben und ermittelte Mediane für die einzelnen Tage 0, 3, 5 und 7 sowie Q1, Q3, Minimum, Maximum und das Schiefmaß.

Gruppe		EUB 338							Bif 164							CF319a							
		med ^a	min	max	Q1	Q3	Skew	n ^b	med ^a	min	max	Q1	Q3	Skew	n ^b	med ^a	min	max	Q1	Q3	Skew	n ^b	n
Gruppe 1 darmgesund ohne Präbiotikum 17 Pferde	0. Tag	3,5	0 ^c	30	0 ^c	8,8	1,8	16	0 ^c	0 ^c	10	0 ^c	2,0	2,0	16	5,0	0 ^c	25	0 ^c	10,0	1,2	15	125
	3. Tag	7,5	0 ^c	30	0 ^c	10,0	1,5	12	0,05	0 ^c	10	0 ^c	1,75	2,6	12	4,5	0 ^c	16	0 ^c	11,2	0,9	10	
	5. Tag	3,5	0 ^c	50	0 ^c	12,5	2,3	10	0,5	0 ^c	12	0 ^c	2,75	2,4	10	4,5	0 ^c	15	0 ^c	5,0	1,6	8	
	7. Tag	6,5	0 ^c	25	0 ^c	21,2	0,8	6	0,75	0 ^c	20	0 ^c	7,25	2,3	6	3,5	0 ^c	15	0,25	12,8	1,2	4	
Gruppe 2 darmgesund mit Präbiotikum 11 Pferde	0. Tag	1,0	0 ^c	30	0 ^c	6,0	1,8	11	0,01	0 ^c	20	0 ^c	3,0	2,9	11	1,0	0 ^c	20	0 ^c	5,0	2,4	9	104
	3. Tag	7,5	0 ^c	22	0 ^c	12,5	0,7	10	0,005	0 ^c	10	0 ^c	1,12	2,7	10	2,2	0 ^c	15	0,1	5,5	1,8	8	
	5. Tag	0 ^c	0 ^c	25	0 ^c	10,0	1,8	9	0,001	0 ^c	10	0 ^c	0,75	2,9	9	4,0	0 ^c	10	0,5	4,0	1,3	7	
	7. Tag	0 ^c	0 ^c	10	0 ^c	8,0	1,1	7	0 ^c	0 ^c	5	0 ^c	2,0	2,0	7	3,0	0 ^c	5	0 ^c	5,0	-0,2	6	
Gruppe 3 Antibiotika ohne Präbiotikum 24 Pferde	0. Tag	5,0	0 ^c	25	3,0	10,0	1,1	24	0,35	0 ^c	15	0 ^c	5	1,1	24	5,0	0 ^c	25	2,0	10,0	1,1	24	146
	3. Tag	2,0	0 ^c	30	0 ^c	9,2	2,4	12	0 ^c	0 ^c	5	0 ^c	0,5	2,0	12	5,0	0 ^c	25	0,5	15,0	1,0	11	
	5. Tag	4,0	0 ^c	16	0,5	9,2	1,1	8	1,5	0 ^c	10	0,1	4,8	1,5	8	5,5	0,5	25	3,5	17,5	1,2	8	
	7. Tag	5,0	0 ^c	15	1,0	12,5	0,6	5	1,0	0 ^c	5	0 ^c	4,0	0,9	5	5,0	4,0	10	4,5	8,5	1,3	5	
Gruppe 4 Antibiotika mit Präbiotikum 10 Pferde	0. Tag	3,5	0 ^c	25	0 ^c	12,5	1,2	10	0 ^c	0 ^c	5	0 ^c	0,6	2,9	10	4,5	0 ^c	25	0,8	16,2	0,9	10	96
	3. Tag	3,5	0 ^c	15	0 ^c	10,0	0,9	10	0 ^c	0 ^c	2	0 ^c	0,3	2,8	10	5,0	0 ^c	10	0,8	5,0	0,2	10	
	5. Tag	2,0	0 ^c	15	0 ^c	6,0	1,7	10	0 ^c	0 ^c	10	0 ^c	0,9	3,0	10	4,5	0 ^c	10	0,8	7,0	0,3	10	
	7. Tag	7,8	0,5	15	0,5	15,0	-	2	0 ^c	0 ^c	0	0 ^c	0 ^c	-	2	1,2	0 ^c	2,5	0 ^c	2,5	-	2	
Gesamtsumme Pferde 62								162							162							147	471

^a Bakterienzahl x 10⁹/ml pro Gruppe und Spezies

^b Anzahl (n) der Sedimentanalysen pro Sonde

^c Medianwert, Minimum und Maximum: 0-Wert = < 10⁹/ml, unterhalb der Detektionsgrenze

Sonden und 9 Proben für CF319a für die Untersuchung am Tag 0. Die Probenzahlen für die weiteren Untersuchungstage sind in Tabelle 3 aufgelistet. Dass es zu Verlusten von Proben bei den gesunden Pferden kam, lag daran, dass das Probenmaterial durch Transportschäden der Gefäße nicht mehr zur Verfügung stand. Innerhalb der Gruppe 3 mit 24 Pferden konnten je 24

Proben initial analysiert werden für EUB338, Bif164 und CF319a, für Gruppe 4 mit 10 Pferden waren es je 10 Proben zum Tag 0 für diese drei Sonden. Der Verlust an Probenmaterial hatte auch zur erkennbaren Abnahme der Probenzahl über die untersuchten Tage (Tage 3, 5 und 7) beigetragen (Tab. 3), jedoch lag die Reduzierung der Probenzahlen vor allem am Verlust der Patienten für die weitere Beprobung durch Entlassung oder Tod begründet. Die vierte Sonde LGC354ab wurde erst nachträglich eingesetzt und ist daher in Tabelle 3 nicht aufgeführt und in der statistischen Auswertung nicht betrachtet.

Die in Fäzes durchschnittlich ermittelten Bakterienzahlen lagen zwischen 10⁸ bis 10⁹/ml für EUB338- und CF319a-Sonden. Die Medianwerte, ermittelt mittels Bif164-Sonde, stiegen nicht über 1,5 x 10⁸/ml an und die meisten Bakterienzahlen lagen unterhalb von 1,0 x 10⁸/ml.

Drei Fohlen waren in den Untersuchungen in Gruppe 3 integriert (Tab. 1), wobei auffällig hohe Bakterienzahlen nachweisbar waren. Über EUB338- und CF319a-Sonden konnten Bakterienzahlen von $\geq 1,0 \times 10^{12}$ /ml für alle drei Fohlen ermittelt werden. Mit der Bif164-Sonde ergaben sich für die zwei älteren Fohlen (3 Monate und 5 Monate alt) ähnliche Bakterienzahlen von $\leq 1,5 \times 10^8$ /ml wie bei adulten Pferden. Nur bei dem mit 3 Wochen sehr jungen Fohlen waren Bakterienzahlen $\geq 1,0 \times 10^9$ /ml über alle Untersuchungstage feststellbar. In Tabelle 3 sind die ermittelten medianen Bakterienzahlen für die einzelnen Sonden pro Probenentnahmetag aufgeführt. Die Boxplotdiagramme (Abb. 2, 3) zeigen die ermittelten medianen Bakterienzahlen pro Gruppe und Probenstag für eine Sonde mit Signifikanzniveau an, wobei Abbildung 2 den Vergleich der Gruppen 1 und 3 und Abbildung 3 den Vergleich der Gruppen 3 und 4 darstellen.

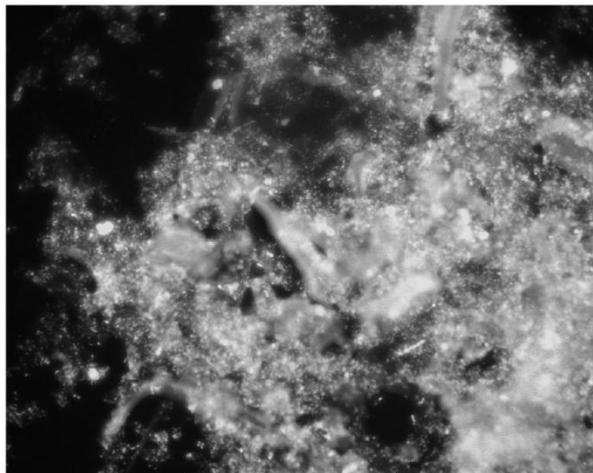


ABBILDUNG 1: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung einer Kotprobe am Tag 0 eines gesunden Pferdes der Gruppe 1 (Warmblutwallach, 15 Jahre). Die Kotprobe wurde mit Oligonukleotidsonde EUB338 (= Domäne Bacteria) analysiert. Die Bakterienzahl war bei 1000-facher Vergrößerung bei 2,0 x 10⁹/ml. Mikrofoto in 400-facher Vergrößerung.

ABBILDUNG 2: Vergleich der Bakterienzahlen $\times 10^8/\text{ml}$ Kotprobe der Gruppe 1 (darmgesunde Pferde, dunkelgrau Boxplot) und Gruppe 3 (kranke Pferde mit Amoxicillin-Gentamicin-Behandlung, hellgrau Boxplot) im Boxplotdiagramm (Median, erstes und drittes Quartil). Quantifizierung mithilfe von FISH unter Verwendung von Oligonukleotidsonden EUB338 (EUB), CF319a (CF) und Bif164 (Bif) an den Tagen 0, 3, 5 und 7 der Behandlung.

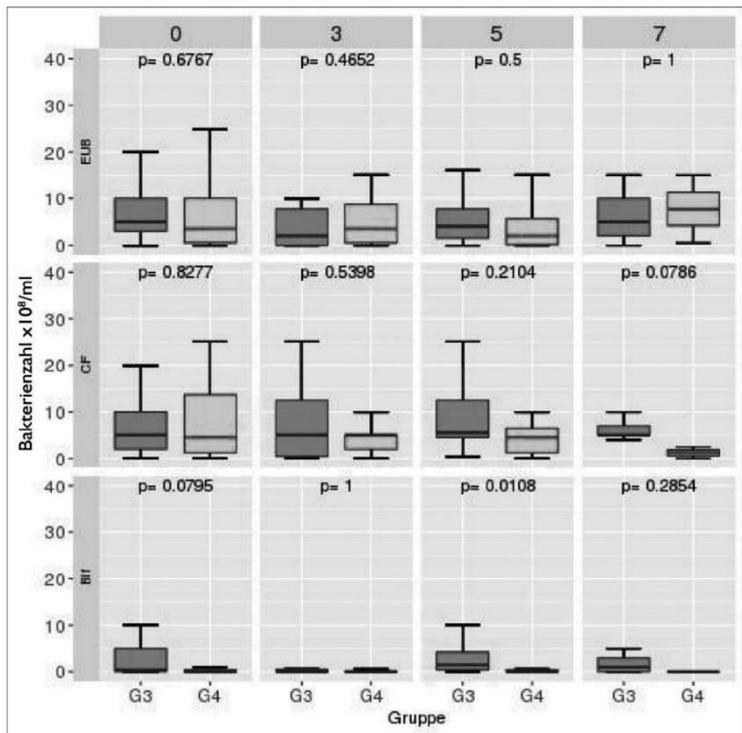
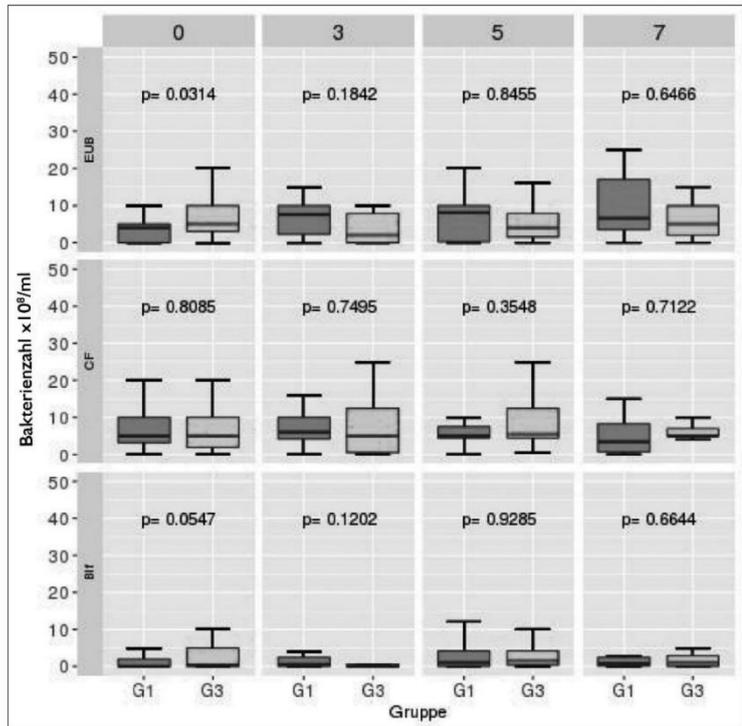
Von 19 verschiedenen Pferden aus den Gruppen 1, 3 und 4 wurden auch mittels der Oligonukleotidsonde LGC353ab für das Phylum Firmicutes untersucht (Abb. 4). In der Auswertung lag der Median der LGC353ab-Sonde von 16 Pferden unter $< 1,0 \times 10^8/\text{ml}$. Die Bakterienzahlen der Kotproben von 2 Pferden aus Gruppe 4 (Colitispatienten) und einem Pferd mit Bronchitis aus Gruppe 3 waren $< 10^6/\text{ml}$.

In der gesamten Untersuchung waren keine signifikanten Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung in Fäzes von älteren Pferden (≥ 18 Jahre alt) feststellbar.

Antibiotikaeinfluss

In Hinblick auf die Zielstellung der Studie, die Auswirkungen der Antibiotika Amoxicillin und Gentamicinsulfat (Gruppe 3) auf die equine mikrobielle Fäzesflora zu untersuchen, ist der Vergleich der Gruppe 1 mit Gruppe 3 von besonderer Bedeutung (Tab. 3, Abb. 2). Die Bakterienzahl der Domäne *Bacteria* (EUB338) der Gruppe 3 sank nicht signifikant ($p = 0,1842$) am Tag 3, um am Tag 5 und 7 wieder kontinuierlich anzusteigen. Die Bakterienzahlen, ermittelt mit der CF319a-Sonde (Cytophaga-Flavobacteria-Klasse) und der Bif164-Sonde (Gattung *Bifidobacterium*), sind an den Untersuchungstagen auf gleichem Niveau in der Gruppe 1 und 3. Bei den Spezies der Bifidobacteriaceae lagen die Medianwerte bei maximal $1,5 \times 10^8/\text{ml}$ am Tag 5 der Gruppe 3 (Tab. 3).

ABBILDUNG 3: Vergleich der Bakterienzahlen $\times 10^8/\text{ml}$ Kotprobe der Gruppe 3 (kranke Pferde mit Amoxicillin-Gentamicin-Behandlung, dunkelgrau Boxplot) und Gruppe 4 (kranke Pferde mit Amoxicillin-Gentamicin-Behandlung und Präbiotikumapplikation, hellgrau Boxplot) im Boxplotdiagramm (Median, erstes und drittes Quartil). Quantifizierung mithilfe von FISH unter Verwendung von Oligonukleotidsonden EUB338 (EUB), CF319a (CF) und Bif164 (Bif) an den Tagen 0, 3, 5 und 7 der Behandlung.



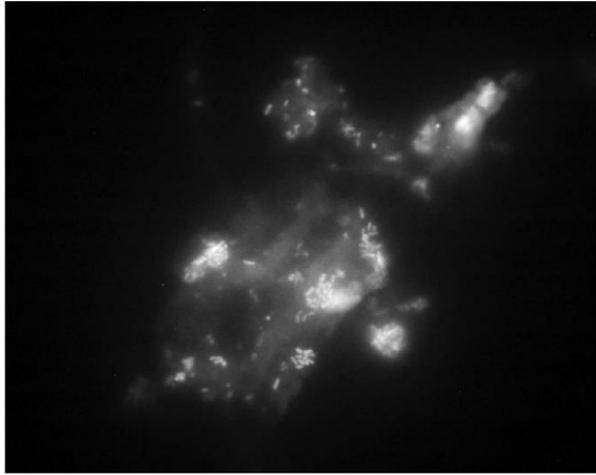


ABBILDUNG 4: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung einer Kotprobe eines 7 Monate alten Warmbluthengstes der Gruppe 3 (Behandlung mit Amoxicillin, Gentamicin aufgrund Pneumonie). Die Kotprobe wurde mit der Oligonukleotidsonde LGC354ab (= Phylum Firmicutes) des Tages 3 analysiert. Die ermittelte mittlere Bakterienzahl war $5,0 \times 10^8$ /ml. Mikrofoto in 1000-facher Vergrößerung.

Präbiotikaeinfluss

Bei den gesunden Pferden, die zusätzlich das Präbiotikum erhielten (Gruppe 2), kam es im Vergleich zu Gruppe 1 zu einer geringfügigen Erhöhung der Bakterienzahl der Domäne *Bacteria* zum Tag 3, um dann am Tag 5 und 7 kontinuierlich abzufallen. Die Bakterienzahlen der Gattung *Bifidobacterium* waren auf gleichem Niveau und die der Cytophaga-Flavobacteria-Klasse nicht signifikant höher in der Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 2 (Tab. 3). Die Bakterienzahl, bestimmt mit der *Bacteria*-spezifischen Sonde EUB338, in der Gruppe 4 mit Amoxicillin-Gentamicin-Behandlung und Präbiotikumapplikation stieg am Tag 7 über den Wert der Gruppe 3, die kein Präbiotikum bekam ($p = 1,0000$) (Tab. 3, Abb. 3). Die Bakterienzahl der Cytophaga-Flavobacteria-Klasse der Gruppe 4 sank kontinuierlich im Vergleich zur Gruppe 3 (Tab. 3, Abb. 3). Die Bakterienzahlen der Gattung *Bifidobacterium* der Gruppe 4 waren auf niedrigerem Niveau und niedriger als in Gruppe 3 (Tab. 3, Abb. 3).

Pferde mit Colitis

Unter den beprobten Pferdepatienten waren 12 Pferde mit Colitis. Davon waren die meisten Patienten ($n = 5$) in der Altersklasse 3–17 Jahre, 3 Pferde entstammten der Altersklasse 6 Monate bis 2 Jahre und vier Pferde waren 18 Jahre und älter. Es dominierten Warmblutpferde mit $n=8$, außerdem waren je ein Haflinger, Minishetlandpony, ein Shetlandpony sowie ein Reitpony vertreten. Acht Pferde kamen aus Boxenhaltung mit Paddock und 4 Pferde aus Offenstallhaltung. Die Hälfte der Pferde wurde in den Wintermonaten (Januar bis Februar) eingeliefert, die restlichen Patienten wurden im Herbst ($n = 3$) sowie im Frühjahr ($n = 3$) in der Medizinischen Tierklinik vorgestellt. Die 12 beprobten Colitispatienten wurden zufällig auf die Gruppen 3 und 4 verteilt. Die *Bacteria*-spezifische Sonde EUB338 präsentierte die Aus-

gangsprobe der Gruppe 3 mit einem niedrigeren Median $M = 0,75 \times 10^8$ /ml als den Median mit $M = 6,0 \times 10^8$ /ml der Gruppe 4 am Tag 0 ($p = 0,3836$). In Gruppe 3 verstarben aufgrund des klinisch schlechten Zustandes 4 Pferde mit akuter Colitis in den ersten drei Tagen bzw. wurden wegen schlechter Prognose euthanasiert. Eine weitere Beprobung war daher nicht möglich. Die Bakterienzahl der Gruppe 3 mit $M = 5,0 \times 10^8$ /ml ist niedriger als die der Gruppe 4 mit Präbiotikum von $M = 1,0 \times 10^9$ /ml am Tag 3 ($p = 0,4606$). Die weiteren Medianwerte der Gruppe 4 mit Präbiotikum waren $M_{5, \text{Tag}} = 5,0 \times 10^8$ und $M_{7, \text{Tag}} = 7,5 \times 10^8$ /ml. Diese Patienten sprachen sehr schnell auf die Therapie mit Antibiotika, Antiphlogistika, Infusionstherapie und auf die Supplementierung mit dem Präbiotikum an. Makroskopisch war eine Besserung der Kotkonsistenz innerhalb von 24 Stunden nach der ersten Aufnahme des Präbiotikums festzustellen. Ebenso entwickelte sich die Heuaufnahme positiv. Die Ausgangswerte der Bakterienzahlen der Cytophaga-Flavobacteria-Klasse (CF319a-Sonde) waren bei Pferden mit akuter Colitis der Gruppe 3 und 4 bei $1,0 \times 10^9$ /ml und $8,5 \times 10^8$ /ml am Tag 0 ($p = 1,0000$). Die weiteren Mediane der Gruppe 4 mit Amoxicillin-Gentamicin-Behandlung und Präbiotikumapplikation lagen bei $M_{3, \text{Tag}} = 3,0 \times 10^8$, $M_{5, \text{Tag}} = 1,5 \times 10^8$ und $M_{7, \text{Tag}} = 1,25 \times 10^8$ /ml. Die Reduzierung der Bakterienzahl von Tag 0 auf Tag 3 war mit $p = 0,1875$ nicht statistisch signifikant. Die Bakterienzahlen der Gattung *Bifidobacterium* lagen bei allen Pferden mit akuter Colitis sowie ohne (Gruppe 3) und mit Supplementierung (Gruppe 4) des Präbiotikums konstant unter $1,0 \times 10^8$ /ml.

Diskussion

Unter dem Einfluss von Amoxicillin und Gentamicinsulfat war in der vorliegenden Untersuchung bei den Pferden der Gruppe 3 zwar keine signifikante Reduzierung der Bakteriengesamtzahlen ($p = 0,1842$) und der Gattung *Bifidobacterium* ($p = 0,1202$), aber dennoch eine Verringerung in den Bakterienzahlen am Tag 3 im Vergleich zur Gruppe 1 festzustellen (Abb. 2). Anders als erwartet, blieben die Zahlen in der Cytophaga-Flavobacteria-Klasse sogar konstant (Abb. 2). Amoxicillin und Gentamicinsulfat wurden an der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig routinemäßig als antibiotische Medikamente, bevor ein Antibiotogramm vorhanden war, bei Pferden mit mittel- bis hochgradigem Fieber, Leukopenie oder Leukozytose eingesetzt. Als Penicillinderivat wirkt Amoxicillin bakterizid mit einem breiten Spektrum gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien, während Gentamicinsulfat ausschließlich auf gramnegative Bakterien Einfluss nimmt und in sauerstoffarmer Umgebung teilweise inaktiviert wird (European Commission's Directorate for public health and risk assessment). Daher ist anzunehmen, dass die Wirksamkeit von Gentamicinsulfat im Darmmilieu unwesentlich ist. Costa et al. (2015b) konstatierten im Vergleich der Antinfektiva Penicillin, Ceftiofur sowie Trimethoprim-Sulfadiazin (TMS) unterschiedlich starke Beeinflussungen des equinen Mikrobioms. Dabei erzeugte insbesondere TMS mit seiner den Folsäurestoffwechsel von Bakterien hemmenden Wirkung Veränderungen in der Vielfalt der Bakterienarten, während Penicillin und Ceftiofur mit ihren ähnlichen, bakteriziden Wirkungsprinzipien der Hemmung der bakteriel-

len Zellwandsynthese eher Unterschiede auf unteren taxonomischen Ebenen induzierten. Wahrscheinlich ist das Risiko für AAD eher nicht durch den Einsatz von Antibiotika an sich, sondern einerseits durch den Verabreichungsweg und andererseits durch deren pharmakologischen Ansatzpunkt bedingt. Nach jetzigem Kenntnisstand kommen in der Mikrobiota des Pferdes insbesondere grampositive Bakterien vor wie Phylum Firmicutes z. B. Klasse Clostridia (Costa et al., 2012; Dougal et al., 2012, 2013; Schoster 2015, Costa et al., 2015a). Naheliegender ist, dass Antibiotika, die gezielt grampositive Bakterien hemmen und dazu bakterizid wirken, ein größeres Risiko mit sich bringen, AAD oder starke Dysbiosen auszulösen, wie etwa von Gustafsson et al. (1997) in einer Arbeit über erythromycininduzierte Colitis erkrankter Stuten gezeigt hatten. Da die Klasse Clostridia einen dominierenden Bestandteil der equinen Mikrobiota bildet, rieten Costa et al. (2015b) den therapeutischen Einsatz von beispielsweise Metronidazol beim Pferd gut abzuwägen. Costa et al. (2015b) fanden bei Pferden mit Colitis ein vermehrtes Auftreten des Phylum Bacteroidetes. Zu diesem artenreichen Stamm mit gramnegativen Vertretern gehören jene Bakterien, die mit der Sonde CF319a als Klasse Cytophaga-Flavobacteria detektiert worden waren und in unserer Studie unter Einfluss von Amoxicillin und Gentamicinsulfat in der Anzahl konstant blieben (Abb. 2). Es kann sein, dass durch die weitere Raufutteraufnahme während der Antibiotikatherapie die Reduzierung gewisser Bakterienarten nicht in Erscheinung trat, da ein Ausgleich durch die Aufnahme alimentärer Bakterien erfolgte. Andererseits könnten grampositive Bakterienarten sensibler auf die Einwirkung von Antibiotika reagieren, möglicherweise betrifft dies auch nur die Schlüsselkomponenten bzw. die Kernspezies, die es noch genauer zu identifizieren gilt. In dieser Studie wurden keine makroskopischen Veränderungen der Kotkonsistenz durch Amoxicillin und Gentamicinsulfat beobachtet, sodass diese Antibiotika in Bezug auf das Risiko einer AAD sicher zu sein scheinen.

In der vorliegenden Studie wurde die etablierte Methode genutzt, mithilfe analysierter Fäzes Rückschlüsse auf die intestinale, bakterielle Darmflora des Pferdes zu ziehen. In zahlreichen anderen Untersuchungen fand dies Anwendung (Costa et al., 2012; Shepard et al., 2012; Steelmann et al., 2012; O'Donnell et al., 2013; Dougal et al., 2014; Saded-Bourgeteau et al., 2014; Proudman et al., 2015). Für diese Studie wurden Kotproben als Material zur Analyse gewählt, um auch eine Beprobung gesunder Tiere zu ermöglichen. Der Fokus lag auf dem Nachweis von Quantitätsveränderungen der bakteriellen Mikrobiota durch die Wirkung von Antibiotika, wobei sich solche auch in der fäkalen, mikrobiellen Zusammensetzung widerspiegeln sollten. Von Vorteil ist dabei die leicht realisierbare Probenahme zur Untersuchung der fäkalen Mikrobiota im Vergleich zur Beprobung fistulierter oder anästhesierter Pferde, die ebenso wie die Entnahme von Ingestaproben von euthanasierten, gesunden Pferden als ethisch problematisch anzusehen ist. Jedoch ist bereits beschrieben, dass die Zusammensetzung der intestinalen, bakteriellen Gemeinschaft zwischen Individuen einer Rasse trotz gleicher Haltungsregion und Fütterung sehr verschieden ist (Blackmore et al., 2013; O'Donnell et al., 2013). Dieses Merkmal wird als interindividuelle Varianz bezeichnet (Dougal et al., 2012; Jullian und Grimm, 2016) und ist

bisher in Untersuchungen zu Diversitäten der Mikrobiota aufgefallen. Inwieweit es dadurch zu Unterschieden der Zahlen von Bakterienarten kommt, ist noch unklar. Außerdem ist in den jüngsten Studien zur Diversität und Komplexität der equinen Mikrobiota aufgefallen, dass es in Zusammensetzung der intestinalen, bakteriellen Gemeinschaft auch signifikante Unterschiede zwischen Blinddarm und Fäzes gibt (de Fombelle et al., 2003; Hastie et al., 2008; Costa et al., 2012; Schoster et al., 2013; Dougal et al., 2012, 2013, 2014; Fernandes et al., 2014; Philippeau et al., 2015; Harlow, 2015; Harlow et al., 2016; Costa et al., 2015a, 2016). Die Vermischung des Mikrobioms scheint im Colon ascendens stattzufinden, denn weitere Studien zeigten, dass die Zusammensetzung der Mikrobiota des ventralen rechten Colons der im Blinddarm gleicht (Daly et al., 2001; de Fombelle et al., 2003; Schoster et al., 2013), sich aber vom rechten dorsalen Colon unterscheidet (Dougal et al., 2012). Die dortigen Bakterien besitzen in der Zusammensetzung wiederum mehr Ähnlichkeit mit der mikrobiellen Gemeinschaft der Fäzes (Saded-Bourgeteau et al., 2014).

Die Gruppenverteilung der Pferde erfolgte randomisiert (Tab. 3). Gruppe 1 und Gruppe 2 mit den gesunden Pferden bildeten sehr stabile Gruppen, die durchgängig über alle sieben Tage eine gute und konstante Futteraufnahme zeigten. Die Heuportionen wurden auf drei Rationen (früh, mittags und abends) aufgeteilt und in einer Menge von 1,5 kg/100 kg LM pro Tag vollständig verzehrt. Eine Mischfuttermittelzubereitung wurde den gesunden Pferden der Gruppen 1 und 2 nicht angeboten, lediglich erfolgte die Zufütterung des Präbiotikums für die Gruppe 2. Die Applikationsdauer des eingesetzten Präbiotikums war kürzer im Vergleich zu den Anwendungszeiten von 12 bis 14 Tagen anderer verwendeter Präbiotika (Buesing et al., 2011; Buesing et al., 2014). Eine Verabreichungsdauer von 21 oder 28 Tagen wurde auch beschrieben (Morgan et al., 2007; Respondek et al., 2008; Dougal et al., 2014). Ausgehend von der in der Literatur zu findenden mittleren, intestinalen Transitzeit von 25 bis 36 Stunden bei gesunden Pferden mit Heufütterung, ist eine Applikationszeit von 7 Tagen jedoch auch angemessen, zumal die Ingesta mit einer Passagezeit von nur drei Stunden bereits in kürzester Zeit im Blinddarm bzw. ventralen Grimmdarm vorliegt und sich dort erst die Verweilzeit für zu fermentierende Kohlenhydrate erhöht (Pearson and Merrit, 1991; Miraglia et al., 1992). Zudem wurde eine einheitliche Applikationsdauer auch für Gruppe 3 und Gruppe 4 gewählt, die innerhalb einer klinischen Studie umsetzbar war.

Das applizierte Präbiotikum zeigte im Einsatz keinerlei unerwünschte Wirkungen, jedoch war die Akzeptanz bei einigen Pferden nicht optimal und die verfügbare Formulierung als Pellet erlaubte bisher keine Applikation bei Inappetenz. Die Pferde, die das Präbiotikum absolut nicht fressen wollten, wurden nicht weiter beprobt und aus der Studie genommen. Eine vertretbare Wartezeit waren 12 Stunden nach Therapieanfang mit einer erneuten Fütterung nach gescheitertem ersten Versuch. Außerdem sollte mindestens 2/3 der Menge des Präbiotikums aufgenommen worden sein. Das entspricht bei adulten Pferden mit 500 kg Körpergewicht eine Mindestmenge von 500 g des Präbiotikums, womit die Dosierung von 1,5 g/kg ähnlich zu den Empfehlungen von Mischfuttermittelzubereitung ist. In Studien zur Schweinefütterung mit Huminsäuren oder anderen Präbiotika wurden Dosierungsvorschläge von 5–40 g/kg angewendet (Flickinger et

al., 2003; Mikkelsen et al., 2003; Mountzouris et al., 2006; Buesing et al., 2011, 2014). Aufgrund des 20%igen Anteiles von Topinambur im Präparat bestand keine Gefahr für die Auslösung einer Hufrehe. Auch Glatter et al. (2016) hatten in ihrer Studie Topinamburmehl in der Pferdefütterung mit einer Inulinkonzentration von 0,2 g/kg KM/Tag verwendet und keine Hufrehe bei den Versuchspferden ausgelöst. Ausschließlich durch die Endotoxämie entwickelte sich die Hufrehe bei denen an Colitis erkrankten Pferden der Gruppen 3 und 4. Bezüglich des Einflusses der Huminsäuren ist von einer luminalen und schleimhautassoziierten Wirkungsweise auszugehen. Die resorptiven Eigenschaften von Huminsäuren sind umstritten. Büsing (2001) beforschte die Resorptionsfähigkeit der Huminsäurepartikel innerhalb des Darmepithels bei Schweinen und wies Partikel von Huminsäuren im Darmepithel bei Absetzern lichtmikroskopisch nach. Dies erschien ungewöhnlich, da von einer resorbierbaren Partikelgröße von 0,8 nm im Durchschnitt innerhalb des Dünndarms und noch kleiner (0,25 nm im Durchschnitt) innerhalb des Grimmdarms auszugehen ist (Schmidt und Thewes, 1997) und Huminsäurepartikel deutlich größer sind. In einer weiteren Studie von Buesing et al. (2014) mit adulten Mini-Schweinen und der Fütterung von Huminsäuren (1,0 g/kg KM) konnten keine integrierten Huminsäurepartikel im Darmepithel festgestellt werden, daher wurde im Vergleich zur ersten Studie bei Absetzern ein altersabhängiges Vermögen zur Resorption vermutet (Buesing et al., 2014).

Das eingesetzte Präbiotikum bei den gesunden Pferden veränderte weder die Kotkonsistenz noch die fäkalen Bakterienzahlen signifikant. Beide Gruppen 1 und 2 zeigten für die bakterienspezifischen Oligonukleotidsonden keine signifikanten Unterschiede. Einzig waren die Zahlen für Cytophaga-Flavobacteria-Klasse und *Bifidobacterium* spp. subjektiv betrachtet geringgradig verringert für Gruppe 2 über alle vier Probenstage (Tage 0, 3, 5, 7). Ähnlich ernüchternd waren die Ergebnisse der Studie von Murray et al. (2014), die sowohl mit stärkeren als auch mit stärkerarmen Rationen keine Änderungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota der Fäzes bemerkten. Die Inulinfütterung führte bei darmgesunden Pferden zu einer nicht signifikanten Erhöhung der Konzentration kurzkettiger Fettsäuren und der Ammoniakkonzentration sowie zu einer nicht signifikanten Erniedrigung der L-Laktatkonzentration im ventralen großen Kolon (Glatter et al., 2016). Ebenfalls zeigte auch dieses Präbiotikum keinen stimulierenden Effekt auf die grampositiven Bifidobakterien (Tab. 3, Abb. 3). Das könnte einerseits in der jeweiligen Grundkrankheit der Pferde in Gruppe 4 begründet sein, andererseits war auch bei gesunden Pferden der Gruppe 2 diesbezüglich kein Unterschied erkennbar. Vermutlich kommen Bifidobakterien in Fäzes nur in geringen Bakterienzahlen vor (Endo et al., 2009). Auch Mountzouris et al. (2006) präsentierten eine signifikante Reduzierung des quantitativen Anteils der u. a. ermittelbaren Bifidobakterien vom Caecum bis Rektum beim Schwein sowie einen anteiligen Gesamtbeitrag an der intestinalen porzinen Mikroflora von lediglich 1,0–1,1 % ähnlich der Humanmedizin mit Gehalten unter 2 % für *Bifidobacterium*, *Lactococcus* sowie *Enterococcus* (Sghir et al., 2000). Das durchschnittliche Auftreten der Bifidobakterien in Fäzes von $\leq 1,5 \times 10^8$ /ml entspricht damit den gegenwärtigen Erkenntnissen (Sghir et al., 2000; Mountzouris et al., 2006; Endo et al., 2009). Auch bei darmkranken Pferden

blieben erhöhte Bakterienzahlen für *Bifidobacterium* spp. aus. Davon ausgenommen waren Proben von drei Fohlen, die untersucht wurden. Bei einem unter drei Wochen alten Fohlen, erhöhten sich auffällig die Bakterienzahlen der Gattung *Bifidobacterium* mit $\geq 1,0 \times 10^9$ /ml über alle Probenstage im Vergleich zu adulten Pferden. Bei den anderen beiden Fohlen, die mit drei und fünf Monaten deutlich älter waren, waren die Bakterienzahlen für die Gattung *Bifidobacterium* ähnlich denen der adulten Pferde von $\leq 1,5 \times 10^8$ /ml. Auch die Bakteriengesamtzahl sowie die Bakterienzahlen für Cytophaga-Flavobacteria-Klasse fielen bei allen drei Fohlen ebenfalls mit über $1,0 \times 10^{12}$ /ml deutlich höher aus. Das erklärt sich durch die überwiegende Aufnahme von Milch und die Neukolonisation des Darmes.

Bei den erkrankten Pferden ergaben sich mehrere Einflussfaktoren. Die Grundkrankheiten der Gruppe 3- und 4-Pferde variierten in Art und Schweregrad stark (Tab. 1, 3). Die Notwendigkeit einer antibiotischen Behandlung ergab sich für alle Pferde aus diesen beiden Gruppen, jedoch waren Allgemeinbefinden, Futteraufnahme und Stoffwechsel der Pferde unterschiedlich stark durch die Grunderkrankung beeinflusst. Dennoch war in der Auswertung der Daten nur ein geringer Einfluss der Grundkrankheit gegenüber dem bakteriellen Mikrobiom gesunder Pferde festzustellen, da sich die Medianwerte der Eingangsproben (Tag 0) zwischen gesunden Pferden (Gruppe 1) und antibiotisch behandelten Pferden (Gruppe 3 und Gruppe 4) kaum unterschieden (Abb. 2, 3). Einzig die Zahlen der Gattung *Bifidobacterium* waren initial in den Tag 0-Proben deutlich erniedrigt bei Pferden der Gruppe 4, aber auch bei der Gruppe 1 im Vergleich zu den Pferden der Gruppe 3 (Abb. 2). Futterumstellung und der Krankheitszustand dieser Pferde aus Gruppe 3 könnte dazu beigetragen haben. Eine insgesamt gleichmäßige Futteraufnahme für Gruppe 3 und 4 konnte in den ersten Tagen des Klinikaufenthaltes für die inkludierten Pferde nicht bestätigt werden. Gerade die Patienten, die sehr früh nach 1 oder 2 Tagen verstarben, waren zum größten Teil inappetent. Die letztendliche Todesursache bei diesen Pferden war eine Herzkreislauf-Insuffizienz. Ein Toxinachweis gelang nur im Fall eines Pferdes mit Diagnose Colitis, wobei sich nachträglich eine Salmonellose herausstellte. Die anderen Pferde mit Colitis wurden größtenteils euthanasiert. Durch die Endotoxämie war es bei diesen Pferden trotz Therapie und frühzeitigen prophylaktischen Maßnahmen sekundär zu Komplikationen wie mittel- bis hochgradiger Hufrehe gekommen, welche für die Euthanasie der Pferde mit Colitis der Gruppe 3 und 4 in allen Fällen ausschlaggebend war (Tab. 3). Die Kotkonsistenz hatte sich bei allen Pferden der Gruppe 4 verbessert und war nicht mehr das primäre Problem gewesen. In Gruppe 3 konnte dies nicht so beobachtet werden, allerdings litten die Pferde mit Colitis länger an Inappetenz. Eine gastrale Futtersubstitution per Nasenschlundsonde gelang nur teilweise, so dass die Pferde länger per parenteraler Infusion versorgt wurden. Bakteriologische Untersuchungen von Kotproben erbrachten wenig spezifische Ergebnisse, in zwei von vier Pferden der Gruppe 4 konnte mittel- bis hochgradig *Clostridium perfringens* nachgewiesen werden, doch ohne Toxinbildung. Dadurch, dass die Pferde initial mit veränderter Kotkonsistenz und kolikartigen Verhalten in der Medizinischen Tierklinik vorgestellt wurden, kann über auslösende Faktoren nicht resümiert werden. Einzig aufgefallen war, dass die Patienten vor-

rangig über die kühleren bis kälteren Jahreszeiten und nicht über die Sommermonate kamen. Die klinische Charakterisierung einer Dysbiose beim Pferd ist divers, denn es gibt Pferde bei denen das Allgemeinbefinden stark beeinträchtigt war und Pferde, die bei gutem Allgemeinbefinden blieben, trotz stark veränderter Kotkonsistenz. Die labormedizinische Untersuchung ergab bei einer Dysbiose im Vergleich zu einer Colitis keine Auffälligkeiten und auch sonografisch waren vergleichend keine Veränderungen der Darmwand festzustellen.

Bei den Pferden mit akuter Colitis normalisierte sich die Kotkonsistenz makroskopisch nach Präbiotikumverabreichung, was auf die schleimhaut- und darmfloraprotektiven Effekte der Huminsäuren WH67 und/oder der Topinamburinhaltsstoffe zurückzuführen sein könnte. Mit der Supplementierung des Präbiotikums zusätzlich zur antibiotischen Therapie fiel eine weniger ausgeprägte Senkung des Medians der unter *Bacteria*-spezifischen Sonde EUB338 detektierbaren Bakterien zum Tag 5 auf, jedoch reagierten diese Bakterien zum Tag 7 mit einer Erhöhung (Abb. 3). Es ist also denkbar, dass innerhalb des sehr breiten, detektierbaren Spektrums der EUB338-Sonde einige Bakterienarten vorhanden sind, die durch das Präbiotikum gefördert werden. Auch bei den gesunden Pferden mit zusätzlicher Präbiotikumfütterung kam es zu einer geringfügigen Steigerung der Bakteriengesamtzahl am Tag 3 (Tab. 3). Signifikante quantitative Unterschiede in der equinen, fäkalen Mikrobiota beim Einsatz des Präbiotikums konnten allerdings nicht dargestellt werden.

Bei den zwölf an Colitis erkrankten Pferden bestand bereits initial eine veränderte Kotkonsistenz. Ebenso wie bei Costa et al. (2015b) waren auch in unserer Studie in den Fäzes von Pferden mit Colitis eine überdurchschnittlich hohe Anzahl an Bakterien der Klasse Cytophaga-Flavobacteria (Phylum Bacteroidetes) mit $1,0 \times 10^9/\text{ml}$ und $8,5 \times 10^8/\text{ml}$ für Gruppe 3 und 4 vorhanden. Allerdings lassen sich über den Vergleich der Gruppen 3 und 4 im zeitlichen Verlauf keine Unterschiede aufzeigen, da Gruppe 3 aufgrund von vorzeitigen Todesfällen nicht vollständig analysiert werden konnte.

Insgesamt hat die Applikation des Präbiotikums bei Pferden mit akuter Colitis geholfen, eine schnellere Normalisierung der Kotkonsistenz herbeizuführen und die Bakterienzahl der Cytophaga-Flavobacteria-Klasse während der Amoxicillin-Gentamicinsulfat-Therapie in den ersten Tagen zu stabilisieren. Weitere Untersuchungen des intestinalen Mikrobioms beim Pferd sind notwendig, um den Einfluss auch anderer eingesetzter Antibiotika beim Pferd zu überprüfen.

Die FISH ist als eine kulturunabhängige Methode zur Analyse komplexer mikrobieller Gemeinschaft geeignet, die keinen zusätzlichen DNA-Extraktionsschritt erfordert und damit das Risiko einer ungenügenden DNA-Ausbeute umgeht. In der methodischen Bearbeitung war der Wassergehalt der Fäzes vom Pferd nicht unproblematisch, da er die Inkubationslösung verdünnt und zudem die Gefahr bestand, eine ungenügende Menge des Sediments auf den Objektträger aufzutragen. Im Rahmen mehrerer Vorversuche konnte die Homogenisierung der Probe optimiert werden. Ohne die Homogenisierung wäre die Zugänglichkeit zum genomischen Material der Prokaryoten in der Hybridisierung durch die Faseranteile im Pferdekot erschwert. Mittels der modernen Hochdurchsatzsequenzierung bzw. PCR-basierter 16S-rRNA kann die Suche nach Diversitätsunterschie-

den bzw. die Ermittlung der bakteriellen Zusammensetzung erfolgen. Somit konnte innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft mit 40–70 % als dominantestes Phylum Firmicutes sowohl für die Kompartimente des Blind- und Grimmdarms (Daly et al., 2001; Dougal et al., 2013; Schoster et al., 2013; Costa et al., 2015a) als auch in Fäzes herausgefunden werden (Costa et al., 2012; Shepard et al., 2012; Steelmann et al., 2012; O'Donnell et al., 2013; Dougal et al., 2014; Proudman et al., 2015). Über die Sonde LGC354ab wurde in dieser Studie auch auf das Vorhandensein des Phylum Firmicutes innerhalb von Proben von 19 verschiedenen Pferden aus Gruppe 1, 3 und 4 untersucht. Jedoch waren entweder multiple Fluoreszenzsignale, bei zwei Pferden mit akuter Colitis, für Firmicutes feststellbar, oder es ergaben sich keine fluoreszierenden Signale, auch in der Gruppe der gesunden Pferde nicht. Inwieweit über die neuen molekulargenetischen Verfahren und deren Ergebnisse über Diversitätsmerkmale auch Interpretationen über Anzahl und Konzentrationen von Bakterien erfolgen können, ist noch unklar. Vergleiche und direkte Rückschlüsse aus Studien anderer Autoren sind aufgrund unterschiedlicher Analysemethodik, gefütterter Rationen, Herkunft und Alter der Pferde sowie Wahl der Antibiotika schwierig.

Danksagung

Besonderer Dank für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit gilt Frau P. Schlien, Molekulargenetisches Labor der Gastroenterologie der Charité Berlin. Für die finanzielle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit gilt der Dank Herrn Präsident Dr. E. Schüle, Gesellschaft für Pferdemedizin e. V.

Conflict of interest

Die Autoren versichern, dass keine geschützten, beruflichen oder anderweitigen Interessen an einem Produkt oder einer Firma bestehen, welche die in dieser Veröffentlichung genannten Inhalte oder Meinungen beeinflussen können.

Literatur

- Al Jassim R AM, Andrews FM (2009): Bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic and stomach ulcers. *Vet Clin Equine* 25: 199–215.
- Amann R, Krumholz L, Stahl DA (1990): Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 172: 762–770.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München. Microbiol Rev* 59: 143–169.
- Amann R, Fuchs BM, Behrens S (2001): The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr Opin Biotechnol* 12: 231–236.
- Amann R, Fuchs BM (2008): Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* 6: 339–348.

- Bailey SR, Baillon ML, Rycroft AN, Harris PA, Elliott J (2003):** Identification of equine cecal bacteria producing amines in an in vitro model of carbohydrate overload. *Appl Environ Microbiol* 69: 2087–2093.
- Barr BS, Waldridge BM, Morrese PR, Reed SM, Clark C, Belgrave R et al. (2013):** Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices. *Equine Vet J* 45: 154–158.
- Bartlett JG (1992):** Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 15: 573–581.
- Berg EL, Fu CJ, Porter JH, Kerley MS (2005):** Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: Effects on fecal pH, microbial content, and volatile fatty acid concentrations. *J Anim Sci* 83: 1549–1553.
- Blackmore TM, Dugdale A, Argo C, Curtis G, Pinloche P, Harris A, Worgan HJ, Girdwood SE, Dougal K, Newbold CJ (2013):** Strong stability and host specific bacterial community in faeces of ponies. *PLoS One* 8: e75079.
- Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF (1981):** Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 148: 107–127.
- Buesing (2001):** Licht- und elektronenmikroskopischer Nachweis oral aufgenommener Huminsäuren in der duodenalen Darmwand des Schweins. Doctoral Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University Leipzig.
- Buesing K, Harmeyer J, Markuske KD, Zeyner A (2011):** Microscopic evidence for the uptake of orally given humic acids by the intestinal mucosa in piglets. *Anim Prod Sci* 51: 967–973.
- Buesing K, Elhensheri M, Entzian K, Meyer U, Zeyner A (2014):** Microscopic examination of the intestinal wall and selected organs of minipigs orally supplemented with humic acids. *Res Vet Sci* 96: 308–310.
- Coenen M, Mößeler A, Vervuert I (2006):** Fermentative gases in breath indicate that inulin and starch start to be degraded by microbial fermentation in the stomach and small intestine of the horse in contrast to pectin and cellulose. *J Nutr* 136: 2108–2010.
- Costa MC, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Stämpfli HR, Kim PT, Sturgeon A, Weese JS (2012):** Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3–V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS One* 7: e41484.
- Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P, Weese JS (2015a):** Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Vet J* 205: 74–80.
- Costa MC, Staempfli HR, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Gomes RG, Weese JS (2015b):** Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. *BMC Vet Res* 11: 19.
- Costa MC, Stämpfli HR, Allen-Vercoe E, Weese JS (2016):** Development of the faecal microbiota in foals. *Equine Vet J* 48: 681–688.
- Coverdale JA (2016):** Horse species symposium: Can the microbiome of the horse be altered to improve digestion? *J Anim Sci* 94: 2275–2281.
- Cummings JH, Englyst HN (1987):** Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr* 45: 1243–55.
- Cummings JH and Macfarlane GT (1991):** The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 70: 443–459.
- Daly K, Stewart CS, Flint HJ, Shirazi-Beechey SP (2001):** Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol* 38: 141–151.
- De Fombelle A, Varloud M, Goachet AG, Jacotot E, Philippeau C, Drogoul C, Julliand V (2003):** Characterisation of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses fed two distinct diets. *Anim Sci* 77: 293–304.
- Dougal K, Harris PA, Edwards A, Pachebat JA, Blackmore TM, Worgan HJ, Newbold CJ (2012):** A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. *FEMS Microbiol Ecol* 82: 642–652.
- Dougal K, de la Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Newbold CJ (2013):** Identification of a core bacterial community within the large intestine of the horse. *PLoS ONE* 8: e77660.
- Dougal K, La Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Geor RJ, Nielsen BD, Schott HC 2nd, Elzinga S, Newbold CJ (2014):** Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. *PLoS ONE* 9: e87424.
- Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LMT (2009):** *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* diversity in horse feces, revealed by PCR-DGGE. *Curr Microbiol* 59: 651–655.
- Feary DJ, Hassel DM (2006):** Enteritis and colitis in horses. *Vet Clin Equine* 22: 437–479.
- Fernandes KA, Kittelmann S, Rogers CW, Gee EK, Bolwell CF, Bermingham EN, Thomas DG (2014):** Faecal microbiota of forage-fed horses in New Zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. *PLoS One* 9: e112846.
- Flickinger EA, Van Loo J, Fahey GC Jr (2003):** Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43: 19–60.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization (2002):** Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations [online].
- Garrett LA, Brown R, Poxton IR (2002):** A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. *Vet Microbiol* 87: 81–88.
- Glatter M, Wiedner K, Hirche F, Mielenz N, Hillegeist D, Bochnia M, Cihak A, Bachmann M, Greef JM, Glaser B, Wolf P, Breves G, Zeyner A (2016):** Fermentation Characteristics along the gastrointestinal tract after feeding of Jerusalem Artichoke meal to adult healthy warmblood horses. *J Anim Res Nutr* 1:16.
- Golbs S (1983):** Experimentelle Untersuchungen zur pharmakologischen Wirksamkeit und zur Pharmakodynamik von Huminsäuren unter besonderer Berücksichtigung koergistischer Effekte und ihrer therapeutischen sowie prophylaktischen Wirkung bei Schweinen. Doctoral Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig.
- Grønvald, AM R, L'Abée L, Trine M, Strand E, Sørum H, Yannarell AC, Mackie RI (2010):** Fecal microbiota of horses in the clinical setting: potential effects of penicillin and general anesthesia. *Vet Microbiol* 145: 366–372.
- Gustafsson A, Baverud V, Gunnarsson A, Horn af Rantzien M, Lindholm A, Franklin A (1997):** The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden. *Equine Vet J* 29: 314–318.
- Gustafsson A (2004):** Antibiotic associated diarrhea in horses. With special reference to *Clostridium difficile*. Doctoral Thesis, Department of Large Animal Clinical Sciences, Uppsala.

- Götze T (1986):** Untersuchungen zur Verteilung von Huminsäuren (Natriumhumat, Huminsäurekonzentrat und Sulumin) sowie Carbo medicinalis® und Adsorgan® im Rattendarm. Diploma Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig.
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ (2008):** Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 104–119.
- Harlow BE, Lawrence LM, Flythe MD (2013):** Diarrhea-associated pathogens, lactobacilli and cellulolytic bacteria in equine feces: responses to antibiotic challenge. *Vet Microbiol* 166: 225–232.
- Harlow, BE (2015):** Impact of starch source on equine hindgut microbial ecology. Theses and Dissertations, Animal and Food Sciences 55., University of Kentucky, USA.
- Harlow BE, Donley TM, Lawrence LM, Flythe MD (2016):** Effect of starch source (corn, oats or wheat) and concentration on fermentation by equine faecal microbiota in vitro. *J Appl Microbiol* 119: 1234–1244.
- Hastie PM, Mitchell K, Murray J-AM (2008):** Semiquantitative analysis of *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* and *Streptococcus bovis* in the equine large intestine using real-time polymerase chain reaction. *Br J Nutr* 100: 561–568.
- Julliard V, de Vaux A, Millet L, Fonty G (1999):** Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the Predominant Cellulolytic Bacterial Species of the Equine Cecum. *Appl Environ Microbiol* 65: 3738–3741.
- Julliard V, Zeyner A (2008):** The pros and cons of probiotics. In: Robinson NE, Sprayberry KA (eds.), *Current Therapy in Equine Medicine*. 6th ed. Saunders, St. Louis, 83–86.
- Julliard V, Grimm P (2016):** Horse species symposium: The microbiome of the horse hindgut: History and current. *J Anim Sci* 94: 2262–2274.
- Kircher M, Kelso J (2010):** High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations. *BioEssays* 32: 524–536.
- Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, Kwon Y-M, Hanson JM, Neish AS (2009):** The bacterial fermentation product butyrate influence epithelial signaling via ROS mediated changes in Cullin-1 neddylation. *J Immunol* 182: 538–546.
- Kühnert M, Fuchs V, Golbs S (1989):** Pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften von Huminsäuren und ihre Wirkungsprofile für eine veterinärmedizinische Therapie. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 96: 3–10.
- Kühnert M, Lange N, Gottschalk J, Dedek W, Seffner W, Haase A, Höke A (1994):** Untersuchungen zum Durchtritts- und Resorptionsverhalten von ¹⁴C-markiertem HS 1500 aus dem Magen-Darm-Kanal der Laboratoriumsratte. Untersuchungsbericht, Universität Leipzig und Sopar Pharma GmbH Mannheim (unveröffentlicht).
- Lange N, Kühnert M, Haase A, Höke H, Seubert B (1996):** Untersuchungen zum Resorptionsverhalten eines niedermolekularen synthetischen Huminstoffes nach einmaliger oraler Applikation an der Ratte. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 103: 134–135.
- Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, Welling GW (1995):** Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 61: 3069–3075.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006):** Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124: 837–848.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleiferl KH (1996):** Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142: 1097–1106.
- McGorum BC, Pirie RS (2009):** Antimicrobial associated diarrhea in the horse. Part 1. Overview, pathogenesis and risk factors. *Equine Vet Educ* 21: 610–616.
- McGorum BC, Pirie RS (2010):** Antimicrobial associated diarrhea in the horse. Part 2: Which antimicrobials are associated with AAD in the horse? Review Article. *Equine Vet Educ* 22: 43–50.
- Meier H, Amann R, Ludwig W, Schleiferl KH (1999):** Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content. *Syst Appl Microbiol* 22: 186–196.
- Mikkelsen LL, Jaokobsen M, Jensen BB (2003):** Effects of dietary oligosaccharides on microbial diversity and fructo-oligosaccharide degrading bacteria in faeces of piglets postweaning. *Anim Feed Sci Technol* 109: 133–150.
- Milnovich GJ, Trott DJ, Burrell PC, Croser EL, Al Jassim RA, Morton JM, van Epss AW, Pollitt CC (2007):** Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environ Microbiol* 9: 2090–2100.
- Miraglia N, Poncet C, Martin-Rosset W (1992):** Effect of feeding level, physiological-state and breed on the rate of passage of particulate matter through the gastrointestinal-tract of the horse. *Ann Zootech* 42: 69.
- Morgan LM, Coverdale JA, Froetschel MA, Yoon I (2007):** Effect of yeast culture supplementation on digestibility of varying forage quality in mature horses. *J Equine Vet Sci* 27: 260–265.
- Mountzouris KC, Balaskas C, Franseca F, Tuohy KM, Gibson GR, Fegeras K (2006):** Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. *Anaerobe* 12: 178–185.
- Mößeler AK (2004):** Effekte verschiedener Kohlenhydrate (Cellulose, Pektin, Stärke und Inulin) auf die Wasserstoff- und Methanexhalation beim gesunden Pferd. Doctoral Thesis, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation.
- Murray JA, Longland A, Moore-Colyer M, Dunnett C, Longland A (2014):** The effect of feeding a low- or high-starch diet on equine faecal parameters. *Livestock Sci* 159: 67–70.
- O'Donnell M, Harris H, Jeffery I, Claesson M, Younge B, O'Toole P, Ross R (2013):** The core faecal bacterial microbiome of Irish Thoroughbred racehorses. *Lett Appl Microbiol* 57: 492–501.
- Park J, Floch MH (2007):** Prebiotics, probiotics and dietary fiber in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Clin North Am* 36: 47–63.
- Pearson RA, Merritt JA (1991):** Intake, digestion and gastrointestinal transit time in resting donkeys and ponies and exercised donkeys give ad libitum hay and straw diets. *Equine Vet J* 23: 339–334.
- Pharmawerk Weinböhla (2000):** Produktinformation.
- Philippeau C, Saded-Bourgeteau S, Varloud M, Julliard V (2015):** Impact of barley form on equine total tract fibre digestibility and colonic microbiota. *Animal* 9: 1943–1948.
- Plumhoff MS (2004):** Bildung (Menge und Dynamik) von Fermentationsprodukten von Futtermitteln mit unterschiedlichen Gehalten an fermentierbaren Kohlenhydraten in einem in-vitro System mit Faeces von Pferden. Doctoral Thesis, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation.

- Pollitt CC, van Eps AW (2002):** Equine laminitis: a new induction model based on alimentary overload with fructan. Proc. Austr. Equine Vet. Assoc., Bain-Fallon Memorial Lectures.
- Proudman C, Hunter J, Darby A, Escalona E, Batty C, Turner C (2015):** Characterisation of the faecal metabolome and microbiome of Thoroughbred racehorses. Equine Vet J 47: 580–586.
- Reed SM (2010):** Equine Internal Medicine. 3rd ed. Saunders Elsevier, St. Louis.
- Respondek F, Goachet AG, Julliand V (2008):** Effects of dietary short-chain fructooligosaccharide on the intestinal microflora of horses subjected to a sudden change in diet. J Anim Sci 86: 316–323.
- Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP (2015):** High-throughput sequencing technologies. Molecular Cell 58: 586–597.
- Roberfroid MB, Delzenne NM (1998):** Dietary fructans. Annu Rev Nutr 18: 117–143.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Leotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A, (2010):** Probiotic effects: metabolic and health benefits. Br J Nutr 104 Suppl 2: S1–S63.
- Roediger WE (1980):** The colonic epithelium in ulcerative colitis: An energy-deficiency disease? Lancet 2: 712–715.
- Roussel AJ, Hooper RN, Cohen ND, Bye AD, Hicks RJ, Bohl TW (2000):** Prokinetic effects of erythromycin on the ileum, cecum, and pelvic flexure of horses during the postoperative period. Am J Vet Res 61: 420–424.
- Roussel AJ, Hooper RN, Cohen ND, Bye AD, Hicks RJ, Schulze JL (2003):** Evaluation of the effects of penicillin G potassium and potassium chloride on the motility of the large intestine in horses. Am J Vet Res 64: 1360–1363.
- Rolfe RD (2000):** The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J Nutr 130: 396–402.
- Sadet-Bourgeteau S, Philippeau C, Dequiedt S, Julliand V (2014):** Comparison of the bacterial community structure within the equine hindgut and faeces using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). Animal 8: 1928–1934.
- Schmidt RE, Thewes G (1997):** Physiologie des Menschen. 27. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 835–840.
- Schoster A, Arroyo LG, Staempfli HR, Weese JS (2013):** Comparison of microbial populations in the small intestine, large intestine and feces of healthy horses using terminal restriction fragment length polymorphism. BMC Res Notes 6: 91.
- Schoster A, Weese JS, Guardabassi L (2014):** Probiotic use in horses – what is the evidence for their clinical efficacy? J Vet Intern Med 28: 1640–1652.
- Schoster A (2015):** Probiotika Einsatz beim Pferd – Sinn oder Unsinn. In: Herbsttagung der Vereinigung der Österreichischen Pferdetierärzte (VÖP), Mauerbach, Österreich, 19. November 2015: 1–5.
- Schoster A, Staempfli HR, Abrahams M, Jallali M, Weese JS, Guardabassi L (2015):** Effect of a probiotic on prevention of diarrhea and *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* shedding in foals. J Vet Intern Med 29: 925–931.
- Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J (2000):** Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridisation. Appl Environ Microbiol 66: 2263–2266.
- Shepherd ML, Swecker WSJ, Jensen RV, Ponder MA (2012):** Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. FEMS Microbiol Lett 326: 62–68.
- Shi N, Li N, Duan X, Niu H (2017):** Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. Military Medical Res 4: 14.
- Sommer G (1960):** Zur Bestimmung der Huminsäuren in Badetorfen. Z Analyt Chemie 176: 347–355.
- Souci SW (1956):** Neuere Erkenntnisse über die chemische Zusammensetzung des Badetorfes als Grundlage seiner balneotherapeutischen Bewertung. Heil- und Kurort 8: 43.
- Steelman SM, Chowdhary BP, Dowd S, Suchodolski J, Janecka JE (2012):** Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. BMC Vet Res 8: 231.
- Stein K (1994):** Vergleichende Untersuchungen zu ausgewählten pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften verschiedener Huminsäurenprodukte. Doctoral Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig.
- Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale IP, Iochs H (2005):** Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. J Clin Microbiol 43: 3380–3389.
- Swidsinski A (2006):** Standards for bacterial identification by fluorescence in situ hybridization within eukaryotic tissue using ribosomal rRNA-based probes. Inflamm Bowel Dis 12: 824–826.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V (2017):** Evaluation of Polymicrobial Involvement Using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Clinical Practice. In: Thomas Liehr (ed.), Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). 2nd ed. Springer Protocols Handbooks, Berlin, Heidelberg, 531–543.
- Vernia P, Annese V, Bresci G, d’Albasio G, D’Inca R, Giaccari S, Ingrosso M, Mansi C, Riegler G, Valpiani D, Caprilli R (2003):** Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis: results of a multicentre trial. Eur J Clin Invest 33: 244–248.
- Weese JS (2000):** *Clostridium difficile* associated enterocolitis in adult horses and foals. Doctoral Thesis, The University of Guelph, Ontario, Canada.
- Weese JS, Rousseau J (2005):** Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. J Am Vet Med Assoc 226: 2031–2034.
- White G, Prior SD (1982):** Comparative effects of oral administration of trimethoprim/sulphadiazine or oxytetracycline on the faecal flora of horses. Vet Rec 111: 316–318.
- Zhang H, Feng J, Zhu W, Liu C, Gu J (2000):** Bacteriostatic effects of cerium-humic acid complex: an experimental study. Biol Trace Elem Res 73: 29–36.
- Zentek J, Pascher M, Röttger S (2008):** Probiotika beim Pferd, Hilfe oder Hoffnung. Pferdeheilkd 24: 524–528.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Gerald Fritz Schusser
 Medizinische Tierklinik
 Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
 An den Tierkliniken 11
 04103 Leipzig Germany
 schusser@vetmed.uni-leipzig.de

4. Diskussion

In einer klinischen Studie an der Medizinischen Tierklinik Leipzig wurde über zwei Jahre (2015 - 2017) die fäkale Mikrobiota von erkrankten Pferden (Gruppen 3 und 4) unter Antibiotikatherapie vergleichend zu Proben von gesunden Pferden (Gruppen 1 und 2) untersucht. Zusätzlich wurde sowohl einem Teil der gesunden Pferde (Gruppe 2) als auch einem Teil der erkrankten Pferde (Gruppe 4) ein Huminsäurepräparat (Pharmawerk Weinböhla) mit Inulin aus Topinamburmehl appliziert.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der equinen fäkalen bakteriellen Darmflora hinsichtlich quantitativer Veränderungen unter antibiotischer Therapie sowie Substitution mit Huminsäuren und präbiotisch wirksamem Topinambur-, Grün- und Reismehl. In der Konzeption interessierte besonders die Frage, inwieweit eine antibakterielle systemische Therapie Störungen der kommensalen Darmflora hervorrufen kann, die über quantitative Messungen von spezifischen, enteralen und kommensalen Darmbakterien nachzuvollziehen sind und wie sich die Fütterung des Huminsäurepräparates darauf auswirkt.

Vergleichbare Studien wurden bisher nicht veröffentlicht. Die Mehrzahl der bisher vorliegenden Studien untersuchten die fäkale und intestinale Mikrobiota an Versuchspferden, die nicht erkrankt waren.

Es handelt sich um eine klinische Studie, da die Überprüfung unter realistischen, dem tierärztlichen Alltag entsprechenden Bedingungen stattfinden sollte. Dementsprechend war die Durchführung der Studie vom vorhandenen Patientengut und von der Integrierbarkeit der einzelnen Pferdepatienten während des Studienzeitraumes abhängig, was die unterschiedliche Anzahl der Pferde pro Gruppe erklärt. Durch das variable Patientengut ergab sich ein breites Spektrum hinsichtlich der Rassen der untersuchten Pferde. Auch die Altersstruktur der Pferde in der Studie entsprach einem Querschnitt durch das übliche Patientengut der Medizinischen Tierklinik. Eine Auflistung der Pferde der einzelnen Gruppen einschließlich der zugrundeliegenden Erkrankungen ist in Tabelle 3 dargestellt.

4.1 Beurteilung der Methode

Die Auswertung erfolgte per FISH im Molekularlabor der Abteilung Gastroenterologie der Charité Berlin. Die FISH wurde in dieser Studie als etablierte Methode genutzt, um ausgewählte, enterale, kommensale Bakterien in den aufbereiteten Fäzesproben zu detektieren. Wie beschrieben, ist die FISH eine geeignete und schnelle durchführbare Methode zur Detektion und quantitativen Messungen von Bakterien (AMMAN et al. 1995; BLASCO et al. 2003). Das zügige Bearbeiten gelang vor allem durch die Nachweisführung direkt im Material (JOHN et al. 1969;

PARDUE und GALL 1969) ohne vorherige Extraktion der nachzuweisenden Nukleinsäuren aus den Bakterien. Da eine zügige Bearbeitung der Proben wichtig ist, um das Absterben von Bakterien zu minimieren und dadurch keine falsch-negativen Ergebnisse zu erzielen, wie durch LUDWIG und SCHLEIFER (1994) sowie OTTOW (2011) dargestellt, musste eine geeignete Fixier- und Lagerungslösung verwendet werden, um die Proben auf dem Transportweg von der Tierklinik ins Labor bestmöglich zu schützen. Die Verwendung der Carnoy-Lösung (SWIDSINSKI 2006) war daher bedeutend für die Stabilisierung und Fixierung der Proben in der Zeit von der Probenentnahme bis zur Aufbereitung mittels FISH. Der Wassergehalt der Fäzes erwies sich zunächst als problematisch, da er zu Verdünnung der Carnoy-Lösung führte. Außerdem mussten die groben Faseranteile der Fäzes zerkleinert werden, um eine repräsentative Probe zu erhalten. In mehreren Vorversuchen wurde die Homogenisierung der Probe optimiert und die Konzentration der Fixierlösung eingestellt.

Für diese Studie wurden Kotproben als Untersuchungsmaterial verwendet, da es sich um eine klinische Studie an Patienten sowie gesunden Kontrolltieren handelte, deren Beprobung nur auf diesem Wege so möglich war. Der Vorteil der fäkalen Analyse ist die einfach realisierbare Probenentnahme. Bedeutend aufwendiger und komplizierter ist die Probenbeschaffung direkt aus den einzelnen Darmabschnitten da sie fistulierte oder anästhesierte Pferde erfordert. Die Entnahme von Ingestaprobe von euthanasierten, gesunden Pferden war für das Studienziel ethisch nicht vertretbar. Die Quantitätsveränderungen der bakteriellen Mikrobiota sind auch in der fäkalen, mikrobiellen Zusammensetzung nachzuweisen sein, das wurde bereits in anderen Studien gezeigt (DOUGAL et al. 2014; PROUDMAN et al. 2015) und auch andere Autoren zogen Rückschlüsse auf die intestinale Mikrobiota von Pferden aus Fäzes (COSTA et al. 2012; SHEPARD et al. 2012; STEELMANN et al. 2012; O'DONNELL et al. 2013; SADET-BOURGETEAU et al. 2014). Zur Charakterisierung der Bakterienpopulation in Fäzes wurden drei rRNA-spezifische Oligonukleotidsonden ausgewählt. Die phylumübergreifende Sonde EUB 338, von AMANN et al. (1990) für Eubakterien etabliert, wurde gewählt, um übersichtlich und allgemein Veränderung der Eubakterien wahrzunehmen (Abb. 6). Die CF 319a-Sonde diente der Identifizierung des *Bacteroidetes*-Stammes (MANZ et al. 1996), der in anderen Studien am zweithäufigsten in Kotproben von gesunden Pferden nachzuweisen war (DOUGAL et al. 2013; MOREAU et al. 2014; HANSEN et al. 2015; PROUDMAN et al. 2015; COSTA et al. 2015a) und der besonders bei an Colitis erkrankten Pferden vermehrt auftrat (COSTA et al. 2015b). Mit der Bif 164-Sonde kann die grampositive Bakterienart *Bifidobacterium spp.* identifiziert werden (LANGENDIJK et al. 1995). Das war in der Untersuchung wichtig, um einen etwaigen stimulierenden Effekt des Inulinhaltigen Präbiotikums auf diesen Pionierkeim zu überprüfen.

Die Detektionsgrenze für die hier verwendete FISH ist auf $<10^6$ /ml festgesetzt worden, da die Anfälligkeit für eine fehlerhafte, mikroskopische Auswertung bei einer Bakterienzahl von $<10^6$ /ml erhöht ist. Da sowohl in Fäzes als auch intestinal durchschnittliche Konzentrationen von Anaerobiern von $7,4 \times 10^7 - 3,7 \times 10^9$ /ml (DE FOMBELLE et al. 2003), $6,1 \times 10^8$ CFU/g aus dem Colon (MACKIE und WILKINS 1988) oder $10^7 - 10^{11}$ Zellen/ml im Blind- und Grimmdarm ermittelt werden konnten (SADET-BOURGETEAU und JULLIAND 2012), wurde die Festlegung der Detektionsgrenze für die Untersuchung als nicht problematisch erachtet. Bei einem starken Abfall war die Reduktion der Bakterienzahl eindeutig und die Ergebnisse der Vorversuche zeigten, dass die Bakterienzahlen in der Regel über der Detektionsgrenze lagen. In den Abbildungen und Tabellen symbolisieren die Nullwerte die untere Detektionsgrenze von $<10^6$ Bakterien/ml (GRANEß et al. 2018).

4.2 Einfluss von Antibiotika (Gruppe 3 und Gruppe 4)

Die Pferdepatienten der Medizinischen Tierklinik Leipzig, die eine antibiotische Therapie mit Amoxicillin (15 mg/kg, i.v., 2x/Tag) und Gentamicin (6,6 mg/kg, i.v./Tag) erhielten und deren Besitzer der Teilnahme an der Studie zustimmten, wurden randomisiert auf die Gruppen 3 und 4 verteilt.

Aufgrund vorzeitiger Entlassung oder dem Versterben einzelner Pferde dieser Gruppen, nahm die Probenanzahl je Probenstag zum Ende der Studie hin ab. Die Erkrankungen der Pferde sowie die Therapiedauer sind tabellarisch dargestellt (GRANEß et al. 2018). Die Antibiotikatherapie sollte über eine Dauer von mindestens drei Tagen erfolgen, doch richtete sich die exakte Dauer der Therapie vor allem nach der Grunderkrankung und dem klinischen Verlauf. Über die drei Oligonukleotidsonden konnten in den Proben, die initial genommen wurden, außer bei den Pferden mit Darmentzündungen (siehe Kapitel 4.2.4), keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Die Darstellung des antibakteriellen Einflusses durch Amoxicillin und Gentamicin ist in der Abb. 2 gezeigt (GRANEß et al. 2018). Am Tag 3 der Untersuchung war eine statistisch nicht signifikante Reduktion der Eubakterien ($p = 0,1842$) sowie der Spezies *Bifidobacterium* ($p = 0,1202$) festzustellen (Abb. 2) (GRANEß et al. 2018). Das könnte mit der ersten Antibiotikagabe 48 Stunden in Zusammenhang stehen. Andere Untersuchungen stellten auch bereits 24 Stunden nach der ersten antibiotischen Behandlung eine Veränderung der Darmflora fest (COCHETIERÈ et al. 2008; DETHLEFSEN und RELMAN 2011; COSTA et al. 2015b). COSTA et al. (2015b) konnten ebenso den Haupteffekt antibakterieller Therapie auf die Darmflora beim Pferd noch während der Antibiotikatherapie ausmachen. Allerdings stiegen in unserer Untersuchung die Bakterienzahlen für Eubakterien sowie *Bifidobacterium spp.* an den nachfolgenden Proben tagen 5 und 7 wieder an.

Die Maximalwerte erreichten sogar $3,0 \times 10^9$ /ml für Eubakterien und $1,0 - 1,5 \times 10^8$ /ml für *Bifidobacterium spp.* (GRANEß et al. 2018), was mit der therapeutischen bedingten Besserung des Allgemeinbefindens der Pferde mit verbesserter Futteraufnahme zusammenhängen könnte. Die Klasse *Cytophaga-Flavobacteria* stellte sich gänzlich unbeeinflusst dar (GRANEß et al. 2018), obwohl die Vertreter der Klasse nicht im Einzelnen betrachtet werden konnten. In der Humanmedizin beschrieben die Autoren eine beginnende teilweise Erholung der intestinalen Darmflora erst nach 30 Tagen (JANCZYK et al. 2007; COCHETIERÈ et al. 2008; PEREZ-COBAS et al. 2013), wobei in diesen Studien das intestinale Mikrobiom untersucht wurde.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Amoxicillin als Penicillinderivat trotz breiteren Wirkspektrums gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien und guter Diffusion an Schleimhäuten (KROKER 2010), die bakterielle Darmflora nicht gravierend beeinträchtigte. Basierend auf den vorliegenden Studienergebnissen ist davon auszugehen, dass Gentamicin intestinale Anaerobier bzw. andere bakterielle Mikroben der Darmflora nicht beeinflusst. Gentamicin hemmt ebenfalls mit bakterizider Wirkung ausschließlich aerobe, gramnegative Bakterien und Staphylokokken, jedoch verliert Gentamicin in sauerstoffarmer Umgebung seine Wirkung, da die Aufnahme über ein Sauerstoff-abhängiges Transportsystem geschieht (KROKER 2010).

Bei keinem Pferd der Gruppe 3 wurden durch die antibiotische Therapie Kotveränderungen ausgelöst, diese Beobachtungen stimmen mit der beschriebenen niedrigen Prävalenz einer AAD von 0,6 % unter Therapie mit diesen Antibiotika überein (BARR et al. 2013).

Mit großer Wahrscheinlichkeit erhöht die Art der Applikation der Antibiotika das Risiko einer AAD-Erkrankung, denn auch bei gutem Vermögen zur enteralen Resorption und ausreichendem Wirkspiegel an Schleimhäuten ist anzunehmen, dass die Darmmikroben gegenüber oral verabreichten und somit enteral verfügbaren Antibiotika deren Wirkung stärker ausgesetzt sind, was bereits COSTA et al. (2015b) in ihrer Untersuchung vermuteten.

Dennoch können auch parenteral applizierte Antibiotika mit guter Gewebegängigkeit, erhöhte Wirkspiegel an der Darmschleimhaut erzeugen (KROKER 2010). Inwieweit der nephrogene oder hepatogene Eliminationsweg der Antibiotika einen Einfluss auf die Darmflora hat, ist bisher nicht untersucht. Nach Diversitätsrecherchen zum intestinalen Mikrobiom des Pferdes war das grampositive Phylum *Firmicutes* am häufigsten vertreten (DOUGAL et al. 2013; COSTA et al. 2015b). Folglich könnten Antibiotika mit selektiver Wirkung gegen grampositive Bakterien ein größeres Risiko besitzen, Dysbiosen und Colitis bei Pferden hervorzurufen, wie es etwa für die Erythromycin-induzierte Colitis bei Stuten beschrieben ist (GUSTAFSSON et al. 1997). Daraus kann man schlussfolgern, dass oral applizierte Antibiotika und vor allem gegen grampositive Bakterien wirksame Antibiotika wie Makrolide, Tetracykline, Trimethoprim-Sulfadiazine und

Fluorchinolone (GUSTAFSSON et al. 1997; HARLOW et al. 2013; BARR et al. 2013; COSTA et al. 2015b), in Hinblick auf die Auslösung einer AAD besonders risikobehaftete Antibiotika sein könnten. Derzeit wird allerdings das Risiko von reinen Breitspektrum-Antibiotika bezüglich der Störung der autochthonen Darmflora und der Entstehung von Dysbiosen als höher angesehen (MCFARLAND 1998; MCGORUM und PIRIE 2009; COSTA et al. 2015b).

In dieser Studie verursachten Amoxicillin und Gentamicin keine signifikante Reduktion der Bakterienzahl in den Fäzes. Amoxicillin und Gentamicin können daher bezüglich des Auslösens einer AAD beim Pferd als sichere Antibiotika angesehen werden.

4.3 Effekt des Präbiotikums (Gruppe 2 und Gruppe 4)

Die Dosierung des Präbiotikums mit 1,5 g/kg KM entsprach den Dosierungen von Mischfutterzubereitungen und den Empfehlungen des Pharmawerkes Weinböhla. Im Vergleich zu anderen Studien mit präbiotischen Substanzen stellte sich heraus, dass diese Dosierung eher als gering einzustufen war, da der Anteil an Topinambur-, Grün- und Reismehl in der verwendeten Mischung bei 70 % lag. Studien zur Hundefütterung verwendeten Dosierungen präbiotischer Substanzen von 2 - 4 g/kg KM (BARRY et al. 2009), 9 g/kg KM (FLICKINGER et al. 2003b) sowie 10 - 15 g/kg KM (HOWARD et al. 2000; BELASHAPKA et al. 2012). Inulin wurde bei Untersuchungen zur Verdauung bei Schweinen sogar durchschnittlich in einer Dosierung von 20 - 40 g/kg KM (KLEIN GEBBINK et al. 2001) und bei Kälbern in einer Dosierung von 3 - 7 g/kg KM eingesetzt (VERDONK und VAN LEEUWEN 2004). Dennoch hätte eine höhere Dosierung aufgrund der Formulierung zu höheren Futtervolumina geführt, die nur schlecht aufgenommen worden wären. Eine veränderte Formulierung mit höherer Huminsäurenkonzentration wäre für weitere Untersuchungen wünschenswert. In der Anwendung bei Tieren orientierte sich die Dosis von Präbiotika an 10 - 20 % der totalen Nahrungsaufnahme über 14 - 21 Tage (MORGAN et al. 2007; RESPONDEK et al. 2008a; LIU et al. 2008; VERBRUGGHE et al. 2009; RESPONDEK et al. 2011; SOHAIL et al. 2012; GHOSH und MEHLA 2012; HALAS und NOCHTA 2012).

Bei der hier verwendeten Konzentration des Inulins im Topinambur-haltigen Präbiotikum war keine Gefahr der Auslösung von Fruktan-assoziiertes Hufrehe bei den Pferden der Gruppe 2 und 4 zu befürchten.

Das Präbiotikum wurde über 7 Tage einmal täglich gefüttert. Eine längere Applikationsdauer war für die Gruppe 2 und 4 nicht möglich, da sie sich an der durchschnittlichen Dauer der Antibiotikatherapie und des Klinikaufenthalts der Pferde orientierte. In anderen Studien war die Anwendungszeit von Präbiotika mit 12 - 14 Tagen (BÜSING et al. 2011; BÜSING et al. 2014) oder 21 - 28 Tagen (MORGAN et al. 2007; RESPONDEK et al. 2008; DOUGAL et al. 2014) deutlich

länger. Jedoch beträgt die mittlere intestinale Transitzeit bei Pferden mit Heufütterung 25 - 36 Stunden (WOLTER et al. 1974; MIRAGLIA et al. 1992), daher werden die präbiotischen Substanzen den Verdauungstrakt in jedem Fall im Untersuchungszeitraum komplett durchlaufen haben. 24 Stunden nach der ersten Aufnahme des Präbiotikums zeigte sich die Kotfärbung auffällig dunkler aufgrund der dunklen Huminstoffe. Die Kotkonsistenz (Diarrhoe) verbesserte sich binnen 24 Stunden in Richtung der physiologischen Konsistenz. Obwohl der Anteil an Huminsäuren in diesem präbiotischen Produkt nur bei 15 % lag, waren diese Effekte zu beobachten. Wie GOLBS (1983) es schon beschrieben hatte, besitzen die Huminsäuren sehr gute Puffer- und Absorptionskapazitäten, die den Einsatz der Huminsäuren als Futterzusatzstoff mit therapeutischem Zweck bei der Behandlung von Durchfallerkrankungen, wie von KÜHNERT et al. (1989) und STEIN (1994) dargestellt, rechtfertigen.

Ein stimulierender Effekt der präbiotischen Substanzen konnte in der Auswertung mit den Oligonukleotidsonden, beispielsweise für *Bifidobacterium spp.* nicht beobachtet werden. Für die grampositiven *Bifidobacterium spp.* ergab sich eine erkennbare Reduktion über alle Probenstage in der Gruppe 4 (Abb. 3). Da kein stimulierender Einfluss des Präbiotikums auf die Bifidobakterienzahlen der Gruppe 2 wahrnehmbar war (Abb. 3), wird dieser mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in Gruppe 4 ausgeblieben sein. Die niedrigen Bifidobakterienzahlen in der Gruppe 4 könnten mit den Erkrankungen der Pferde zusammenhängen oder durch die antibiotische Therapie bedingt sein.

GLATTER et al. (2016) konnten ebenfalls keinen stimulierenden Effekt bei der Applikation von Inulin, gemessen am Vorkommen von Fermentationsprodukten in den distalen Anteilen des Darmtraktes von Pferden, nachweisen. Ebenso dokumentierten ENDO et al. (2009) nur geringe Konzentrationen von Bifidobakterien in Fäzes von Pferden. In der Ermittlung des intestinalen prozentualen Anteils von Bifidobakterien war die Konzentration in Caecum bis Rektum beim Schwein ebenfalls signifikant reduziert (MOUNTZOURIS et al. 2006). Auch lagen die Bifidobakterien anteilig in der intestinalen porzinen Mikroflora lediglich bei 1,0 - 1,1 %, ähnlich humanmedizinischer Werte mit Gehalten unter 2 % für *Bifidobacterium*, *Lactococcus* sowie *Enterococcus* (SGHIR et al. 2000). In Untersuchungen bei Hunden konnten FLICKINGER et al. (2003a) mit der Fütterung von Oligofruktose in verschiedenen Dosen von 3, 6 und 9 g/kg KM zwar eine lineare Erhöhung der aeroben, bakteriellen Population erzielen, aber keinen Einfluss auf Laktobazillen und Bifidobakterien in Fäzes nachweisen. Genauso erging es SWANSON et al. (2002) bei der Verwendung von Fructo-Oligosacchariden (2 g/kg KM/Tag). Über die Fütterung von Chicorée-Wurzel (10 g/kg KM/Tag) konnten allerdings GRIESHOP et al. (2004) allerdings eine Erhöhung von Bifidobakterien in Hundefäzes messen. Zu erklären ist das mit dem mehr als doppelt so hohen Anteil an Inulin in Chicorée-Wurzel im Vergleich zur Jerusalem-Artischocke

(MOSHFEGH et al. 1999). In unserer Untersuchung zeigte sich ein durchschnittlicher Gehalt an Bifidobakterien in Fäzes von $\leq 1,5 \times 10^8$ /ml heraus, was den gegenwärtigen Erkenntnissen entspricht (SGHIR et al. 2000; MOUNTZOURIS et al. 2006; ENDO et al. 2009).

Für die Zahl der Eubakterien konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen 2 und 4 festgestellt werden. In der Betrachtung der Resultate für die Klasse der *Cytophaga-Flavobacteria* sind allerdings die Medianwerte der Gruppe 4 alle insgesamt höher im Vergleich zur Gruppe 2. Inwiefern dies auf einen stimulierenden Effekt durch die präbiotische Substanz zurückzuführen ist und warum dieser für Gruppe 2 ausblieb, kann nicht konkret beantwortet werden. Eine mögliche Erklärung wäre die gute Futteraufnahme der Pferde der Gruppe 2 (gesunde Pferde), die über den erhöhten Eintrag an resistenter Stärke zur Behinderung der Fermentation des Inulins beigetragen haben könnte.

Die Heterogenität der nicht signifikanten Ergebnisse macht Interpretationen schwierig. Höhere Fallzahlen wären deshalb wünschenswert gewesen und sind für weiterführende Studien anzustreben.

4.4 Pferde mit akuter Colitis

Unter den erkrankten Pferden waren auch Pferde mit einer diagnostizierten Colitis, die für die Analyse der Mikrobiota der Fäzes besonders interessant waren. Die Verteilung der Pferde mit Colitis auf die Gruppen 3 und 4 erfolgte zufällig. Leider mussten vier Pferde die Gruppe 3 aufgrund von Euthanasie oder perakutem Versterben vorzeitig verlassen, sodass daher in dieser Gruppe außer der Initialprobe keine weitere Beprobung von Pferden mit Colitis möglich war. Aus der Gruppe 4 mussten vier Pferde aufgrund von endotoxämischer Hufrehe infolge der Colitis ohne Heilungschancen zu späteren Zeitpunkten euthanasiert werden (GRANEß et al. 2018).

In den Ausgangsproben der Pferde mit Colitis aus Gruppe 3 waren die Eubakterien insgesamt deutlich erniedrigt mit einem Median von $0,75 \times 10^8$ /ml im Vergleich zu den Pferden mit Colitis der Gruppe 4 mit $6,0 \times 10^8$ /ml ($p = 0,3836$). Diese auffallende Differenz kann mit dem Schweregrad der Erkrankungen zusammenhängen, da die Pferde mit Colitis der Gruppe 3 unmittelbar danach ausschieden.

Im weiteren Verlauf war der Vergleich der Pferde mit Colitis für die zwei Gruppen interessant, um die Wirkung des Präbiotikums zu untersuchen. Leider konnten keine weiteren Ergebnisse der Pferde mit Colitis in Gruppe 3 aufgrund der benannten Gründe erhoben werden. Die Zahlen der Eubakterien blieben für die an Colitis erkrankten Pferde der Gruppe 4 über die weiteren Tage konstant ($M_{3.\text{Tag}} = 1,0 \times 10^9$ /ml, $M_{5.\text{Tag}} = 5,0 \times 10^8$ /ml, $M_{7.\text{Tag}} = 7,5 \times 10^8$ /ml). Klinisch sprachen die verbleibenden Pferde schnell und gut auf die Therapie mit Antibiotika, Antiphlogistika, Infusionstherapie sowie die Supplementierung des Präbiotikums an. Die Kotkonsistenz besserte

sich innerhalb von 24 Stunden nach der ersten Aufnahme des Präbiotikums, was wahrscheinlich auf die gute Wasserabsorption und Pufferkapazitäten der Huminsäuren zurückzuführen ist. Die Entstehung einer Hufrehe ließ sich trotz prophylaktischer Maßnahmen bei manchen Pferden nicht verhindern. Die bakteriologische Untersuchung der Fäzes ergab bei zwei an Colitis erkrankten Pferden der Gruppe 4 ein mittel- bis hochgradiges Wachstum von *C. perfringens*, jedoch ohne Toxinnachweis.

Da die Pferde bereits mit veränderter Kotkonsistenz und Kolihsymptomen in der Tierklinik vorgestellt wurden, waren auslösende Faktoren nicht mehr zu ermitteln. Es war jedoch auffällig, dass Colitis bei Pferden vor allem in den kühleren bis kalten Jahreszeiten gehäuft auftraten.

Die initialen Kotproben der Pferde mit Colitis enthielten höhere Werte der Vertreter der Klasse *Cytophaga-Flavobacteria* (Stamm *Bacteroidetes*) mit $1,0 \times 10^9$ / ml in Gruppe 3 und $8,5 \times 10^8$ / ml in Gruppe 4. Dieser Sachverhalt stimmt mit den Ergebnissen von COSTA et al. (2015b) überein, die bei Pferden mit Colitis ebenfalls erhöhte Zahlen dieser Bakterien feststellen konnten (Abb. 5).

4.5 Individuelle und äußere Einflussfaktoren

Bei der gesamten Planung der Untersuchung zu berücksichtigen war die individuelle Beeinflussung der Ergebnisse. BLACKMORE et al. (2013) beschrieben bereits eine starke Variation der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms bei gleicher Pferderasse sowie ähnlichen Haltungs- und Fütterungsbedingungen, was O'DONELL et al. (2013) in ihrer Studie bestätigten und auch in der vorliegenden Studie zu beobachten war.

In Studien mit dem Ziel die kommensale Darmflora bei Pferden mittels Hochdurchsatzsequenzierung zu charakterisieren, konnten ebenfalls individuelle sowie darmsegmentabhängige Unterschiede dargestellt werden, die auch von der Bakterienzusammensetzung und -konzentration in Fäzes abwichen (HASTIE et al. 2008; SADETBOURGETEAU und JULLIAND 2010; DOUGAL et al. 2011, 2012; SCHOSTER et al. 2013; FERNANDES et al. 2014; HANSEN et al. 2015; PHILIPPEAU et al. 2015; COSTA et al. 2015a, 2016). Ähnliche Beobachtungen machten auch SUCHODOLSKI et al. (2005) bei Hunden.

Diesen individuellen Einfluss spiegeln wohlmöglich auch die Längen der Antennen der Boxplot-Diagramme, in denen vereinzelt immer wieder Ausreißer vorkamen, wider (Abb. 2, 3, 4).

Weiterhin kann das Alter der Pferde Diversitätsunterschiede erzeugen (SAKAITANI et al. 1999, YUYAMA 2004, DOUGAL et al. 2014). So war bei einem der drei integrierten Fohlen, dem mit einem Alter von drei Wochen jüngsten Tier, festzustellen (Gruppe 3), dass durchweg eine erhöhte Bakterienzahl in Fäzes zu messen war, insbesondere für die *Bifidobacterium spp.* mit Werten über $1,0 \times 10^9$ /ml über alle Probenstage. Die beiden etwas älteren Fohlen, mit drei und fünf Lebensmonaten, präsentierten ähnliche Resultate wie adulte Pferde mit $\leq 1,5 \times 10^8$ /ml. Zu erklären

ist dies höchstwahrscheinlich mit der durch die überwiegende Milchaufnahme des jüngsten Fohlens veränderten Ernährung (JULLIAND et al. 1996). Daraus lässt sich jedoch auch eine Abhängigkeit von der Futterqualität, -zusammensetzung und -herkunft (Regionalität) vermuten, die die intestinale Mikrobiota beeinflussen kann und bereits von VAROUD et al. (2004) und FERNANDES et al. (2014) beschrieben wurde.

In einem Fütterungsversuch von DOUGAL et al. (2014) zur Untersuchung der fäkalen Mikrobiota bekam jedes der 17 Versuchspferde drei unterschiedliche Rationen (faserreiche, faser- und ölreiche sowie faser- und stärkereiche Ration) in einem cross-over-Design nacheinander angeboten. Dabei traten signifikante Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota mit Wechsel der Rationen auf (DOUGAL et al. 2014). Konträr hierzu hatten MURRAY et al. (2014) sowohl mit stärkereichen als auch mit stärkearmen Rationen keine Änderungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota in Fäzes bei Pferden zeigen können. Aufgrund unterschiedlicher Studiendesigns und Analysemethoden sowie gefütterter Rationen sind direkte Vergleiche und Rückschlüsse zu anderen Studien jedoch bisher problematisch.

Während der Untersuchungsphase dieser Studie wurden alle beteiligten Pferde mit Heu in bedarfsgerechten Mengen (1,5 kg/100 kg KM am Tag) sowie mit freiem Zugang zu Wasser versorgt. Die Pferde der Gruppen 1 und 2 zeigten eine konstant gute Futteraufnahme über die gesamte Untersuchungszeit, dennoch waren auch innerhalb dieser Gruppen Schwankungen zu verzeichnen (Abb. 2), die wiederum von der individuellen Verwertung der Nahrung bezüglich Fresszeit, vom Stoffwechsel, von der Bewegung und von anderen Faktoren abhängig sein könnten.

Die Futteraufnahme der Pferde aus den Gruppen 3 und 4 war inkonstant, da die Grunderkrankung das Allgemeinbefinden und damit auch die Futteraufnahme beeinflusste und das Spektrum der Krankheiten der Pferde sehr breit war. Demnach bestehen auch für diese beiden Gruppen Faktoren, die mit den individuellen Krankheitszuständen assoziiert sind, die die Darmflora beeinflusst und Schwankungen verursacht haben könnten. Wahrscheinlich lassen sich über höhere Fallzahlen pro Gruppe die einflussnehmenden Faktoren besser definieren, was für zukünftige Studien bedacht werden sollte.

Weiterführende Untersuchungen zur intestinalen und fäkalen Mikrobiota beim Pferd sind erstrebenswert, um die Zusammenhänge in der Entstehung von Darmentzündungen zu verstehen und auch andere eingesetzte Antibiotika zu überprüfen.

5. Zusammenfassung

Nicole Graneß

Analyse des fäkalen Mikrobioms des Pferdes in Assoziation mit antibiotischer Therapie und Anwendung eines Präbiotikums

Medizinische Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im März 2018

78 Seiten, 1 Publikation, 6 Abbildungen, 502 Literaturangaben, 2 Anhänge

Schlüsselwörter: Pferd, Colitis, Antibiotika-assoziierte Diarrhoe, Mikrobiota, Präbiotikum

Einleitung: Der Einsatz von Antibiotika kann bei Pferden zu Durchfallerkrankungen führen (Antibiotika-assoziierte Diarrhoe (AAD)). Die Ursachen dafür sind noch nicht genau bekannt, wobei die intestinale bakterielle Mikrobiota durch die antibakterielle Therapie massiv verändert sein müsste.

Ziel der Untersuchung: Gegenstand der klinischen Studie war daher Ursachen der AAD zu ergründen und Therapiemöglichkeiten von Darmwandentzündungen und Diarrhoe mit einem Präbiotikum zu überprüfen. Mit Hilfe ausgewählter Oligonukleotidsonden spezifisch für enterale Bakterien, sollen die fäkale Mikrobiota darmgesunder und systemisch entzündlich erkrankter Pferde vor und nach Antibiotikatherapie und nach Applikation eines Präbiotikums quantitativ analysiert werden.

Material und Methoden: Die klinische Untersuchung umfasste vier Gruppen mit insgesamt 62 Pferden. Die Gruppen 1 und 2 bestanden aus 17 bzw. 11 gesunden Pferden. Die Gruppen 3 und 4 beinhalteten 24 bzw. 10 Pferdepatienten der Medizinischen Tierklinik Leipzig, die alle eine entzündliche Erkrankung hatten und einer antibiotischen Therapie bedurften (Amoxicillin 15,0 mg/kg, i.v., 2x/Tag und Gentamicin 6,6 mg/kg, i.v./Tag). Zusätzlich zu der bedarfsgerechten Heufütterung (1,5 kg/100 kg KM/Tag) wurde den Pferden der Gruppen 2 und 4 über sieben Tage das pelletierte Präbiotikum, bestehend aus Topinambur-, Grün- und Reismehl sowie Huminsäuren WH 67 in der Dosierung 1,5 g/kg KM einmal täglich gefüttert. Für die Analyse des Mikrobioms wurden Fäzesproben (je 1 g pro Probe) rektal entnommen. Die Beprobung erfolgte initial vor Beginn (Tag 0) der antibiotischen Behandlung und präbiotischen Supplementierung sowie an den darauffolgenden Tagen 3, 5 und 7. Die Sedimentanalysen (n = 471) von Fäzes wurden mikroskopisch ausgewertet. Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden die aufbereiteten Fäzesproben unter Verwendung von drei rRNA-spezifischen Oligonukleotidsonden wie der phylumübergreifenden Sonde EUB 338 für Eubakterien, der Sonde

CF 319a für die Klasse der *Cytophaga-Flavobacteria* des Stammes *Bacteroidetes* sowie der Sonde Bif 164 für die Spezies *Bifidobacterium* analysiert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte, in dem die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Bakterien über ein Epifluoreszenzmikroskop in der Probe ermittelt wurden. Die statistische Auswertung ergab mit dem Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung der Datensätze, daher wurden Mediane und interquartile Bereiche für die Bakterienzahlen berechnet und mit dem Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich zwischen den Gruppen und den Wilcoxon-Test für Unterschiede innerhalb der Gruppen berechnet und $p < 0,05$ für beide Tests als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse: Bei gesunden Pferden (Gruppe 1) konnte im Vergleich zu den antibiotisch therapierten Pferden (Gruppe 3) keine signifikante Verminderung der Eubakterien festgestellt werden; lediglich am Tag 3 war eine nicht signifikante Reduktion ($p = 0,182$) der Eubakterienzahl sowie der grampositiven *Bifidobacterium spp.* ($p = 0,1202$) feststellbar, die sich am Tag 5 wieder dem Ausgangswert näherten. Die Fütterung des Präbiotikums beeinflusste die Eubakterienzahl nur unwesentlich (Gruppe 2). Bei den Pferden der Gruppe 1 konnte ein nahezu konstanter Zahl von $10^8 - 10^9$ Bakterien/ml für Eubakterien ermittelt werden. Ein stimulierender Effekt der präbiotischen Substanz konnte ebenfalls bei *Bifidobacterium spp.* nicht festgestellt werden ($< 1,5 \times 10^8$ Bakterien/ml in Fäzes adulter Pferde). Die Klasse der *Cytophaga-Flavobacteria* erwies sich als sehr konstant in allen Gruppen. Allerdings lagen die Bakterienzahlen für die Vertreter dieser Klasse bei den erkrankten Pferden tendenziell höher als bei den gesunden Pferden. Speziell bei an akuter Colitis erkrankten Pferden, konnten vermehrt, jedoch nicht signifikant ($p = 0,4738$), Bakterien der *Cytophaga-Flavobacteria*-Klasse erfasst werden.

Schlussfolgerungen: Bei keinem Pferd der Gruppen 3 und 4 konnte eine durchfallähnliche Kotveränderung durch die applizierten Antibiotika beobachtet werden. Amoxicillin und Gentamicin können daher bezüglich des Auslösens einer AAD beim Pferd als sichere Antibiotika angesehen werden. Die Applikation des Präbiotikums zeigte einen geringen, messbaren Einfluss auf die sondierte, fäkale Mikrobiota. Allerdings konnte das applizierte Präbiotikum bei Pferden mit veränderter Kotkonsistenz innerhalb von 24 Stunden eine physiologische Konsistenz herbeiführen, was auf die gute Wasserabsorptions- und Pufferkapazität der Huminsäuren zurück zu führen sein könnte.

6. Summary

Nicole Graneß

Analysis of the faecal microbiome in horses in association with antibiotic and prebiotic treatment

Large Animal Clinic for Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig
Submitted in March 2018

78 pages, 1 publication, 6 figures, 502 references, 2 appendices

Keywords: horse, colitis, antibiotic-associated diarrhea, microbiota, prebiotic

Introduction: The use of antibiotics can lead to antibiotic-associated diarrhea (AAD). The reasons for this are yet not exactly known, indeed, it is assumed that the intestinal bacterial microbiota have to be massively changed by the antibacterial therapy.

Objectives: Therefore, the objective of the present clinical study was to investigate the causes of AAD and to assess whether prebiotic supplementation can be considered as therapeutic option for the treatment of intestinal inflammation and diarrhea in horses. Using selected oligonucleotide probes of specific enteral bacteria, the faecal microbiota were qualitatively analysed in healthy control horses and in horses with inflammatory diseases before and after antibiotic therapy as well as application of a prebiotic supplement.

Material and Methods: The clinical study included four groups with a total of 62 horses. Groups 1 and 2 consisted of 17 and 11 healthy horses. Groups 3 and 4 included 24 and 10 equine patients of the Large Animal Clinic for Internal Medicine. The horses of the group 3 and 4 required antibiotic therapy (amoxicillin 15.0 mg/kg, i.v., 2x/day and gentamicin 6.6 mg/kg, i.v./day). In addition to the adequate hay feeding (1.5 kg/100 kg KM/day), horses of group 2 and 4 received the pelleted prebiotic supplement consisting of Jerusalem artichoke, green and rice flour as well as humic acids WH 67 in a dosage of 1.5 g/kg BW once daily over a period of seven days. The faeces (1 g per sample) were collected rectally before the onset of antibiotic treatment and prebiotic supplementation (day 0) and on subsequent three days (3, 5 and 7). The faecal sediment analyses (n = 471) were evaluated microscopically. The faecal samples were analysed by fluorescence *in situ* hybridization using three rRNA-specific oligonucleotide probes: universal EUB 338 probe for Eubacteria, CF 319a probe for *Cytophaga-Flavobacteria* class, Phylum *Bacteroidetes*, and the probe Bif 164 for detection of *Bifidobacterium spp.*. The structural evaluation was carried out microscopically by using an epifluorescence microscope to determine fluorescence-marked bacteria in the sample. Statistical evaluation using Shapiro-Wilk test did not show any normal

Summary

distribution of data sets, therefore, medians and interquartile ranges were calculated for bacterial concentrations. Groups were compared by Mann-Whitney-U-test and Wilcoxon's test was used to analyse differences within the groups. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant for both test.

Results: When comparing healthy horses (group 1) to the antibiotic treated horses (group 3), no statistically significant reduction of Eubacteria was detected; only a non-significant reduction ($p = 0.182$) of Eubacteria on day 3 was observed as well as for the gram-positive *Bifidobacterium spp.* ($p = 0.1202$), which returned to baseline level until day 5. The prebiotic supplementation influenced the Eubacteria only insignificantly (group 2). In healthy horses (group 1), almost a constant total content of $10^8 - 10^9$ bacteria/ml could be determined for Eubacteria. A stimulating effect of the prebiotic substance also was missing for *Bifidobacterium spp.* and no more than 1.5×10^8 bacteria / ml could be detected for bifidobacteria in faeces of adult horses. The class of *Cytophaga-Flavobacteria* was very consistent in all groups. However, the number of bacteria belonging to this class tended to be slightly higher in diseased horses than in healthy horses. Especially, in horses affected by acute colitis, an increased, but not significantly higher ($p = 0.4738$), number of *Cytophaga-Flavobacteria* bacteria was counted.

Conclusions: None of the horses included in groups 3 and 4 showed any diarrhoeic faecal changes due to the applied antibiotics. Antibiotic therapy with amoxicillin and gentamicin can thus be regarded as safe concerning the induction of AAD.

The application of the prebiotic showed only insignificant influence on bacterial numbers in the microscopic examination, but it was clinically observed that altered faecal texture improved within 24 hours to physiological texture, which probably was due to the good water absorption and buffering capacity of humic acids.

7 Literaturverzeichnis

- Adam KMG. In vitro observations on the ciliate protozoa inhabiting the large intestine of the horse. J Gen Microbiol. 1953;9:876-84.
- Adams JC, Gazaway JA Jr., Brailsford MA, Hartman PA, Jacobson NL. Isolation of bacteriophages from the bovine rumen. Exper. 1966;22:717.
- Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Wold AE. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? Pediatr Res. 2006;59(1):96-101.
- Alexander F, MacPherson MJD, Oxford AE. Fermentative activities of some members of the normal coccal flora of the horse large intestine. J Comp Pathol Ther. 1952;62:252-9.
- Alexander F and Davies E. Production and fermentation of lactate by bacteria in the alimentary canal of the horse and pig. J Comp Pathol. 73:1-8.
- Alexander F, Davie ME, Muir AR. Bacteriophage-like Particles in the Large Intestine of the Horse. Res Vet Sci. 1970;11:592.
- Alber G. Autofluoreszenz. In: Wiesner E und Ribbeck R, Hrsg. Lexikon der Veterinärmedizin. 4. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 1999, p. 136.
- Al Jassim RA, Scott PT, Trebbin AL, Trott D, Pollitt CC. The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. FEMS Microbiol Lett. 2005;248:75-81.
- Alm EW, Oerther B, Larsen N, Stahl DA, Raskin L. The Oligonucleotide Probe Database. Appl Environ Microbiol. 1996;62(10):3557-9.
- Amann R, Krumholz L, Stahl DA. Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. J Bacteriol. 1990;172:762-70.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. Microbiol Rev. 1995;59:143-69.
- Amann R, Fuchs BM, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. Curr Opin Biotechnol. 2001;12:231-6.

- Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6:339-48.
- Andersson AF, Lindberg M, Jakorbsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS one.* 2008;3(7):e2836.
- Ansorg R und Rochus W. Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von natürlichen und künstlichen Huminsäuren. *Arzneimittelforschung.* 1978;28:2195-8.
- Antharam VC, Li EC, Ishmael A, Sharma A, Mai V, Rand KH, Wang GP. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):2884-92.
- Antunes LC, Han J, Ferreira RB, Lolić P, Borchers CH, Finlay BB. Effect of antibiotic treatment on the intestinal metabolome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1494-1503.
- Apanavicius CJ, Powell KL, Vester BM, Karr-Lilienthal LK, Pope LL, Fastinger ND, Wallig MA, Tappenden KA, Swanson KS. Fructan supplementation and infection affect food intake, fever, and epithelial sloughing from salmonella challenge in weanling puppies. *J Nutr.* 2007;137(8):1923-30.
- Argenzio RA, Hintz HF. Effect of diet on glucose entry and oxidation rates in ponies. *J Nutr.* 1972;102:879-92.
- Argenzio RA, Southworth M, Stevens CE. Sites of organic-acid production and absorption in equine gastrointestinal-tract. *Am J Physiol.* 1974;226:1043-50.
- Argenzio RA. Function of the equine large intestine and their interrelationship in disease. *Cornell Veterinarian.* 1975;65:303-30.
- Arena MP, Capozzi V, Spano G, Fiocco D. The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101:2641-57.
- Bailey SR, Baillon ML, Rycroft AN, Harris PA, Elliott J. Identification of equine cecal bacteria producing amines in an *in vitro* model of carbohydrate overload. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:2087-93.

- Banjara N, Suhr MJ, Hallen-Adams HE. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Curr Microbiol.* 2015;70:792-800.
- Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, Flint HJ. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(4):1654-61.
- Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Pogliano J et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:10771-6.
- Barr BS, Waldridge BM, Morresey PR, Reed SM, Clark C, Belgrave R, et al. Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices. *Equine Vet J.* 2013;45:154-8.
- Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis.* 1992;15:573-81.
- Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med.* 2002;346(5):334-9.
- Bartlett JG. *Clostridium difficile*: progress and challenges. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1213:62-9.
- Baruc CJ, Dawson KA, Baker JP. 1983. The characterization and nitrogen metabolism of equine cecal bacteria. In: Proceeding 8th Equine Nutrition Physiology Symposium. 1983 April 28-30; Lexington, Kentucky, USA. p. 151-156.
- Barry KA, Hernot DC, Middelbos IS, Francis C, Dunsford B, Swanson KS, Fahey Jr GC. Low-level fructan supplementation of dogs enhances nutrient digestion and modifies stool metabolite concentrations, but does not alter fecal microbiota populations. *J Anim Sci.* 2009;87:3244-54.
- Batista A, Chaves U, de Vasconcelos C, Fishman O, da Sylva JO. Flora micoteca intestinal de equinos e asininos no recife. *Inst Micol Univ Recife.* 1961;326:116.
- Baverud V, Gustafsson A, Franklin A, Lindholm A, Gunnarsson A. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Vet J.* 1997;29:279-84.
- Baverud V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q.* 2002;24:203-19.
- Baverud V, Gustafsson A, Franklin A, Aspan A, Gunnarsson A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J.* 2003;35(5):465-71.

- Becker R. Untersuchungen zum Sorptionsverhalten von Bodenhuminsäuren gegenüber Metallionen mit der statischen und dynamischen Methode. [Dissertation rer. nat.]. Marburg: Univ. Marburg; 1987.
- Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29:625-51.
- Beloshapka AN, Wolff AK, Swanson KS. Effects of feeding polydextrose on faecal characteristics, microbiota and fermentative end products in healthy adult dogs. *Brit J Nutr.* 2012;108:638-44.
- Belzecki G, Miltko R, Michalowski T, McEwan NR. Methods for the cultivation of ciliated protozoa from the large intestine of horses. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363: fnv233.
- Bentz H. Veterinärmedizinische Pharmakologie. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag; 1982.
- Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 1996;4(11):430-5.
- Berg EL, Fu CJ, Porter JH, Kerley MS. Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: Effects on fecal pH, microbial content and volatile fatty acid concentration. *J Animal Sci.* 2005;83:1549-53.
- Bergmann W. Zur Strukturaufklärung von Huminsäuren aus Abwasser. [Dissertation rer. nat.]. Tübingen: Univ. Tübingen; 1978.
- Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.* 1990;70:567-90.
- Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L et al. Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS one.* 2010;5:e10667.
- Biddle AS, Black SJ, Blanchard JL. An *In Vitro* Model of the Horse Gut Microbiome Enables Identification of Lactate-Utilizing Bacteria That Differentially Respond to Starch Induction. *PLoS one.* 2013;8(10):e77599.
- Birch L, Dawson CE, Cornett JH, Keer JT. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. *Lett Appl Microbiol.* 2001;33:296-301.

- Birchenough GMH, Johannson MEV, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC. New Developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology*. 2015;8(4):712-19.
- Blackmore TM, Dugdale A, Argo CM, Curtis G, Pinloche E, et al. Strong Stability and Host Specific Bacterial Community in Faeces of Ponies. *PLoS one*. 2013;8(9):e75079.
- Blasco L, Ferrer S, Pardo I. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;225:115-23.
- Bodes-Fischer H. Zum Sorptionsverhalten von Huminstoffen gegenüber Metallionen. [Dissertation rer. nat.] Marburg: Univ. Marburg; 1985.
- Boirivant M, Pica R, De Maria R, Testi R, Pallone F, Strober W. Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *J Clin Invest*. 1996;98:2616-22.
- Bonhomme A. Attachment of horse cecal bacteria to forage cell walls. *J Vet Sci*. 1986;48:313-22.
- Bossi L, Fuentes JA, Mora G, Figueroa-Bossi N. Prophagecon-tribution to bacterial population dynamics. *J Bacteriol*. 2003;185:6467-71.
- Boye M, Aalbaek B, Agerholm JS. *Fusobacterium necrophorum* determined as abortifacient in sheep by laser capture microdissection and fluorescence *in situ* hybridization. *Mol Cell Probes*. 2006;20:330-6.
- Brandt LJ and Aroniadis OC. An overview of fecal microbiota transplantation: techniques, indications, and outcomes. *Gastrointest Endosc*. 2013;78(2):240-9.
- Braun V, Pilsel H, Gross P Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Arch Microbiol*. 1994;161:199-206.
- Braunstein J, Qiao L, Autschbach F, Schurmann G, Meuer S. T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10. *Gut*. 1997;41:215-20.
- Breng R. Nachweis und Isolierung von Proteinen aus Torfextrakten – ein Beitrag zum Studium der Wechselwirkung zwischen Proteinen und Huminsäuren. [Dissertation rer. nat.]. Jena: Friedrich-Schiller Universität Jena; 1977.

- Breng R, Waldow R, Plötner G. Hemmung der Prostaglandinsynthese durch wasserlösliche Huminstoffe in vitro. In: Plötner G, Weber U, Hrsg. Torf in der Medizin. Bad Elster: Symposium der Kommission VI der IMTG; 1981. p. 97-104.
- Broad J und Sanger GJ. The antibiotic azithromycin is a motilin receptor agonist in human stomach: comparison with erythromycin. *Br J Pharmacol.* 2013;168(8):1859-67.
- Brown MRW and Williams P. The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Annu Rev Microbiol.* 1985;39:527-56.
- Brown TA. Die Polymerasekettenreaktion (PCR). In: Brown TA, Hrsg. *Gentechnologie für Einsteiger.* 3. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2002. p. 199-214.
- Brown SP, Chat LL, de Paepe M, Taddei F. Ecology of microbial invasions: amplification allows virus carriers to invade more rapidly when rare. *Current Biology.* 2006;16:2048-52.
- Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol.* 2013;14:660-7.
- Browning GF, Chalmers RM, Snodgrass DR et al. The prevalence of enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland. *Equine Vet J.* 1991;23:405-9.
- Brummer Y, Kaviani M, Tosh SM. Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. *Food Res Int.* 2015;67:117-25.
- Brüssow H, Chanchaya C, Hardt W-D. Phages and the evolution of bacterial pathogens, from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:560-602.
- Brüssow H. Phage therapy for the treatment of human intestinal bacterial infections. Soon to be a reality? *Expert Rev Gastroent Hepatol.* 2017;11(9):785-788.
- Büsing K, Harmeyer J, Markuske KD, Zeyner A. Microscopic evidence for the uptake of orally given humic acids by the intestinal mucosa in piglets. *Animal Prod Sci.* 2011;51:967-73.
- Büsing K, Elhensheri M, Entzian K, Meyer U, Zeyner A. Microscopic examination of the intestinal wall and selected organs of minipigs orally supplemented with humic acids. *Res Vet Sci.* 2014;96:308-10.

- Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A et al. (2014): Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature*. 2014;51:205-8.
- Bugaut M and Bentèjac M. Biological effects of short-chain fatty acids in nonruminant mammals. *Annu Rev Nutr*. 1993;13:217-41.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2009. Deutsche Antibiotika-Resistenzsituation in der Lebensmittelkette - DARLink 2009; Schroeter A und Käsbohrer A, Hrsg. vom Mai 2012 (zitiert vom 31.12.2017): 25-118, <<http://www.bfr.bund.de/cm/350/deutsche-antibiotika-resistenzsituation-in-der-lebensmittelkette-darlink-2009.pdf>>.
- Bullerdiek J. Moderne Methoden in der Genomforschung und Humangenetik. *Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 2006;49:989-94.
- Butine TJ und Leedle JAZ. Enumeration of Selected Anaerobic Bacterial Groups in Caecal and Colonic Contents of Growing Finishing Pigs. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55: 1112-1116.
- Cabre E, Gassull MA. Complications of enteral feeding. *Nutr*. 1993;9:1-9.
- Camp JG, Kanther M, Semova I, Rawls JF. Patterns and scales in gastrointestinal microbial ecology. *Gastroenterology*. 2009;136:1989-2002.
- Campbell JM, Fahey gCJr, Wolf BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr*. 1997;127:130-6.
- Cani PD, Delzenne NM. The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. *Curr Pharm Des*. 2009;15(13):1546-58.
- Cann AJ, Fandrich SE, Heaphy S. Analysis of the virus population present in equine faeces indicates the presence of hundreds of uncharacterized virus genomes. *Virus Genes*. 2005;30(2):151-6.
- Canani RB and Terrin G. Gastric acidity inhibitors and the risk of intestinal infections *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26:31-5.
- Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 2011;17:1519-28.

- Canani RB, Di Costanzo M, Leone L. The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. *Clin Epigenet.* 2012;4:4.
- Chang JY, Antonopoulos DA, Kalra A, Tonelli A, Khalife WT, Schmidt TM, et al. Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Infect Dis.* 2008;197(3):435-8.
- Che TM, Johnson RW, Kelley KW, Van Alstine WG, Dawson KA, Moran CA, Pettigrew JE. Mannan oligosaccharide improves immune responses and growth efficiency of nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Anim Sci.* 2011;89:2592-602.
- Choukevitch J. Etude de la flore bacterienne du gros intestin du cheval. *Ann Inst Pasteur.* 1911;25:247-6.
- Cintas LM, Herranz C, Hernández PE. Natural and Heterologous Production of Bacteriocins. In: Drider D, Rebuffat S, Hrsg. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides.* 1. Aufl. New York, NY: Springer; 2011. pp. 115-143.
- Cochetière MF, Durand T, Lalande V, Petit JC, Potel G, Beaugerie L. Effect of antibiotic therapy on human fecal microbiota and the relation to the development of *Clostridium difficile*. *Microb Ecol.* 2008;56:395-402.
- Coenen M, Mößeler A, Vervuert I. Fermentative gases in breath indicate the Inulin and starch start to be degraded by microbial fermentation in the stomach and small intestine of the horse in contrast to Pectin and Cellulose. *J Nutr.* 2006;136:2108S-2110S.
- Cohen R, Roth FJ, Delgado E, Ahearn DG, Kalser MH. Fungal flora of the normal human small and large intestine. *N Engl J Med.* 1969;280:638-41.
- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP et al. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Disease Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31(5):431-44.
- Costa MC, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Staempfli HR, Kim PT, Sturgeon A, et al. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS one.* 2012;7:e41484.

- Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P, Weese JS. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Vet J.* 2015a;205:74-80.
- Costa MC, Stämpfli HR, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Gomes RG, Weese JS. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. *BMC Vet Res.* 2015b;11:19.
- Costa MC, Stampfli HR, Allen-Vercoe E, Weese JS. Development of the faecal microbiota in foals. *Equine Vet J.* 2016;48:681-8.
- Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The role of bacterial surface structures in pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 1981;8:303-38.
- Costerton JW, Lewandowski Z. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.
- Courth LF, Ostaff MJ, Mailänder-Sánchez D, Malek NP, Stange EF, Wehkamp J (2015): Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:14000-5.
- Coverdale JA. Horse Species Symposium: Can the microbiome of the horse be altered to improve digestion? *J Animal Sci.* 2016;94:2275-81.
- Cummings JH, Englyst HN. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr.* 1987;45(5 Suppl):1243-55.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* 1987;28(10):1221-7.
- Daly K, Stewart CS, Flint HJ, Shirazi-Beechey SP. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 2001;38:141-51.
- Damke C, Snyder A, Uhlig A, Coenen M, Schusser GF. Impact of diet on 24-hour intragastric pH profile in healthy horses. *Berl Münch Tierärztl Wschr.* 2015; 128(9-10):345-9.
- Davies E. Cellulolytic bacteria isolated from the large intestine of the horse. *J Appl Bacteriol.* 1964;27:373-8.

- Deere D, Porter J, Pickup RW, Edwards C. Survival of cells and DNA of *Aeromonas salmonicida* released into aquatic microcosms. J Appl Bacteriol. 1996;81:309-18.
- De Fombelle A, Varloud M, Goachet A-G, Jacotot E, Philippeau C, Drogoul C, Julliand V. Characterisation of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses fed two distinct diets. Anim Sci. 2003;77:293-304.
- Delcour JA, Aman P, Courtin CM, Hamaker BR, Verbeke K. Prebiotics, fermentable dietary fiber, and health claims. Adv Nutr. 2016;7:1-4.
- DeLong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science. 1989;243:1360-3.
- De Paepe M, Leclerc M, Tinsley CR, Petit M-A. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health. Front Cell Infect Microbiol. 2014;4:39.
- DePeters EJ and George LW. Rumen transfaunation. Immunol Lett. 2014;162:69-76.
- Deppenmeier U. The unique biochemistry of methanogenesis. Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol. 2002;71:223-83.
- Desnos-Olliveir M, Ragon M, Robert V, Raoux D, Gantier JC, Dromer F. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). J Clin Microbiol. 2008;46:3237-42.
- Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(1):4554-61.
- De Weirtdt R, Van de Wiele T (2015): Micromanagement in the gut: microenvironmental factors govern colon mucosal biofilm structure and functionality. NPJ Biofilms Microbiomes. 2015;1:15026.
- D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. C R Acad Sci Paris. 1917;165:373-5.
- Diab SS, Songer G, Uzal FA. Clostridium difficile infection in horses: A review. Vet Microbiol. 2013;167:42-49.

- Donaldson MT, Palmer JE. Prevalence of *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A in feces of horses with diarrhea and colic. J Am Vet Med Assoc. 1999;215:358-61.
- Donlan RM und Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002;15:167-93.
- Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. Cell Metab. 2011;13:515-26.
- Dougal K, Harris PA, Edwards A, Pachebat JA, Blackmore TM, Worgan HJ, Newbold CJ. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. FEMS Microbiol Ecol. 2012;82:642-52.
- Dougal K, De la Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Newbold CJ. Identification of a core bacterial community within the large intestine of the horse. PLoS one. 2013;8:e77660.
- Dougal K, La Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Geor RJ, Nielsen BD, Schott HC 2nd, Elzinga S, Newbold CJ. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. PLoS one. 2014;9:e87424.
- Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Cultivable bacterial diversity from the human colon. Appl Microbiol. 2007;44(4):343-50.
- Dupont A, Heinbockel L, Brandenburg K, Hornef MW. Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal mucosa. Gut Microbes. 2014;5(6):761-65.
- Durbán A, Abellán JJ, Jiménez-Hernández N, Ponce M, Ponce J, Sala T, D'Auria G, Latorre A, Moya A. Assessing gut microbial diversity from feces and rectal mucosa. Microb Ecol. 2011;61:123-33.
- Dyar HO and Keith SC. Notes on normal intestinal bacilli of the horse and of certain other domesticated animals. Technol Q. 1894;256(16):838.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science. 2005;308(5728):1635-8.

- Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005;21(2):147-51.
- Eisener W. Untersuchungen zur Genese und Strukturaufklärung von Huminsäuren. [Dissertation rer. nat.] Tübingen: Univ. Tübingen; 1983.
- Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LMT. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* diversity in horse feces, revealed by PCR-DGGE. *Current microbiology.* 2009;59:651-5.
- Fan Tshung-Chu, Pan Chen, Lian Nancu, Chan Siaona. Untersuchungen zur antiphlogistischen Wirkung von Huminsäuren. Informationsschrift, Med. Inst. Guangdong; 1981.
- Faubladier C, Julliard V, Veiga L, Chaucheyras-Durand F. Comparison of colon and faeces microbial diversities in horses using molecular techniques. In Proceedings of the 5th Joint INRA-RRI Gastrointestinal Tract Microbiology Symposium. 2006 June, Aberdeen, Scotland.
- Feary DJ, Hassel DM. Enteritis and Colitis in Horses. *Vet Clin Equine.* 2006;22:437-79.
- Fernandes KA, Kittelmann S, Rogers CW, Gee EK, Bolwell CF, et al. Faecal Microbiota of Forage-Fed Horses in New Zealand and the Population Dynamics of Microbial Communities following Dietary Change. *PLoS one.* 2014;9(11):e112846.
- Frey JC, Pell AN, Berthiaume R, Lapierre H, Lee S, Ha JK, Mendell JE, Angert ER. Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. *J Appl Microbiol.* 2010;108:1982-93.
- Flemming HC. Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen. *Stuttgarter Berichte zu Siedlungswasserwirtschaft* 129, München: Oldenburg Verlag; 1994.
- Flemming HC. Struktur und Eigenschaften von Biofilmen. 17. DECHEMA Jahrestagung; 1999 April 27-29; Wiesbaden, Germany. Conference Proceedings Bd. I; p. 360-363.
- Flickinger EA, Van Loo J, Fahey Jr. GC. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. *Crit Rev Food Sci.* 2003;43:19-60.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO/WHO). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London

- Ontario, Canada; May 2002; (zitiert vom 31.12.2017):
http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Francis MB, Allen CA, Sorg JA. Muricholic acids inhibit *Clostridium difficile* spore germination and growth. PloS One. 2013;8:e73653.
- Frape D. Equine nutrition and feeding. 4. Aufl. West Sussex, United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2010.
- Gaci N, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugère J-F. Archaea and the human gut: New beginning of an old story. World J Gastroenterol. 2014;20(43):16062-16078.
- Gänzle MG, Hölzel A, Walter J, Jung G, Hammes WP. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. Appl Environ Microbiol. 2000;66(10):4325-33.
- Gao Z, McClane BA. Use of *Clostridium perfringens* Enterotoxin and the Enterotoxin Receptor-Binding Domain (C-CPE) for Cancer Treatment: Opportunities and Challenges. J Toxicol. 2012;2012:981626.
- Gao Zhijian and McClane Bruce A.: Use of *Clostridium perfringens* Enterotoxin and the Enterotoxin Receptor-Binding Domain (C-CPE) for Cancer Treatment: Opportunities and Challenges. J Toxicol. 2012; Article ID 981626, 9 pages.
- Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. J Immunol. 2001;167:1882-5.
- Gey AC. Einsatz der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur Identifizierung ausgewählter veterinärpathogener Erreger. [Dissertation med. vet.] München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2010.
- Ghosh S und Mehla RK. Influence of dietary supplementation of prebiotics (mannanligosaccharide) on the performance of crossbred calves. Trop. Anim Health Prod. 2012;44:617-22.
- Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutr Res Rev. 2004;17:259-75.

- Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(8):491-502.
- Gilbert P et al. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*. 1997;11:160-7.
- Gill CIR und Rowland IR. Diet and cancer: assessing the risk. *Brit J Nutr*. 2002;88(Suppl.1):S73-S87.
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312:1355-9.
- Glatter M, Wiedner K, Hirche F, Mielenz N, Hillegeist D, Bochnia M, Cehak A, Bachmann M, Greef JM, Glaser B, Wolf P, Breves G, Zeyner A. Fermentation Characteristics along the Gastrointestinal Tract after Feeding of Jerusalem Artichoke Meal to Adult Healthy Warmblood Horses. *J Anim Res Nutr*. 2016;1:16.
- Golbs S. Experimentelle Untersuchungen zur pharmakologischen Wirksamkeit und zur Pharmakodynamik von Huminsäuren unter besonderer Berücksichtigung koergistischer Effekte und ihrer therapeutischen sowie prophylaktischen Wirkung bei Schweinen. [Dissertation med. vet.] Leipzig: Universität Leipzig; 1983.
- Gouba N, Raoult D, Drancourt M. Plant and fungal diversity in gut microbiota as revealed by molecular and culture investigations. *PLoS one*. 2013;8:e59474.
- Grønvold AM R, L'Abée L, Trine M, Strand E, Sørum H, Yannarell AC, Mackie RI. Fecal microbiota of horses in the clinical setting: potential effects of penicillin and general anesthesia. *Vet Microbiol*. 2010;145:366-72.
- Grubb JA und Dehority BA. Variation in colony counts of total viable anaerobic rumen bacteria as influenced by media and cultural methods. *Appl Environ Microbiol*. 1976;31(2):262-7.
- Gruby D und Delafond O. Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *Compt Rend Acad Sci*. 1843;17:1304-8.

- Gohari IM, Arroyo L, MacInnes JL, Timoney JF, Parreira VR, Prescott JF. Characterization of *Clostridium perfringens* in the feces of adult horses and foals with acute enterocolitis. *Canadian J Vet Res.* 2014;78(1):1-7.
- Golomidova A, Kulikov E, Isaeva A, Manykin A, Letarov A. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5975-81.
- Gorski A, Dabrowska K, Switala-Jeleń K, Nowaczyk M, Weber-Dabrowska B, Boratynski J et al. New insights into the possible role of bacteriophages in host defense and disease. *Med Immunol.* 2003;2:2.
- Gottlieb K, Iber FL, Livak A, Leya J, Mobarhan S. Oral *Candida* colonizes the stomach and gastrostomy feeding tubes. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1994;18:264-267.
- Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2011;53:994-1002.
- Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 1996;60:539-74.
- Grehan MJ, Borody TJ, Leis SM et al. Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44:551-61.
- Guo B, Harstall C, Louie T et al. Systematic review: Faecal transplantation for the treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;35:865-75.
- Gustafsson A, Baverud V, Gunnarsson M, Rantzien MH, Lindholm A, Franklin A. The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden. *Equine Vet J.* 1997;29:314-18.
- Gustafsson A, Baverud V, Franklin A, Gunnarsson A, Ogren G, Ingvast Larsson C. Repeated administration of trimethoprim/sulfadiazine in the horse - pharmacokinetics, plasma protein binding and influence on the intestinalmicroflora. *J Vet Pharmacol Ther.* 1999;22:20-6.
- Gustafsson A. Antibiotic Associated Diarrhea in Horses. With special reference to *Clostridium difficile*. [Doctoral Thesis] Department of Large Animal Clinical Sciences, Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences; 2004.

- Günther J, Van der Waaij D. Kolonisationsresistenz des Verdauungstraktes - Bedeutung und Schlußfolgerungen für die Prophylaxe von Hospitalinfektionen. *Z ges Hyg.* 1984;30:14.
- Halas V, Nocht I. Mannan oligosaccharides in nursery pig nutrition and their potential mode of action. *Animals.* 2012;23:261-74.
- Hallen-Adams HE, Kachman SD, Kim J, Legge RM, Martínez I. Fungi inhabiting the healthy human gastrointestinal tract: a diverse and dynamic community. *Fungal Ecol.* 2015;15:9-17.
- Hallen-Adams HE, Suhr MJ. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence.* 2017;8(3):352-8.
- Hamilton MJ, Weingarden AR, Sadowsky MJ, Khoruts A. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol.* 2012;107:761-7.
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer R-J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27:104-19.
- Hansen NCK, Avershina E, Mydland LT, Næsset JA, Austbø D, Moen B, Måge I, Rudi K. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26:10.3402/mehd.v26.27216.
- Hansson GC, Johansson ME. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes.* 2010;1(1):51-4.
- Hapfelmeier S, Lawson MAE, Slack E, Kirundi JK, Stoel M, Heikenwalder M, Cahenzli J, Velykoredko Y, Balmer ML, Endt K, Geuking MB, Curtiss R 3rd, McCoy KD, Macpherson AJ. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science.* 2010;328(5986):1705-9.
- Harlow BE, Lawrence LM, Flythe MD. Diarrhea-associated pathogens, lactobacilli and cellulolytic bacteria in equine feces: responses to antibiotic challenge. *Vet Microbiol.* 2013;166:225-32.
- Harlow BE, Donley TM, Lawrence LM, Flythe MD. Effect of starch source (corn, oats or wheat) and concentration on fermentation by equine faecal microbiota in vitro. *J Appl Microbiol.* 2015;119(5):1234-44.

- Harlow BE, Lawrence LM, Hayes SH, Crum A, Flythe MD. Effect of Dietary Starch Source and Concentration on Equine Fecal Microbiota. PLoS one. 2016;11(4):e0154037.
- Hasegawa M, Kamada N, Jiao Y, Liu MZ, Núñez G, Inohara N. Protective role of commensals against *Clostridium difficile* infection via an IL-1b-mediated positive-feedback loop. J Immunol; 2012;189:3085-91.
- Hastie PM, Mitchell K, Murray J-A MD. Semiquantitative analysis of *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* and *Streptococcus bovis* in the equine large intestine using real-time polymerase chain reaction. Br J Nutr. 2008;100:561-8.
- Heimesaat, MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, Niebergall J, Jahn HK, Dunay IR, Moter A, Gescher DM, Schumann RR, Gobel UB, Liesenfeld O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 2006;177(12):8785-95.
- Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Molbak K. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella typhimurium*. Emerg Infect Dis. 2002;8(5):490-5.
- Hellyer TJ, DesJardin LE, Hehman GL, Cave MD, Eisenach KD. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1999;37:290-5.
- Hepburn RJ. Investigation into the Presence of Helicobacter in the Equine Stomach by Urease Testing and Polymerase Chain Reaction and Further Investigation into the Application of the 13C-Urea Blood Test to the Horse. [Master of Science Veterinary Medical Science] Leesburg, Virginia, USA: Virginia Polytechnic Institute and State University; 2004.
- Herholz C, Miserez R, Nicolet J, Popoff M, Gibert M, Gerber H, Straub R. Prevalence of b2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. J Clin Microbiol. 1999;37:358-61.
- Hespell RB, Akin DE, Dehority BA. Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. In: Mackie RI, White BA, Isaacson RE, ed. Gastrointestinal Microbiology: Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations. New York: Chapman & Hall; 1997. p. 59-141.
- Hoff C, Mikosch T, Schulte A, Seranski P. Hybridisierungen. In: Jansohn M, (Hrsg.). Gentechnische Methoden. 4. Aufl. Heidelberg: Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag; 2007. p. 251-260.

- Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and function. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14(1):2584-98.
- Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*. 2001;292:1115-18.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:283-307.
- Holscher HD, Caporaso JG, Hooda S, Brulc JN, Fahey Jr. GC, Swanson KS, Fiber supplementation influences phylogenetic structure and functional capacity of the human intestinal microbiome: follow-up of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2015;101:55-64.
- Hoogenraad NJ, Hird FJR, Holmes I, Millis NF. Bacteriophages in Rumen Contents of Sheep. *J Gen Virol*. 1967;1:575-6.
- Hoogkamp-Korstanje JA, Lindner JG, Marcelis JH, den Daas-Slagt H, de Vos NM. Composition and ecology of the human intestinal flora. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1979;45(1):35-40.
- Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*. 2001;48(2):198-205.
- Hopkins MJ, MacFarlane GT. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol*. 2002;52:448-54.
- Högenauer C, Hammer HF, Krejs GJ, Reisinger EC. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*. 1998;27:702-10.
- Howard MD, Kerley MS, Sundvold GD, Reinhart GA. Source of dietary fiber fed to dogs affects nitrogen and energy metabolism and intestinal microflora populations. 2000. *Nutr Res*;20:1473-84.
- Hsiung Ta-Shih. A monograph on the protozoa of the large intestine of the horse. *Retrospective Theses and Dissertations*. 1930;14768.
- Huang JY, Lee SM, Mazmanian SK. The human commensal *Bacteroides fragilis* binds intestinal mucin Anaerobe. 2011;17:137-41.

- Hungate RE. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev.* 1950;14:1-46.
- Hungate RE. The rumen and its microbes. New York: Academic Press; 1966. p. 533.
- Ilgü H, Jeckelmann JM, Gapsys V, Ucurum Z, de Groot BL, Fotiadis D. Insights into the molecular basis for substrate binding and specificity of the wild-type L-arginine/agmatine antiporter AdiC. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113:10358-63.
- Ivec M, Botić T, Koren S, Jakobsen M, Weingartl H, Cencic A. Interactions of macrophages with probiotic bacteria lead to increased antiviral response against vesicular stomatitis virus. *Antivir Res.* 2007;75:266-74.
- Janczyk P, Pieper R, Souffrant WB, Bimczok D, Rothkötter H-J, Smidt H. Parenteral long-acting amoxicillin reduces intestinal bacterial community diversity in piglets even 5 weeks after the administration. *ISME J.* 2007;1:180-3.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie.* 5. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
- Jensen BB. Methanogenesis in monogastric animals. *Environ Monit Assess.* 1996;42:99-112.
- Joblin KN, Campbell GP, Richardson AJ, Stewart CS. Fermentation of barley straw by anaerobic rumen bacteria and fungi in axenic culture and in co-culture with methanogens. *Appl Microbiol.* 1989;9(5):195-7.
- Joblin KN. Ruminant acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Aust J Agric Res.* 1999;50:1307-13.
- Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(39):15064-9.
- Johansson MEV, Larsson JMH, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:4659-65.
- Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system, in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10:352-61.

- John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969;223:582-7.
- Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CG, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(36):13580-5.
- Josephson KL, Gerba, CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59:3513-5.
- Jou N-T, Yoshimori RB, Mason GR, Louie JS, Liebling, MR. Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1161-5.
- Juge N. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol*. 2012;20:30-9.
- Julliand V, de Vaux A, Villard L, Richard Y. Preliminary studies on the bacterial flora of the faeces taken from foals, from birth to twelve weeks. Effect of the oral administration of a commercial colostrum replacer. *Pferdeheilkunde*. 1996;12:209-12.
- Julliand V, De Vaux A, Millet L, Fonty G. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:3738-41.
- Julliand V und Zeyner A. The pros and cons of probiotics. In: Robinson NE, Sprayberry KA, Hrsg. *Current Therapy in Equine Medicine*, 6. Aufl. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier; 2009. p. 83-6.
- Julliand V und Grimm P. Horse Species Symposium: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. *J Anim Sci*. 2016;94(6):2262-74.
- Kaneene JB, Miller R, Ross WA, Gallagher K, Marteniuk J, Rook J. Risk factors for colic in the Michigan (USA) equine population. *Prev Vet Med*. 1997;30:23-36.
- Karahan AG, Cakmakei ML, Cicioglu-Aridogan B, Kart-Gündogdu A. Nitric oxide (NO) and lactic acid bacteria-contributions to health food quality, and safety. *Food Rev Int*. 2005;21:313-29.
- Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2000;38:830-8.

- Kenworthy R and Crabb WE. The intestinal flora of young pigs, with reference to early weaning, *Escherichia coli* and scours. J Comp Path. 1963;73:215-28.
- Kerby GP, Gowdy RA. Purification pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of *Escherichia coli*. J Immunol. 1949;63(1):93-107.
- Kern DL, Slyter LL, Weaver JM, Leffel EC, Samuelsons G. Pony Cecum vs. Steer Rumen: The Effect of Oats and Hay on the Microbial Ecosystem. J Anim Sci. 1973;37(2):463-9.
- Kern DL, Slyter LL, Leffel EC, Weaver JM, Oltjen RR. Ponies vs. Steers: Microbial and Chemical Characteristics of Intestinal Ingesta. J Anim Sci. 1974;38(3):559-64.
- Khanna S, Pardi DS. Community-acquired *Clostridium difficile* infection: an emerging entity Clin. Infect Dis. 2012;55:1741-2.
- Khatib R, Riederer KM, Ramanathan J, Baran J Jr. Fecal fungal flora in healthy volunteers and inpatients. Mycoses. 2001;44:151-6.
- Kim MS, Park EJ, Roh SW, Bae JW. Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human feces. Appl Environ Microbiol. 2011;77:8062-70.
- Kircher M und Kelso J. High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations. BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. 2010;32:524-36.
- Klein Gebbink GAR, Sutton AL, Williams BA, Patterson JA, Richert BT, Kelly DT, Verstegen MWA. Effects of oligosaccharides in weanling pig diets on performance, microflora and intestinal health. In Digestive Physiology of Pigs Proceedings of the 8th symposium, pp. 269-71 [Lindberg JE and Ogle B, Editors]. Uppsala, Sweden. CABI Publishing.
- Klitgaard K, Boye K, Capión N, Jensen TK. Evidence of multiple *Treponema* phylotypes involved in bovine digital dermatitis as shown by 16S rRNA gene analysis and fluorescence *in situ* hybridization. J Clin Microbiol. 2008;46:30123020.
- Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Cell. 2016;165:1332-45.

- Kroker R. Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen. In: Löscher W., Ungemach FR, Kroker R, Hrsg. Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren 8. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2010. p. 249-297.
- Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, Kwon YM, Hanson JM, Neish AS. The bacterial fermentation product butyrate influences epithelial signaling via reactive oxygen species-mediated changes in cullin-1 neddylation. *J Immunol.* 2009;182(1):538-46.
- Kühnert M. Untersuchungen über chemische Eigenschaften sowie chemisch - toxikologische Wirkungen von Huminsäuren mit der Zielstellung ihrer Anwendung in der Medizin / speziell Veterinärmedizin. [Dissertation med. vet.] Leipzig: Univ. Leipzig; 1979.
- Kühnert M, Fuchs V, Golbs S. Chemische Charakterisierung und besondere pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften von Huminsäuren. *Arch exp Vet med.* 1982;36:169-77.
- Kühnert M, Fuchs V, Golbs S. Pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften von Huminsäuren und ihre Wirkungsprofile für eine veterinärmedizinische Therapie. *Dtsch tierärztl Wschr.* 1989;96:3-10.
- Kühnert M, Lange N, Gottschalk J, Dedek W, Seffner W, Haase A, Höke A. Untersuchungen zum Durchtritts- und Resorptionsverhalten von ¹⁴C-markiertem HS 1500 aus dem Magen-Darm-Kanal der Laboratoriumsratte. Untersuchungsbericht, Universität Leipzig und Sopar Pharma GmbH Mannheim (unveröffentlicht); 1994.
- Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ et al. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium spp.* with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:3069-75.
- Lange N, Kühnert M, Haase A, Höke H, Seubert B. Untersuchungen zum Resorptionsverhalten eines niedermolekularen synthetischen Huminstoffes nach einmaliger oraler Applikation an der Ratte. *Dtsch tierärztl Wschr.* 1996;103:134-5.
- Larsen J. Acute colitis in adult horses. A review with emphasis on aetiology and pathogenesis. *Vet Quart.* 1997;19(2):72-80.
- Letarov A und Kulikov E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *J Appl Microbiol.* 2009;107(1):1-13.

- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124:837-48.
- Liebetanz E. Die parasitischen Protozoen des Wiederkäuermagens. *Archiv für Protistenkunde*. 1910;32:111-70.
- Liggenstoffer AS, Youssef NH, Couger MB, Elshahed MS. Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum *Neocallimastigomycota*) in ruminant and non-ruminant herbivores. *ISME J*. 2010;4:1225-35.
- Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ Microbiol*. 2010;12(2):304-14.
- Loy A, Maixner F, Wagner M, Horn M. ProbeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:D800-D804.
- Liu P, Piao XS, Kim SW, Wang L, Shen YB, Shen YB, Lee HS, Li SY. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. *J Anim Sci*. 2008;86:2609-18.
- Löhmannsröben HG, Skrivanek T, Zimmermann U. Fluoreszenz- und absorptionsspektroskopische Untersuchung der Struktur-/Wechselwirkungseigenschaften von Huminstoffen und organischen Substanzen. Dt. Gesellschaft für Moor- und Torfkunde e.V., Arbeitstagung über Torfhuminstoffe; 1999 Okt 7-8; Bad Elster, Germany.
- Ludwig W und Schleifer KH. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev*. 1994;15:155-173.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann Sm Jost R, König A, Liss T, Lüssmann Rm May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer KH. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(4):1363-71.
- Lüllmann-Rauch R. Histologie: Verstehen - lernen - nachschlagen; 10 Tabellen. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag; 2003.

- Lüllmann-Rauch R. Taschenbuch Histologie. 5. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag; 2015.
- Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijs I, Eeckhaut V, et al. A decrease of butyrate-producing species *Roseburia homilis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63:1275-83.
- Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA (1999): Probiotics inhibit enteropathogenic *E.coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol*. 1999;276:G941-G950.
- Mackie RI und Wilkins CA. Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54:2155-60.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999;69:1035-45.
- Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol*. 1992;72(1):57-64.
- Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc*. 2003;62:67-72.
- Macfarlane S, Furrie E, Cummings JH, Macfarlane GT. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Clin Infect Dis*. 2004;38: 1690-9.
- Maczulak AE, Dawson KA, Baker JP. Nitrogen utilisation in bacterial isolates from the equine caecum. *Appl Environ Microbiol*. 1985;50:1439-43.
- Masters CI, Shallcross JA, Mackey BM. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*. 1994;77:73-9.
- Mah T-FC und O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001;9:34-39.
- Mair T. Sand enteropathy. In: Mair T, Divers TJ, Ducharme NG, eds. *Manual of Equine Gastroenterology*. London: WB Saunders; 2002:437-438.

- Maira-Litran T et al. Expression of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *J Appl Microbiol.* 2000;88:243-7.
- Mansfield CS, James FE, Craven M, Davies DR, O'Hara AJ, Nicholls PK, Dogan B, MacDonough SP, Simpson KW. Remission of histiocytic ulcerative colitis in Boxer dogs correlates with eradication of invasive intramucosal *Escherichia coli*. *J Vet Intern Med.* 2009;23:964-9.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleiferl KH. Application of a suite of 16s rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiol.* 1996;142:1097-1106.
- Marco ML, Bongers RS, De Vos WM, Kleerebezem M. Spatial and temporal expression of *Lactobacillus plantarum* genes in the gastrointestinal tracts of mice. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:124-32.
- Marco ML, Peters TH, Bongers RS, Molenaar D, Van Hemert S, Sonnenburg JL, Gordon JL, Kleerebezem M. Lifestyle of *Lactobacillus plantarum* in the mouse caecum. *Environ Microbiol.* 2009;11:2747-2757.
- Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(2 Suppl):430S-436S.
- Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D. Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;58:275-85.
- Martin C, Morgavi DP, Doreau M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 2010;4(3):351-65.
- Matsuo K, Ota H, Akamatsu T, Sugiyama A, Katsuyama T. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut.* 1997;40:782-9.
- Maura D, Galtier M, Le Bouguenec C, Debarbieux L. Virulent bacteriophages can target O104:H4 enteroaggregative *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:6235-42.
- Mc Connico R. Acute equine colitis. *Compendium Eq.* 2003;25:623-31.

- McGorum BC, Dixon PM, Smith DG. Use of metronidazole in equine acute idiopathic toxaemic colitis. *Vet Rec.* 1998;142(23):635-8.
- McGorum BC und Pirie RS. Antimicrobial associated diarrhoea in the horse. Part 1: overview, pathogenesis and risk factors. *Equine Vet Educ.* 2009;21:610-16.
- McGorum BC und Pirie RS. Antimicrobial associated diarrhoea in the horse. Part 2: which antimicrobials are associated with AAD in the horse? *Equine Vet Educ.* 2010;22:43-50.
- McGowan JE Jr. Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):286-92.
- McFarland LV. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. *Future Microbiol.* 2008;3:563-78.
- Mcmanus CM, Michel KE; Simon DM; Washabau RJ. Effect of short-chain fatty acids on contraction of smooth muscle in the canine colon. *Am J Vet Res.* 2002;63(2):295-300.
- Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Vet Microbiol.* 2011;152:212-5.
- Meessen-Pinard M, Sekulovic O, Fortier LC. Evidence of in vivo prophage induction during *Clostridium difficile* infection. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:7662-70.
- Meier H, Amann R, Ludwig W et al. Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content. *Syst Appl Microbiol* 1999;22:186-96.
- Meyer JH und Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol.* 1991;70:443-59.
- Meyer H und Coenen M. *Pferdefütterung*. 5. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2014.
- Meyer-Hoffert U, Hornef MW, Henriques-Normark B, Axelsson LG, Midtvedt T, Pülsep K, Andersson M. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut.* 2008;57(6):764-71.
- Milinovich GJ, Trott DJ, Burrell PC, Croser EL, Al Jassim RA, Morton JM, van Eps AW, Pollitt CC. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environ Microbiol.* 2007;9:2090-2100.

- Milnovich GJ, Burrell PC, Pollitt CC, Klieve AV, Blackall LL, Ouwerkerk D, Woodland E, Trott DJ. Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *ISME J*. 2008;2(11):1089-100.
- Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD et al. The human gut virome, inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res*. 2011;21:1616-25.
- Miraglia N, Poncet C, Martin-Rosset W. Effect of feeding level, physiological-state and breed on the rate of passage of particulate matter through the gastrointestinal-tract of the horse. *Ann Zootech*. 1992;42:69.
- Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, Libertucci J, Wolfe M, Onischi C, Armstrong D, Marshall JK, Kassam Z, Reinisch W, Lee CH. Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterol*. 2015;149(1):102-9.
- Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. 2013;499:219-22.
- Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, Fernández L, Rodríguez JM, Jiménez E. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS one*. 2013;8(6):e66986.
- Montagne L, Pluske JR; Hampson DJ. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim Feed Sci Technol*. 2003;108:95-117.
- Moore BE und Dehority BA. Effects of diet and hindgut defaunation on diet digestibility and microbial concentrations in the cecum and colon of the horses. *J Anim Sci* 1993;71:3350-8.
- Moreau MM, Eades SC, Reinemeyer CR, Fugaro MN, Onishi JC. Illumina sequencing of the V4 hypervariable region 16S rRNA gene reveals extensive changes in bacterial communities in the cecum following carbohydrate oral infusion and development of early-stage acute laminitis in the horse. *Vet Microbiol*. 2014;168(2-4):436-41.
- Morgan LM, Coverdale JA, Froetschel MA, Yoon I. Effect of yeast culture supplementation on digestibility of varying forage quality in mature horses. *J Equine Vet Sci*. 2007;27:260-5.

- Morita H, Yoshikawa H, Sakata R, Nagata Y, Tanaka H. Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of α -arginine by *Lactobacillus fermentum*. J Bacteriol. 1997;179: 7812-15.
- Morse EV, Duncan MA, Page EA, and Fessler JF. Salmonellosis in equidae: a study of 23 cases. Cornell Vet. 1976;66:198-213.
- Morvan B, Bonnemoy F, Fonty G et al. Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. Curr Microbiol 1996;32:129-33.
- Mößler AK. Effekte verschiedener Kohlenhydrate (Cellulose, Pektin, Stärke und Inulin) auf die Wasserstoff- und Methanexhalation beim gesunden Pferd. [Dissertation med. vet.] Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2004.
- Moter A und Göbel UB. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J Microbiol Methods. 2000;41:85-112.
- Mountzouris KC, McCartney AL, Gibson GR. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. Br J Nutr. 2002;87(5):405-20.
- Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdenelli MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJ, Doré J, Blaut M. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender and country: a cross-sectional study. Appl Environ Microbiol. 2006;72(2):1027-33.
- Mullen KR, Yasuda K, Divers TJ, Weese JS. Equine faecal microbiota transplant: Current knowledge, proposed guidelines and future directions. Equine Vet Educ. 2016;30:151-60.
- Müller CE, von Rosen D, Udén P. Effect of forage conservation method on microbial flora and fermentation pattern in forage and in equine colon and faeces. Livest Sci. 2008;119:116-128.
- Murray MJ. Acute colitis. In: Robinson NE, Hrsg. Current therapy in equine medicine. 3. Aufl. Philadelphia: Saunders; 1992. p. 244-50.
- Murray JA, Longland A, Moore-Colyer M, Dunnett C. The effect of feeding a low- or high-starch diet on equine faecal parameters. Livest Sci. 2014;159:67-70.

- Ness IF, Diep DB, Ike Y. Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that contribute to Niche Control. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, Hrsg. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.
- Nousiainen J. Comparative observations on selected probiotics and olaquinox as feed additives for piglets around weaning. J Anim Physiol Anim Nutr. 1991;66:224-30.
- O'Connell Motherway M, Zorner A, Leahy SC, Reunanen J, Bottacini F, Claesson MJ et al. Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108:11217-22.
- O'Donnell M, Harris H, Jeffery I, Claesson M, Younge B, O'Toole P, Ross R. The core faecal bacterial microbiome of Irish Thoroughbred racehorses. Lett Appl Microbiol. 2013;57:492-501.
- Ogilvie LA, Bowler LD, Caplin J, Dedi C, Diston D, Check E, et al. Genome signature-based dissection of human gut metagenomes to extract subliminal viral sequences. Nat Commun. 2013;4:2420.
- Ogilvie LA und Jones BV. The human gut virome: a multifaceted majority. Front Mikrobiol. 2015;6: 918.
- Oliveira de MNV, Jewell KA, Freitas FS, Benjamin LA, Tótola MR, Borges AC, Moraes CA, Suen G. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. Vet Microbiol. 2013;164:307-14.
- O'May GA, Reynolds N, Smith AR, Kennedy A, Macfarlane GT. Effect of pH and Antibiotics on Microbial Overgrowth in the Stomachs and Duodena of Patients Undergoing Percutaneous Endoscopic Gastrostomy Feeding. J Clin Microbiol. 2005;43:3059-65.
- O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. J Immunol. 1999;163(12):6718-24.
- Orpin C. Isolation of Cellulolytic Phycomycete Fungi from the Caecum of the Horse. J Gen Microbiol. 1981;123(2):287-96.

- Ottow JCG. Die genetische und funktionelle Diversität von Böden. In: Ottow JCG, Hrsg. Mikrobiologie von Böden. 1. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2011.
- Ouellette AJ, Bevins CL. Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm Bowel Dis.* 2001;7:43-50.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002;82:279-289.
- Ouwehand AC und Vesterlund S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand AC, Hrsg. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects.* New York, NY: Marcel Dekker; 2004. p. 375-395.
- Ozeki K, Imai S, Katsuno M. On the distribution of the ciliated protozoa in the large intestine of horse. *Tohoku J Agric Res.* 1973;24(2):86-101.
- Paepe M, Leclerc M, Tinsley CR, Petit M-A. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:39.
- Palma ML, Zamith-Miranda D, Martins FS, Bozza FA, Nimrichter L, Montero-Lomeli M, Marques ET Jr, Douradinha B. Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(16):6563-70.
- Pang W, Vogensen FK, Nielsen DS, Hansen AK. Faecal and caecal microbiota profiles of mice do not cluster in the same way. *Lab Anim.* 2012;46:231-6.
- Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci.* 1969;64:600-4.
- Park HK, Shim SS, Kim SY, Park JH, Park SE, Kim HJ, Kang BC, Kim CM. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J Microbiol.* 2005;43(4):345-53.
- Park J, Floch MH. Prebiotics, probiotics and dietary fiber in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007;36:47-63.
- Park AR, Oh DK. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase. *Appl Microbiol Biot.* 2010;85(5):1279-1286.

- Paulsen JE, Oppen E, Bakke R. Biofilmmorphology in porous media, a study with microscopic and image techniques. *Wat Sci Tech.* 1997;36:1-9.
- Pearson RA und Merrit JA. Intake, digestion and gastrointestinal transit time in resting donkeys and ponies and exercised donkeys given ad libitum hay and straw diets. *Equine Vet J.* 1991;23:339-43.
- Pedicord VA, Lockhart AAK, Rangan KJ, Craig JW, Loschko J, Rogoz A, Hang HC, Mucida D. Exploiting a host-commensal interaction to promote intestinal barrier function and enteric pathogen tolerance. *Sci Immunol.* 2016;1:eaai7732.
- Peláez AML, Cataño CAS, Yepes EAQ, Villarroela RRG, De Antoni GLD, Giannuzzi L. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control.* 2012;24:177-183.
- Perez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht A, Artacho A, Eismann K et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut.* 2013;62:1591-601.
- Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JI. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe.* 2007;2:328.
- Petrof EO and Khoruts A: From Stool Transplants to Next-Generation Microbiota Therapeutics. *Gastroenterol.* 2014;146:1573-82.
- Philippeau C, Sadet-Bourgeteau S, Varloud M, Julliand V. Impact of barley form on equine total tract fibre digestibility and colonic microbiota. *Animal.* 2015;9:1943-8.
- Plumhoff MS. Bildung (Menge und Dynamik) von Fermentationsprodukten von Futtermitteln mit unterschiedlichen Gehalten an fermentierbaren Kohlenhydraten in einem *in-vitro* System mit Faeces von Pferden. [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2004.
- Pollitt CC und Van Eps AW. Equine laminitis: a new induction model based on alimentary overload with fructan. *Proceedings of the Bain Fallon Memorial Lectures, Volume 24, Equine Medication and Conditions of the Foot, Jul 2002.*
- Price CM. Fluorescence *in situ* hybridization. *Blood Rev.* 1993;7(2):127-34.

- Prosser, BL et al. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31:1502-6.
- Proudman CJ, Hunter JO, Darby AC, Escalona EE, Batty C, Turner C. Characterisation of the faecal metabolome and microbiome of Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J.* 2015;47:580-6.
- Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;217:133-9.
- Qiao L, Schurmann G, Betzler M, Meuer SC. Activation and signaling status of human lamina propria T lymphocytes. *Gastroenterol.* 1991;101:1529-36.
- Raftis EJ, Salvetti E, Torriani S, Felis GE, O'Toole PW. Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;7:954-65.
- Raynal BDE, Hardingham TE, Sheehan JK, Thornton DJ. Calcium-dependent protein interactions in MUC5B provide reversible cross-links in salivary mucus. *J Biol Chem.* 2003;278:28703-10.
- Rao K und Young VB. Fecal Microbiota Transplantation for the Management of *Clostridium difficile* Infection. *Infect Dis Clin North Am.* 2015;29(1):109-22.
- Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Eng Rev.* 2012;4:124-40.
- Respondek F, Goachet AG, Julliand V. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on the intestinal microflora of horses subjected to a sudden change in diet. *J Anim Sci.* 2008a;86:316-23.
- Respondek F, Swanson KS, Belsito KR, Vester BM, Wagner A, Istasse L, Diez M. Short-chain fructooligosaccharides influence insulin sensitivity and gene expression of fat tissue in obese dogs. *J Nutr.* 2008b;138:1712-8.
- Respondek F, Myers K, Smith TL, Wagner A, Geor RJ. Dietary supplementation with short-chain fructooligosaccharides improves insulin sensitivity in obese horses. *J Anim Sci.* 2011;89:77-83.
- Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Molecular cell* 2015;58:586-597.

- Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F et al. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*. 2010;466:334-338.
- Ridlon JM, Kang D-J, Hylernon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2005;47:241-259.
- Ridlon JM, Harris SC, Bhowmik S, Kang D-J, Hylernon PB: Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes*. 2016;7:22-39.
- Riley MA und Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:117-137.
- Riley MA, Chavan MA. Bacteriocins: Ecology und Evolution. 1. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2007.
- Riley MA. Bacteriocin-mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. In: Drider D, Rebuffat S, Hrsg. Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. 1. Aufl. New York: Springer Science+Business Media, LLC; 2011. p. 13-26.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr*. 2010;104:S1-S63.
- Robertson SL, Smedley JG III, Singh U et al. Compositional and stoichiometric analysis of *Clostridium perfringens* enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. *Cell Microbiol*. 2007;9(11):2734-55.
- Robinson JA, Smolenski WJ, Ogilvie ML, Peters JP. *In vitro* Total-Gas, CH₂, H₂, Volatile Fatty Acid and Lactate Kinetics Studies on Luminal Contents from the Small Intestine, Caecum, and Colon of the Pig. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55:2460-7.
- Roediger WE. The colonic epithelium in ulcerative colitis; An energy-deficiency disease? *Lancet*. 1980;2:712-5.
- Rohwer F und Thurber RV. Viruses manipulate the marine environment. *Nature*. 2009;459:207-12.
- Rolfe RD. Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence on the host. *Rev Infect Dis*. 1984;6(1):73-9.

- Rossen NG, Fuentes S, van der Spek MJ, Tijssen JG, Hartman JH, Duflou A, Löwenberg M, van den Brink GR, Mathus-Vliegen EM, de Vos WM, Zoetendal EG, D'Haens GR, Ponsioen CY. Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterol.* 2015;149(1):110-8.
- Roth FX, Kirchgessner M, Eidelsburger U. Zur nutritiven Wirksamkeit von Milchsäure in der Ferkelaufzucht. *Agribiol Res.* 1993;46:229-239.
- Roth FX und Etle T. Organische Säuren: Alternative zu antibiotischen Leistungsförderern In: Plitzer et al. (Eds.): Tierernährung ohne antibiotische Leistungsförderer 4. BOKU-Symposium Tierernährung, 27.10.2005, Universität für Bodenkultur Wien. S. 10-16.
- Roussel AJ, Hooper RN, Cohen ND, Bye AD, Hicks RJ, Bohl TW. Prokinetic effects of erythromycin on the ileum, cecum, and pelvic flexure of horses during the postoperative period. *Am J Vet Res.* 2000;61:420-4.
- Roussel AJ, Hooper RN, Cohen ND, Bye AD, Hicks RJ, Schulze JL. Evaluation of the effects of penicillin G potassium and potassium chloride on the motility of the large intestine in horses. *Am J Vet Res.* 2003;64:1360-3.
- Russel DW. The enzymes, regulation and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:137-174.
- Sadet-Bourgeteau S und Julliand V. Equine microbial gastro-intestinal health (Review). *EAAP Scientific Series.* 2010;128(1):161-82.
- Sadet-Bourgeteau S, Chaucheyras-Durand F, Forano E, Julliand V. Evolution of the equine gut bacterial community according to dietary changes and live yeast supplementation as assessed by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA). *Proceedings of Conference on Gastrointestinal Function, April 2011, Chicago, USA.*
- Sadet-Bourgeteau S und Julliand V. La diversité de l'écosystème microbien du tractus digestif équin. (In French.) *INRA Prod Anim.* 2012;25:407-18.
- Sadet-Bourgeteau S, Philippeau C, Dequiedt S, Julliand V. Comparison of the bacterial community structure within the equine hindgut and faeces using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). *Animal* 2014;8:1928-34.

- Sakaitani Y, Norikatsu Y, Nakajima F, Nakanishi S, Tanaka H, Tanaka R, Morotomi M. Colonization of intestinal microflora in newborn foals. *J Intest Microbiol.* 1999;13:9-14.
- Satokari R, Mattila E, Kainulainen V, Arkkila PE. Simple faecal preparation and efficacy of frozen inoculum in faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection—an observational cohort study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;41:46-53.
- Sarker SA, Gyr K. Non-immunological defence mechanisms of the gut. *Gut.* 1992;33(7):987-993.
- Schink B. Mikroorganismen im Dienste des Menschen: Biotechnologie. In: Fuchs G, Hrsg. *Allgemeine Mikrobiologie.* 8. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2007, p. 599-636.
- Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellerman K. Induction of Human- β -Defensin 2 by the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is mediated through Flagellin. *Infect Imm.* 2007;75:2399-2407.
- Schoster A, Staempfli HR, Arroyo LG, Reid-Smith RJ, Janecko N, Shewen PE, Weese JS. Longitudinal study of *Clostridium difficile* and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* in healthy horses in a community setting. *Vet Microbiol.* 2012;159(3-4):364-70.
- Schoster A, Arroyo LG, Staempfli HR, Weese JS. Comparison of microbial populations in the small intestine, large intestine and feces of healthy horses using terminal restriction fragment length polymorphism. *BMC Res Notes.* 2013;6:91.
- Schoster A, Weese JS, Guardabassi L. Probiotic use in horses - what is the evidence for their clinical efficacy? *J Vet Intern Med.* 2014;28:1640-52.
- Schoster A. Probiotika Einsatz beim Pferd – Sinn oder Unsinn. In: Herbsttagung der Vereinigung der österreichischen Pferdetierärzte (VÖP); 2015 Nov 19; Mauerbach, Österreich. VÖP; 2015; p. 1-5.
- Schoster A, Guardabassi L, Staempfli HR, Abrahams M, Jalali M, Weese JS. The longitudinal effect of a multi-strain probiotic on the intestinal bacterial microbiota of neonatal foals. *Equine Vet J.* 2016;48(6):689-696.
- Schoster A, Staempfli HR, Guardabassi LG, Jalali M, Weese JS. Comparison of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic foals at two and four weeks of life. *BMC Vet Res.* 2017;13:144.

- Selbitz HJ. Salmonellosen. In: Hrsg. Dietz O, Huskamp B, Hrsg. Handbuch der Pferdepraxis 3. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2006. p. 711-18.
- Shepherd ML, Swecker WS, Jensen RV, Ponder MA. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. FEMS Microbiol Lett. 2012;326:62-68.
- Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. Mil Med Res. 2017;4:14.
- Silva ROS, Ribeiro MG, Palhares MS, Borges AS, Maranhão RPA, Silva MX, Lucas TM, Olivo G, Lobato FCF. Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. Equine Vet J. 2013;45(6):671-5.
- Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. Gut. 2008;57:903-10.
- Slimings C und Riley TV. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2014;69(4):881-91.
- Smith HW und Crabb WE. J Path Bact. 1961;82:53.
- Smith HW. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. J Path Bact. 1965;89:95-122.
- Smits LP, Bouter KE, De Vos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. Gastroenterol. 2013;145:946-53.
- Sohail MU, Hume ME, Byrd JA, Nisbet DJ, Ijaz A, Sohail A, Shabbir MZ, Rehman H. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. Poult Sci. 2012;91:2235-40.
- Sommer G. Zur Bestimmung der Huminsäuren in Badetorfen. Z Analyt Chemie. 1960;176:347-35.
- Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine. Nat Immunol. 2004;5:569-573.

- Sorlini C, Brusa T, Ranalli G, Ferrari A. Quantitative determination of methanogenic bacteria in the feces of different mammals. *Curr Microbiol.* 1988;17:33-6.
- Souci SW. Neuere Erkenntnisse über die chemische Zusammensetzung des Badetorfes als Grundlage seiner balneotherapeutischen Bewertung. *Heil- und Kurort* 1956;8:43.
- Splechtna B, Nguyen T, Steinböck M, Kulbe KD, Lorenz W, Haltrich D. Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides from Lactose Using β -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem.* 2006;54(14):4999-5006.
- Steelman SM, Chowdhary BP, Dowd S, Suchodolski J, Janecka JE. Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. *BMC Vet Res.* 2012;8:231.
- Stein K. Vergleichende Untersuchungen zu ausgewählten pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften verschiedener Huminsäureprodukte. [Dissertation med. vet.] Leipzig: Universität Leipzig; 1994.
- Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(2):216-34.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
- Swidsinski A. Standards for bacterial identification by fluorescence *in situ* hybridization within eukaryotic tissue using ribosomal rRNA-based probes. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:824-6.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, Lochs H, Dorffel Y. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut.* 2007a;56: 343-50.
- Swidsinski A, Sydora BC, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Lupicki M, Scholze J, Lochs H, Dieleman LA. Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2007b;13(8):963-70.
- Suchodolski JS, Ruaux CG, Steiner JM, Fetz K, Williams DA. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *Am J Vet Res.* 2005;66(9):1556-1562.

- Suhr MJ, Banjara N, Hallen-Adams HE. Sequence-based methods for detecting and evaluating the human gut mycobiome. *Lett Appl Microbiol.* 2016;62:209-15
- Targan SR, Deem RL, Liu M, Wang S, Ne IA. Definition of a lamina propria T cell responsive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway. *J Immunol.* 1995;154:664-75.
- Tatsumi Y and Lichtenberger LM. Molecular association of trinitrobenzenesulfonic acid and surface phospholipids in the development of colitis in rats. *Gastroenterol.* 1996;110:780-789.
- Terada A, Hara H, Oishi T, Matsui S, Mitsuoka T, Nakajyo S, Fujimori I, Hara L. Effect of dietary lactosucrose on faecal flora and faecal metabolites of dogs. *Microb Ecol Health Dis.* 1992;5:87-92.
- Theriot CM, Koenigsnecht MJ, Carlson PE Jr., Hatton GE, Nelson AM, Li B, et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun.* 2014;5:3114.
- Theriot CM, Bowman AA, Young VB. Antibiotic-induced alteration of the gut microbiota alter secondary bile acid production and allow for *Clostridium difficile* spore germination and outgrowth in the large intestine. *mSphere.* 2016;1:e00045-15.
- Tillotson K, Traub-Dargatz JL, Dickinson CE, et al. Populationbased study of fecal shedding of *Clostridium perfringens* in broodmares and foals. *J Am Vet Med Assoc.* 2002;220:342-8.
- Tinker MK, White NA, Lessard P, Thatcher CD, Pelzer KD, Davis B, Carmel DK- Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine vet J.* 1997;29:448-453.
- Tiwari R, Kuldeep D, Sandip C, Kumar A, Rahal A, Kapoor S. Bacteriophage Therapy for Safeguarding Animal and Human Health: A Review. *Pak J Biol Sci.* 2014;17:301-15.
- Toden S, Bird AR, Topping DL, Conlon MA. Resistant starch attenuates colonic DNA damage induced by higher dietary protein in rats. *Nutr Cancer.* 2005;51(1):45-51.
- Toden S, Bird AR, Topping DL, Conlon MA. Resistant starch prevents colonic DNA damage induced by high dietary cooked red meat or casein in rats. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(3):267-72.

- Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 2001;81:1031.
- Traub-Dargatz JL, Salman MD, Jones RL. Epidemiologic study of *Salmonella* shedding in the feces of horses and potential risk factors for development of the infection in hospitalized horses. *J Am Vet Med Assoc.* 1990;196:1617-1622.
- Traub-Dargatz JL, Garber LP, Fedorka-Cray PJ et al. Fecal shedding of *Salmonella spp.* by horses in the United States during 1998 and 1999 and detection of *Salmonella spp.* in grain and concentrate sources on equine operations. *J Am Vet Med Assoc.* 2000;217:226-30.
- Tsukahara T und Ushida K. Succinate accumulation in pig large intestine during antibiotic-associated diarrhea and the constitution of succinate-producing flora. *J Gen Appl Microbiol.* 2002;48(3):143-54.
- Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:799-809.
- Turpin W, Humblot C, Thomas M, Guyot JP. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiol.* 2010;43:87-102.
- Tzortzis G, Vulevic J. Galacto-oligosaccharide prebiotics. In: Charalampopoulos D, Rastall RA, Hrsg. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology.* New York, USA: Springer, 2009; 207-44.
- Uzal FA, Diab SS, Blanchard P, Moore J, Anthenill L, Shahriar F, Garcia JP, Songer JG. *Clostridium perfringens* type C and *Clostridium difficile* co-infection in foals. *Vet Microbiol.* 2012;156(3-4):395-402.
- Valcheva R und Dieleman LA. Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016;30:27-37.
- van Eps AW, Pollitt CC. Equine laminitis induced with oligofructose. *Equine Vet J.* 2006;38(3):203-8.
- Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol.* 2006;35(3):182-8.

- van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, De Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG, Speelman P, Dijkgraaf MG, Keller JJ. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. N Engl J Med. 2013;368:407-15.
- Varma JK, Greene KD, Ovitt J, Barrett TJ, Medalla F, Angulo FJ. Hospitalization and antimicrobial resistance in Salmonella outbreaks, 1984-2002. Emerg Infect Dis. 2005;11(6):943-46.
- Varloud M, de Fombelle A, Goachet AG, Drogoul C, Julliand V. Partial and total apparent digestibility of dietary carbohydrates in horses as affected by the diet. Anim Sci. 2004;79:61-71.
- Vavra J and Joyon L. Etude sur la morphologie, le cycle évolutif, et la position systématique de *Callimastix cyclopis*. Weissenberg 1912, Protistologia. 1966;2(4):5-16.
- Verbrugghe A, Hesta M, Gommeren K, Daminet S, Wuyts B, Buyse J, Janssens G. Oligofructose and inulin modulate glucose and amino acid metabolism through propionate production in normal-weight and obese cats. J Nutr. 2009;102:694-702.
- Velcich A, Yang WC, Heyer J, et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. Science. 2002;295:1726-9.
- Venable EB, Fenton KA, Braner VM, Reddington CE, Halpin MJ, Heitz SA, Francis JM, Gulson NA, Goyer CL, Bland SD, Cross TWL, Holscher HD, Swanson KS. Effects of Feeding Management on the Equine Cecal Microbiota. J Equine Vet Sci. 2017;49:113-21.
- Verdonk JMAJ und Leeuwen P van. The application of inulin-type fructans in diets for veal calves and broilers. In Inulin and oligofructose Feelgood Factors for health and well-being, 4 th Orafit Research Conference, Paris, February 12 -13, 2004. p. 50-51.
- Vernia P, Annese V, Bresci G, d'Albasio G, D'Inca R, Giaccari S, Ingrosso M, Mansi C, Riegler G, Valpiani D, Caprilli R et al. Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis: results of a multicentre trial. Eur J Clin Invest. 2003;33(3):244-8.
- Vilei EM, Schlatter Y, Perreten V, Straub R, Popoff MR, Gibert M, Gröne A, Frey J. Antibiotic-induced expression of a cryptic cpb2 gene in equine b2-toxigenic *Clostridium perfringens*. Mol Microbiol. 2005;57:1570-81.
- Vipperla K, O'Keefe SJ. The Microbiota and Its Metabolites in Colonic Mucosal Health and Cancer Risk. Nutr Clin Pract. 2012;27(5):624-35.

- Vlková E, Rada V, Trojanová I, Killer J, Smehilová M, Molatová Z. Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. *Arch Anim Nutr.* 2008;62:359-65.
- Voltan S, Martines D, Elli M, Brun P, Longo S, Porzionato A, Macchi V, D'Inca R, Scarpa M, et al. *Lactobacillus crispatus* M247-derived H₂O₂ acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor-[gamma] in the intestinal mucosa. *Gastroenterol.* 2008;135:1216-27.
- Voigt A, Bergmann D (1977): Antibakterielle Prüfung von Huminsäuren. Unpublished report, VEB Tierarznei Weinböhla, cited from Stein K, 1994.
- von Ossowski I, Reunanen J, Satokari R, Vesterlund S, Kankainen M, Huhtinen H, Tynkkynen S, Salminen S, de Vos WM, Palva A. Mucosal adhesion properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:2049-57.
- Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, Dallinga-Thie GM, Ackermans MT, Serlie MJ, Oozeer R, Derrien M, Druesne A, Van Hylckama Vlieg JET, Bloks VW, Groen AK, Heilig HGJ, Zoetendal EG, Stroes ES, Nieuwdorp M. Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrom. *Gastroenterol.* 2012;143(4):913-16.
- Vulevic J, Rastall RA, Gibson GR. Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;236:153-9.
- Wagner M, Horn M, Daims H. Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6:302-9.
- Wang J, Fan H, Han Y, Zhao J, Zhou Z. Characterization of the microbial communities along the gastrointestinal tract of sheep by 454 pyrosequencing analysis. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2017;30(1):100-10.
- Weese JS, Parsons DA, Staempfli HR. Association of *Clostridium difficile* with enterocolitis and lactose intolerance in a foal. *J Am Vet Med Assoc.* 1999;214:229-232.
- Weese JS. *Clostridium difficile* associated enterocolitis in adult horses and foals. [Doctoral Thesis med. vet.]. Canada, Ontario: The University of Guelph; 2000.

- Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhea. *Equine Vet J*. 2001a;33:403-9.
- Weese JS, Baird JD, Poppe C, Archambault M. Emergence of *Salmonella typhimurium* definitive type 104 (DT104) as an important cause of salmonellosis in horses in Ontario. *Can Vet J*. 2001b;41(10):788-92.
- Weese JS. Evaluation of deficiencies in labeling of commercial probiotics. *Can Vet J*. 2003;44:982-3.
- Weese JS, Rousseau J. Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. *JAVMA*. 2005;226:2031-4.
- Weese JS, Holcombe SJ, Embertson RM, et al. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post partum colic. *Equine Vet J*. 2014;47:641-49.
- Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:18129-34.
- Wehkamp J, Chu H, Shen B, Feathers RW, Kays RJ, Lee SK, Bevins CL. Paneth cell antimicrobial peptides: topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. *FEBS Lett*. 2006;580:5344-50.
- Weimer PJ. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J Dairy Sci*. 1996;79:1496-502.
- Weingarden AR, Chen C, Zhang N, Graiziger CT, Dosa PI, Steer CJ et al. Ursodeoxycholic acid inhibits *Clostridium difficile* spore germination and vegetative growth and prevents the recurrence of ileal pouchitis associated with the infection. *J Clin Gastroenterol*. 2015;50:624-30.
- White G, Prior SD. Comparative effects of oral administration of trimethoprim/sulphadiazine or oxytetracycline on the faecal flora of horses. *Veterinary Record*. 1982;111:316-8.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes, the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:6578-83.

- Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:513-52.
- Wierup M: Intestinal clostridiosis. In: Robinson NE, Hrsg. *Current therapy in equine medicine.* 2. Aufl. Philadelphia: Saunders, 1987. p. 97-99.
- Willard MD, Berridge B, Brainiecki A, Bouley D. Possible antibiotic-associated colitis in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1998;213(12):1775-9.
- Williams EA, Coxhead JM, Mathers JC. Anti-cancer effects of butyrate: use of microarray technology to investigate mechanisms. *Proc Nutr Soc.* 2003;62:107-15.
- Willing B, Vörös A, Roos S, Jones C, Jansson A, Lindberg JE. Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage-only diets fed to horses in training. *Equine Vet J.* 2009;41(9):908-14.
- Wilson KH, Kennedy MJ, Fekety FR. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 1982;15:443-46.
- Wilson KH. Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. *J Clin Microbiol.* 1983;18:1017-19.
- Wilson DA, MacFadden KE, Green EM, Crabill M, Frankeny RL, Thorne JG. Case control and historical cohort study of diarrhea associated with administration of trimethoprim-potentiated sulphonamides to horses and ponies. *J Vet Intern Med.* 1996;6:258-64.
- Wilson B, Whelan K. Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *J Gastroenterol Hepat.* 2017;32(Suppl. 1):64-8.
- Wolter R, Dutrix A, Letourneau J-C. Influence du mode de présentation de fourrage sur la vitesse du transit digestif chez le poney. *Ann Zootech.* 1974;23:293-300.
- Wommack KE, Ravel J, Hill RT, Colwell RR. Hybridization analysis of Chesapeake bay virioplankton. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:241-50.
- Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40:235-43.

- Xenoulis PG, Palculict B, Allenspach K, Steiner JM, Van House AM, Suchodolski JS. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;66(3):579-89.
- Xiaoli X, Liyi Y, Shuang H et al. Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds by high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 2008;111:215-19.
- Xie H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ. Intergenic communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol.* 2000;182:7067-69.
- Xu J, Verstraete W. Evaluation of nitric oxide production by Lactobacilli. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;56:504-7.
- Yang J, Martinez I, Walter J, Keshavarzian A, Rose DJ. *In vitro* characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. *Anaerobes* 2013;23:74-81.
- Yuyama T, Shigeki Y, Takai S, Tsubaki S, Kado Y, Morotomi M. Evaluation of a Host-Specific Lactobacillus Probiotic in Neonatal Foals. In: Edited by Yusa S. *J Appl Res Vet Med.* 2004;2:26-32.
- Zambori C, Tirziu E, Nichita I, Cumpanasoiu C, Gros RV, Seres M, Mladin B, Mot D. Biofilm implication in oral diseases of dogs and cats. *Anim Sci Biotechnol.* 2012;45:208.
- Zentek J, Pascher M, Röttger S. Probiotika beim Pferd, Hilfe oder Hoffnung. *Pferdeheilkunde.* 2008;24:524-8.
- Zhang H, Feng J, Zhu W, Liu C, Gu J. Bacteriostatic effects of cerium-humic acid complex: an experimental study. *Biol Trace Elem Res.* 2000;73:29-36.
- Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DWK. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infec Dis.* 2000;181:664-70.
- Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run J-Q, Wei CL, Soh SW, et al. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 2006;4:e3. doi.org/10.1371/journal.pbio.0040003

Zhang F, Luo W, Shi Y, Fan Z, Ji G. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol.* 2012;107:1755.

Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:3854-59.

Zoetendal EG, De Vos WM. Effect of diet on the intestinal microbiota and its activity. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014;30(2):189-95.

Zwirgmaier K. Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) – the next generation. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;246:151-8.

8. Anhang

8.1 Abbildungen

Abb. 2

Verteilung der Eubakterien für die verschiedenen Gruppen (G) 1 bis 4 an den Probestagen 0, 3, 5, und 7 in Boxplot-Diagrammen. Der 0-Wert beschreibt Anzahlen unterhalb der Detektionsgrenze ($<10^6$ /ml).

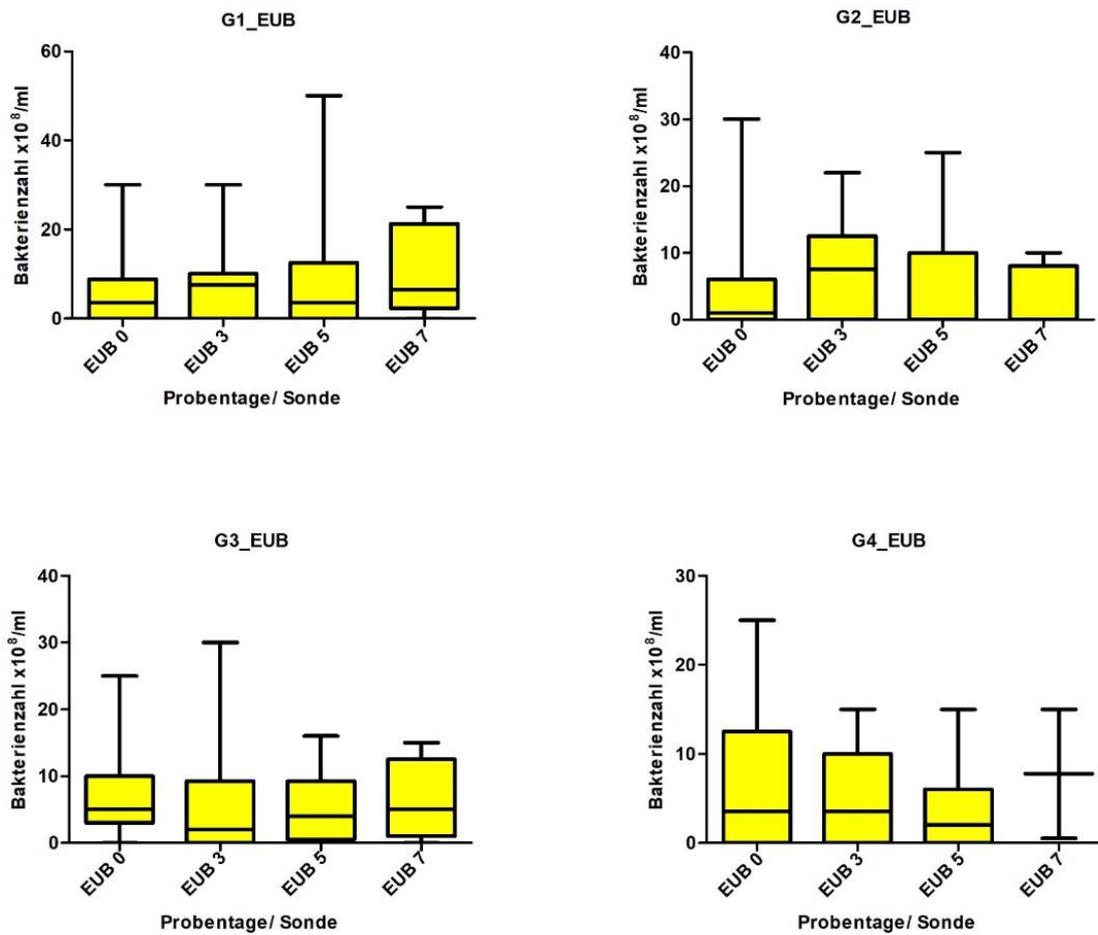


Abb. 3

Verteilung der *Bifidobacterium* spp. für die verschiedenen Gruppen (G) 1 bis 4 an den Probentagen 0, 3, 5, und 7 in Boxplot-Diagrammen. Der 0-Wert beschreibt Anzahlen unterhalb der Detektionsgrenze ($<10^6$ /ml).

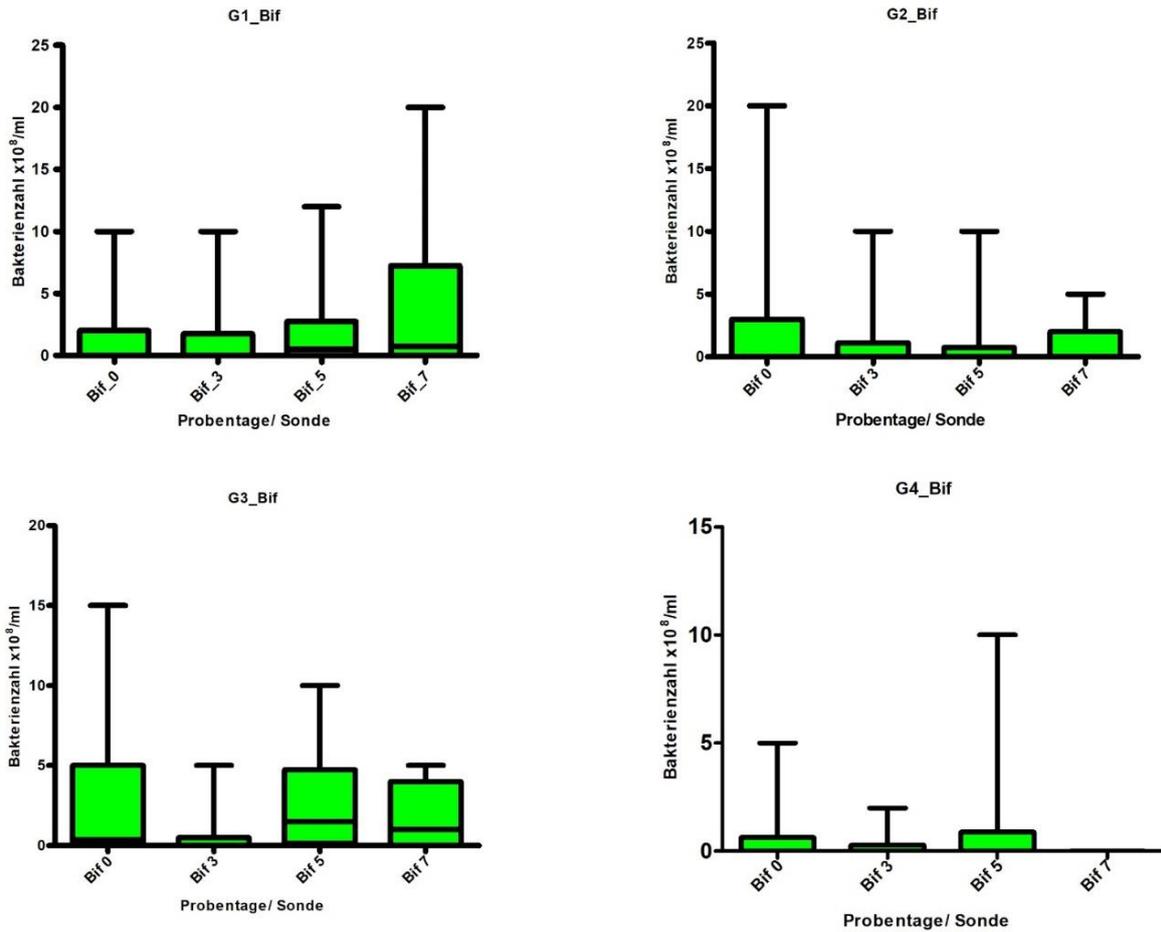


Abb. 4

Verteilung der *Cytophaga-Flavobacteria*-Klasse für die verschiedenen Gruppen (G) 1 bis 4 an den Proben Tagen 0, 3, 5, und 7 in Boxplot-Diagrammen. Der 0-Wert beschreibt Anzahlen unterhalb der Detektionsgrenze ($<10^6$ /ml).

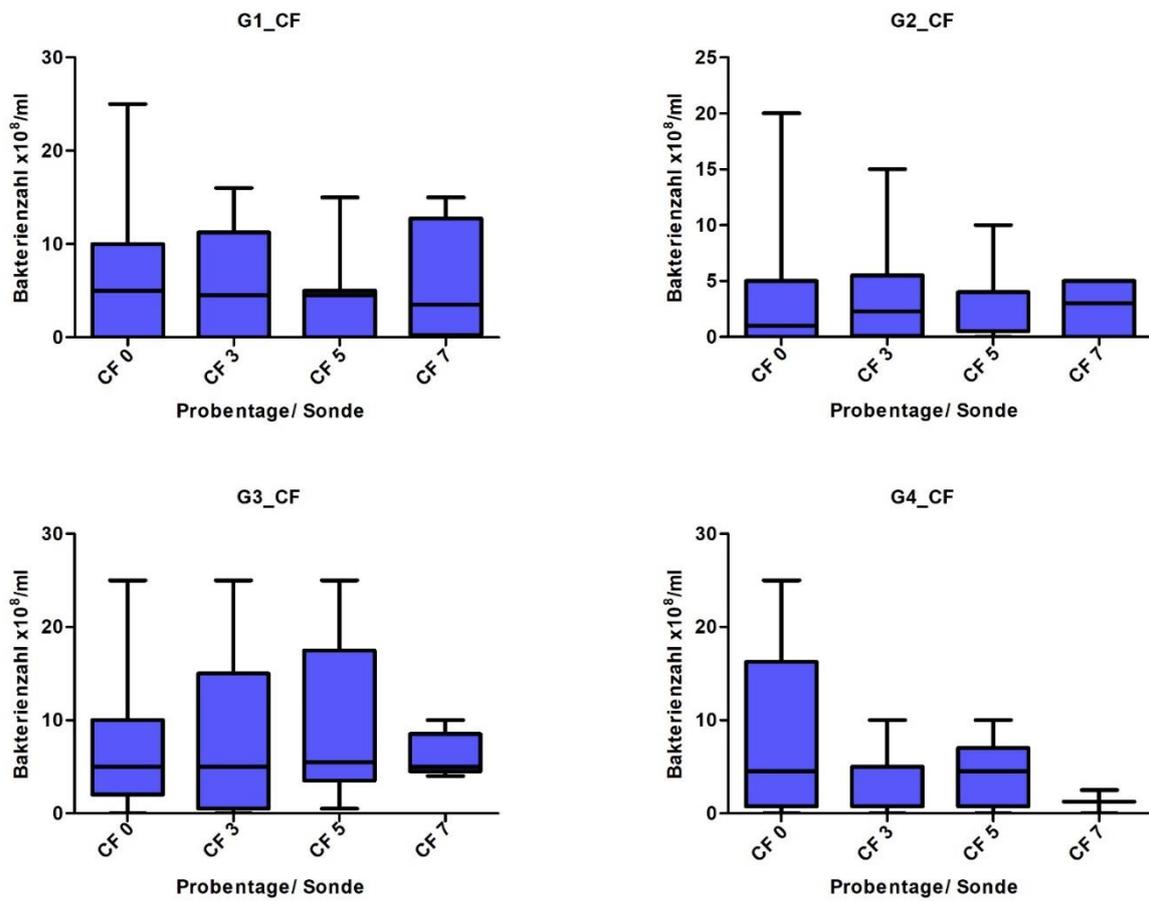


Abb. 5

Vergleich der Quantifizierung der initialen Kotprobe (Tag 0) der Pferde mit Colitis, anders erkrankten Pferde und der gesunden Pferde (Gruppe 1) für die Vertreter der Klasse *Cytophaga-Flavobacteria* (CF-Sonde). Darstellung über ein Boxplot-Diagramm. Der 0-Wert beschreibt Anzahlen unterhalb der Detektionsgrenze ($<10^6$ /ml).

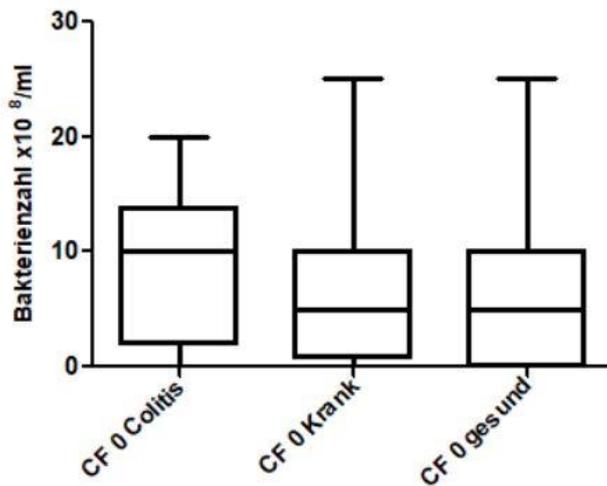
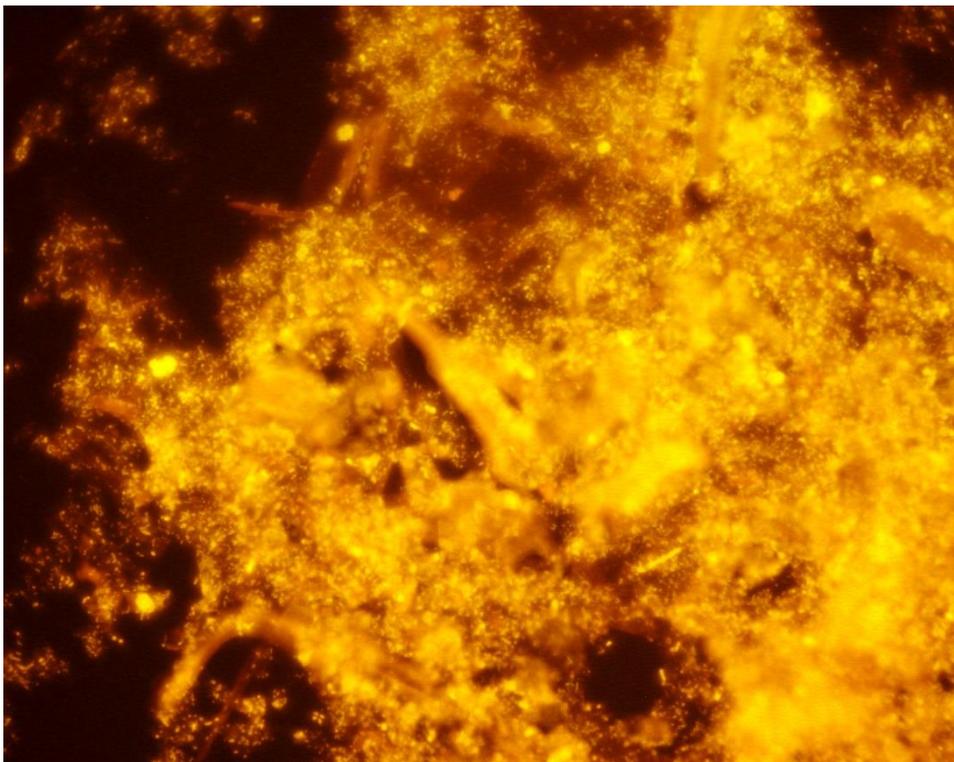


Abb. 6

Mikroskopiefoto einer Sedimentprobe in 400-facher Vergrößerung (Nikon DXM1200 Kamera). Probe am Tag 0 eines gesunden Pferdes der Gruppe 1 (Warmblutwallach, 15 Jahre). Die Kotprobe wurde unter Verwendung der Oligonukleotidsonde EUB 338 (Eubakterien) bearbeitet. Die Bakterienzahl war bei 1000-facher Vergrößerung bei $2,0 \times 10^9$ /ml. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff war Carbocyanite (Cy3).



8.2 Weitere Publikationen

Zeitschriftenaufsätze und Fallberichte

Ehlers K, Schusser GF, Uhlig A, Arnold C, **Graneß N**, Recknagel S, Köller G, Walraph J, Simon H, Hörügel U. Ausbruch der Equinen Infektiösen Anämie in Sachsen – Fallbericht, Epidemiologie und mögliche neue Bekämpfungsstrategien. Pferdeheilkunde. 2015;31:378-85.

Adam M, Arnold C, Ehlers K, **Graneß N**, Uhlig A, Recknagel S, Gerlach K, Schusser GF. Zervikale Rücken-markskompression in Verbindung mit Osteoarthritis des Gelenkfortsatzes bei 3 Pferden. Pferdeheilkunde. 2016;32:249-53.

Ehlers K, Uhlig A, Recknagel S, Snyder A, Breuer J, Arnold C, **Graneß N**, Schusser GF. Schleimhautläsionen im Bereich des Pylorus – retrospektive Studie an 315 Pferdepatienten (2004 - 2013). Pferdeheilkunde. 2016;32:96-102.

Köller G, Breitenstein M, **Graneß N**, Recknagel S, Barsnick R, Walliser U, Scheidemann W, Bienert-Zeit A, Donandt D, Stadtbäumer G, Paar M, Hell H, Schoon H-A, Schusser GF. Multi-centre study on the evaluation of alcohol dehydrogenase activity in the serum of horses with intestinal strangulation. Berl Münch Tierärztl Wochenschrift DOI 10.2376/0005-9366-16074, Online first: 17.11.2016 <http://vetline.de/open-access/158/3216>

Kongressbeiträge und Vorträge

Graneß N, Krüger M, Swidsinski A, Schusser GF. Mikrobiota beim Pferd unter Antibiotikatherapie und Fütterung von Huminsäuren. In: Rackwitz R, Pees M, Aschenbach JR, Gäbel G, Hrsg. 8. Leipziger Tierärztekongress. Tagungsband 2. Leipzig, Berlin: LBH; 2016. P. 96-8.

30.11.2017 Fortbildungsveranstaltung Turniertierarzttagung
Veranstalter: Tierklinik Bad Langensalza
„**Vet-Check während des Turniers**“, Nicole Graneß

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. F. G. Schusser, Direktor der Medizinischen Tierklinik Leipzig, möchte ich mich herzlich bedanken für die interessante Themenstellung und die freundliche Aufnahme in die Medizinische Tierklinik. Für die gute wissenschaftliche Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und die Gewährung großer wissenschaftlicher Freiräume für ein selbständiges Arbeiten, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Dank an Frau Prof. Dr. M. Krüger und besonders Herrn Dr. A. Swidsinski, Leiter des Molekularlabors der Abteilung Gastroenterologie der Charité Berlin, für die hervorragende Zusammenarbeit, für das Teilen des Wissens und seiner Erfahrung mit mir, seine fachliche Beratung und seiner herzigen aufmunternden sowie kompetenten Art das Themengebiet mit viel Freude zu bearbeiten.

Seiner Mitarbeiterin, Frau P. Schlien, gilt mein größter Dank, die sehr viel Zeit und Geduld mit mir hat bei der Einarbeitung der Analysemethodik. Dank für das entgegengebrachte Vertrauen selbständig die Probenanalytik durchzuführen.

Dank gilt auch meinen Freunden, Martina und Stephan Reiß, die mir immer eine Unterkunft in Berlin für diese Zeiten ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen hochgeschätzten Kolleginnen Frau Dr. C. Arnold und Frau Dr. K. Ehlers für ihre vielfältige Unterstützung, sei es in der Probensammlung, dem fachlichen Austausch, das besondere kollegiale Verhältnis sowie jegliche moralische Unterstützung. Aber ganz besonders danke ich ihnen zu tiefst für die unermüdliche Art mein Manuskript sowie Dissertationsschrift kritisch zu hinterfragen und aufmerksam durchzusehen.

Herrn Dr. G. Köller möchte ich danken für die Unterstützung bei statistischen Fragen. Auch allen weiteren Mitarbeitern der Medizinischen Tierklinik Leipzig, wie auch allen Tierpflegern und Labormitarbeitern, sage ich für die gute Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung „Danke“. Ebenso möchte ich allen Pferdebesitzern danken für die Bereitstellung ihrer Pferde für diese Studienzwecke.

Zuletzt möchte ich einzelne wichtige Personen danken, die auf den letzten Metern der Erstellung der Dissertation mir den Rücken gestärkt haben, wie Kollegin L. Schellenberg und Prof. Dr. G. Abraham sowie meiner Familie, vor allem meiner Mutter, kann ich nicht genug Danke sagen für jede Unterstützung, Aufmunterung und Rückhalt, besonders in schwierigen Zeiten.