

**Effekte einer frühen nachgeburtlichen Verabreichung von *Enterococcus faecium* (DSM 7134) und *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 7133) auf die fäkale Mikrobiota und die gesundheitliche Entwicklung von Fohlen**

von Christina Maria Ströbel

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

**Effekte einer frühen nachgeburtlichen Verabreichung von *Enterococcus faecium* (DSM  
7134) und *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 7133) auf die fäkale Mikrobiota und die  
gesundheitliche Entwicklung von Fohlen**

von Christina Maria Ströbel  
aus Bad Windsheim

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Angefertigt am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Naturwissenschaftliche Fakultät III

Mentor: Prof. Dr. Annette Zeyner

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Florian M. Trefz

Tag der Promotion: 8. Februar 2020

**Meinen Eltern Rita und Gerd Ströbel**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>viii</b>
<b>Headings of figures</b> .....	<b>ix</b>
<b>Headings of tables</b> .....	<b>x</b>
<b><i>I EINLEITUNG</i></b> .....	<b>1</b>
<b><i>II LITERATURÜBERSICHT</i></b> .....	<b>2</b>
<b>1 Die immunologische Entwicklung des Fohlens</b> .....	<b>2</b>
<b>2 Diarrhöe des Fohlens</b> .....	<b>4</b>
<b>3 Entwicklung der Mikrobiota</b> .....	<b>5</b>
<b>4 Besonderheiten des Magen-Darm-Traktes des Pferdes</b> .....	<b>6</b>
<b>5 Probiotika</b> .....	<b>7</b>
5.1 Probiotika in der Humanmedizin .....	7
5.2 Probiotika in der Veterinärmedizin .....	8
5.3 Milchsäurebakterien.....	9
5.4 <i>Enterococcus faecium</i> (DSM 7134) und <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (DSM 7133).....	9
<b><i>III PUBLIKATION I</i></b> .....	<b>10</b>
<b><i>Effects of oral supplementation of probiotic strains of Lactobacillus rhamnosus and</i></b> .....	<b>11</b>
<b><i>Enterococcus faecium on diarrhoea events of foals in their first weeks of life</i></b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>12</b>
<b>2 MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>15</b>
2.1 Animals .....	15
2.2 Administration of placebo and probiotic preparation.....	15
2.3 Housing systems .....	16
2.4 Feeding.....	17
2.5 Healthcare routine around foaling.....	17
2.6 Health control including diarrhoea events and growth of the foals.....	18
2.7 Feed sampling and analyses .....	19
2.8 Statistical analyses .....	19
<b>3 RESULTS</b> .....	<b>20</b>
3.1 Vitality of the neonates .....	20
3.2 Colostrum intake and colostrum quality .....	20
3.3 Diarrhoea.....	20
3.5 Nutritional condition .....	24
3.6 Behaviour .....	24
<b>4 DISCUSSION</b> .....	<b>24</b>
<b>5 REFERENCES</b> .....	<b>27</b>

<b>IV PUBLIKATION II.....</b>	<b>35</b>
<i>Effect of oral supplementation of a preparation with Lactobacillus rhamnosus (DSM 7133) and Enterococcus faecium (DSM 7134) on composition of the faecal microbiota of foals</i>	<b>36</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>37</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>38</b>
<b>2 MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>39</b>
2.1 Animals, housing and treatment.....	39
2.2 Animals feeding .....	40
2.3 Faeces sampling .....	40
2.4 DNA isolation .....	41
2.5 PCR and DGGE .....	41
2.6 DGGE band identification and classification .....	41
2.7 Real Time qPCR .....	42
2.8 Statistical analysis .....	42
<b>3 RESULTS .....</b>	<b>42</b>
3.1 Analysis of DGGE profiles, qPCR.....	42
3.2 Identification and classification of bands .....	46
<b>4 DISCUSSION .....</b>	<b>47</b>
<b>5 CONCLUSIONS.....</b>	<b>51</b>
<b>6 REFERENCES .....</b>	<b>51</b>
<b>V DISKUSSION.....</b>	<b>57</b>
<b>1 Diskussion der eingesetzten Methoden.....</b>	<b>57</b>
<b>2 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
<b>VI ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>62</b>
<b>VII SUMMARY .....</b>	<b>63</b>
<b>VIII LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>65</b>
<b>IX DANKSAGUNG.....</b>	<b>70</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADF	acid detergent fibre
ADL	acid detergent lignin
cfu	colony forming units
DGGE	Denaturierungsgradientengelelektrophorese
DNA	deoxyribonucleic acid
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FCS	faeces consistency score
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
NDF	neutral detergent fibre
PG	placebo group
PCoA	Principal coordinates analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
S	Svedberg
TG	treatment group



## Headings of figures

- Figure 1.1.** Number of foals per group (PG: n = 15; TG: n = 17) with diarrhoea during the first 14 days of life. ....21
- Figure 1.2.** Average number of days with diarrhoea per group within the first, second and first two weeks of life. Different letters indicate significant differences in means between groups ( $p < 0.05$ ). ....22
- Figure 1.3.** Average faeces consistency score (FCS) per group and day over the first two weeks of life with only foals suffering from diarrhoea taken ( $FCS < 3$ ) into account. ....22
- Figure 1.4.** Whole number of foals with noticeable lung examination results per group within the first 56 days of life. ....23
- Figure 2.1.** DGGE of amplicons of V6 – V8 regions of 16S rRNA gene obtained from faecal microbiota of foals from placebo (PG, at d14 [n=10] and at d56 [n= 12]) and treatment group (TG, at d14 [n=8] and at d56 [n=10]). M – marker lane. Each line represents one sample. The numbers depicted next to the bands indicate the excised bands which were reamplified for sequencing and identification (Table 2.2). ....44
- Figure 2.2.** Cluster (A) and a plot (B) of principal coordinate analysis (PCoA) of DGGE banding patterns of amplicons of the bacterial 16S rDNA obtained from faecal microbiota of foals from placebo (PG) and treatment group (TG). Each symbol represents one sample. The cluster was formed by means of unweighted pair group method with averaging based on the Dice coefficient of similarity. The scale bar indicates the percentage of similarity. The error flags at each node indicate standard deviation within each cluster. The numbers on the branches indicate the cophenetic correlation values which express the consistency of a cluster. PCoA plot was calculated based on Bray-Curtis distances between samples. ....45

## Headings of tables

<b>Table 1.1.</b> Number of foals per group on separated meadows (labelled 1-5) from day 5-10 <sup>a</sup> . .....	16
<b>Table 1.2.</b> Analyzed content of proximate nutrients of the used feedstuffs (DM, in g/kg; proximate nutrients in g kg <sup>-1</sup> DM) .....	17
<b>Table 1.3.</b> Scoring system for faeces consistency, behavior, skin turgor and nutritional .....	19
<b>Table 1.4.</b> Mean number of days with diarrhoea within the first two weeks of the placebo group (n = 15) and treatment group (n = 17) .....	21
<b>Table 1.5.</b> Mean withers height at birth of placebo group (n = 16) and treatment group (n = 18) foals and height growth until an age of 56 days (in cm). .....	24
<b>Table 2.1.</b> Calculated nutrients of the feedstuffs (g/kg DM). .....	40
<b>Table 2.2.</b> The counts of <i>Clostridium coccooides</i> group quantified using qPCR, values of similarity and diversity indices calculated from DGGE profiles and numbers of DGGE bands of the foals' faecal samples collected from placebo (at d14 [n=10] and at d56 [n=12]) and treatment group (at d14 [n=8] and at d56 [n=10]). All results are shown as mean values ± standard deviation. ....	46
<b>Table 2.3.</b> Identification and classification of reamplified DGGE bands (PG n=17 and TG n=13). .....	

## I EINLEITUNG

Die größten Verluste von Fohlen in der Pferdezucht treten im Zeitraum von der Geburt bis zum vollendeten ersten Lebensjahr auf. In der Fohlenaufzucht liegt, einer deutschen Studie nach, die Morbiditätsrate in den ersten zwei Lebenswochen zwischen 11-42% und die Mortalitätsrate bei 3-4% (Steiner und Lindner, 1993). Einer Studie zufolge lagen die Morbiditätsrate sowohl in den ersten zwei Lebenswochen, als auch im ersten Lebensjahr bei 25-27% und die Mortalitätsrate bei 5-6% (Morley PS, Townsend HG, 1997). Ähnliche Studien aus Kanada bestätigen diese Zahlen (Shawn D. Haas et al., 1996). Zu den häufigsten infektiösen Fohlenerkrankungen zählen Diarrhöe und Atemwegserkrankungen (Bäumer, 1997). Risikofaktoren für klinische Erkrankungen sind Geburtskomplikationen, mangelhaftes Haltungsmanagement oder schlechte Umweltbedingungen (Wohlfender et al., 2009).

Der Gastrointestinaltrakt des Pferdes, vor allem das große Kolon und Zäkum, wird von einer Vielzahl von Bakterien besiedelt, die eine große Rolle in der Gesunderhaltung des Individuums spielen. Diese Mikroflora kann durch vielfältige Mechanismen zur Stärkung bzw. Stabilisierung des Immunsystems beitragen. Diese Mechanismen beinhalten die Verhinderung der Besiedelung und Überwucherung mit pathogenen Mikroorganismen, die Stabilisierung der Blut-Darm-Schranke, die kompetitive Hemmung und der Beitrag zur Persistenz autochthoner Bakterien.

Da die Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen der Darmflora das Immunsystem positiv beeinflussen und pathogene Mikroorganismen eliminieren kann (Magalhaes et al., 2007), besteht in der Forschung seit Jahrzehnten großes Interesse, Möglichkeiten zur Beeinflussung dieser Mikroflora zu erforschen. Auch opportunistisch pathogene Keime kommen im Intestinaltrakt von gesunden Fohlen als Kommensalen vor (Mallicote et al. 2012, Slovis et al., 2014). Da die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora beim Fohlen bisher kaum untersucht wurde, ist es schwer eine Aussage über mögliche Ursachen für Durchfallerkrankungen bei Fohlen zu machen.

Die Verabreichung von Prebiotika, Probiotika und Synbiotika zur Stabilisierung der Darmflora wird sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin immer populärer. Beim Pferd hingegen, ist der Einsatz von Probiotika eher selten, da es an validierten Ergebnissen durch objektive Studien mangelt.

Viele Fohlen entwickeln den sogenannten „Fohlenrossedurchfall“ in der zweiten Lebenswoche. Diese Bezeichnung kommt aus früheren Zeiten von dem häufig zeitlichen

Zusammenhang mit der ersten Rosse der Mutterstute nach der Geburt. Jedoch gibt es mittlerweile viele Arbeiten, die diesen Bezug widerlegen. Es wird vielmehr vermutet, dass die Diarrhöe durch die Reifung des Gastrointestinaltraktes und die Entwicklung einer mikrobiell besiedelten Darmflora hervorgerufen wird (Kuhl et al., 2011). Grundsätzlich ist diese Diarrhöe nicht infektiös und in den meisten Fällen selbstlimitierend. Leider gibt es bisher zu wenige Untersuchungen, um eine Aussage zu treffen, inwiefern die Entwicklung der juvenilen Mikrobiota eine Rolle in diesem Zusammenhang spielt.

## **II LITERATURÜBERSICHT**

### **1 Die immunologische Entwicklung des Fohlens**

Fohlen verfügen bei der Geburt kaum über eigene Energiereserven, weshalb selbstständiges Aufstehen und der erste Saugakt von entscheidender Bedeutung für die rasche Energieversorgung sind. Zudem werden Fohlen annähernd ohne schützende Antikörper geboren, was die Aufnahme maternalen Antikörper aus dem Stutenkolostrum innerhalb der ersten 24 Lebensstunden entscheidend für die passive Immunisierung und somit das Überleben des Neonaten macht. Weiterhin bietet das Kolostrum bzw. die Stutenmilch auch einen lokalen Schutz der Darmschleimhaut vor pathogenen Erregern.

Das Immunsystem des Fohlens entwickelt sich bereits in der fetalen Lebensphase, wodurch Fohlen bei der Geburt voll immunkompetent sind. Jedoch besitzen Fohlen noch keine funktionierende spezifische Abwehr. Der Unterschied zum adulten Pferd liegt im Fehlen von geprägten B- und T-Lymphozyten, sog. Gedächtniszellen, die sich aufgrund des fehlenden Umweltkontaktes noch nicht entwickeln konnten (Schuberth et al., 2011). Fohlen verfügen über nahezu keine Antikörper bei der Geburt, sind aber sofort in der Lage solche zu bilden und entwickeln nach 2 Wochen eine wirksame aktive Abwehr, die nach 2 Monaten einen ausreichenden Immunglobulinspiegel erreicht. Kolostrale maternale Antikörper haben im Fohlenblut eine Halbwertszeit von 18-39 Tagen (Sheoran et al., 2000; Wilson et al., 2001). Nach 8-12 Wochen gleicht der endogene Immunglobulinspiegel des Fohlens dem eines adulten Pferdes (Kolm G, 2011).

Die Plazenta epitheliochorialis des Pferdes ermöglicht weder einen Blutaustausch zwischen Stute und Fohlen noch einen Transfer von Immunglobulinen von der Stute auf das

Fohlen, wodurch aber auch keine Antigenübertragung möglich ist. Die Milchdrüse der Stute produziert ausschließlich IgA-Moleküle, während die IgG-Moleküle in den letzten 2-3 Wochen der Trächtigkeit aus dem Blut gefiltert werden. Die IgG-Konzentration des Kolostrums liegt bei der Geburt bei ca. 70 g/l (~ 20-30% Brix) und sinkt bis 24 h nach der Geburt auf unter 5 g/l (2% Brix) (Knottenbelt, 2004). Währenddessen nimmt der IgA-Spiegel im Kolostrum zu, um einen lokalen Schutz der Darmschleimhaut des Fohlens zu gewährleisten (Schuberth et al, 2011).

Da der Darm sich ununterbrochen mit Fremdanthigenen auseinandersetzen muss, und sowohl zwischen Pathogenen, nutzbringenden Mikroorganismen als auch absorbierbaren Nahrungsbestandteilen unterscheiden muss, werden an das Darmimmunsystem besondere Ansprüche gestellt. Hierzu zählen die angeborene, antigenunspezifische und die erworbene Abwehr. Das „mucosa associated lymphoid tissue“ (MALT) besteht aus Lymphfollikeln, Peyer'schen Plaques sowie mesenterialen Lymphknoten. Die Abwehrzellen des Darmimmunsystems setzen sich aus B- und T-Lymphozyten, intraepithelialen Lymphozyten, dendritischen Zellen, T-Zellen und Plasmazellen der Lamina propria, Makrophagen, Mastzellen und M-Zellen des Epithels zusammen. Bei dem sog. „Homing“-Prozess wandern im Darm gebildete Lymphozyten über die mesenterialen Lymphknoten in die Blutbahn und wieder zurück in den Darm. Dabei entstehen aktivierte Immunzellen, die spezifische Antikörper bilden (Jungi, 2000).

Dies ist ein wichtiger Faktor bei der passiven Immunisierung von Neugeborenen. Lymphozyten aus dem Darm der Stute wandern in die Milchdrüse und produzieren dort große Mengen Darm-spezifischer IgA. Analog dazu findet der Transfer von Lymphozyten bzw. spezifischem IgA der respiratorischen und anderer Schleimhäute statt (Jungi, 2000).

Im Darm findet vor allem eine IgA-vermittelte Immunantwort statt. Das sekretorische IgA stellt einen wesentlichen Schutzmechanismus des Darmes dar, indem es die Adhäsion und Invasion von infektiösen Antigenen verhindert. Auch gibt es Hinweise, dass IgA-gebundene Antigene besser durch M-Zellen absorbiert werden (Autenrieth, 2001). Beim Fohlen ist ab der 3./4. Lebenswoche eine adäquate Anzahl und Funktion von antigenspezifischen T- und B-Zellen zu erwarten, so dass das Immunsystem auf Pathogene reagieren kann (Schuberth et al, 2011).

Um die Umstellung von plazentarer Ernährung auf die Milchaufnahme zu gewährleisten, ist bereits bei der Geburt eine hohe Aktivität von Laktasen im Dünndarm messbar (Roberts, 1975). Der Dünndarm ist das in den ersten Lebensmonaten am schnellsten wachsende Darmsegment, welchem mit 80% der gesamten Darmlänge die größte Bedeutung

zukommt (Hoven van den, 2011). Mit der Aufnahme größerer Mengen an Raufutter macht das Zäkum innerhalb des ersten halben Jahres die größte Entwicklung durch und der gesamte Darm nimmt innerhalb des ersten Jahres am meisten an Größe zu (Smyth G, 1988). Bereits wenige Tage nach der Geburt kann man Fohlen bei der Aufnahme von Raufutter und Kot, vor allem von der Mutterstute, beobachten. Koprophagie ist ein natürliches Verhalten, das zur Entwicklung des Verdauungstraktes beiträgt. Es wird vermutet, dass hierdurch einerseits Mikroorganismen zur Entwicklung der Darmflora, andererseits auch Nährstoffe, den Fohlen fehlende flüchtige Fettsäuren oder andere Säuren aufgenommen werden (Crowell-Davis, 1985).

## **2 Diarrhöe des Fohlens**

Die Diarrhöe des Saugfohlens stellt neben der Pneumonie die häufigste infektiöse Erkrankung von Saugfohlen dar (Bostedt, 2006).

Die Diarrhöen können in nicht-infektiöse und infektiöse Ursachen eingeteilt werden. Zu den nicht-infektiösen Durchfallerkrankungen zählen die „Fohlenrossediarrhöe“, fütterungsbedingte Diarrhöe, ischämische Enterokolitis, mechanische Enterokolitis und selten Diarrhöe durch gastroduodenale Ulzera (Velde und Kolm, 2011).

Bei rund 80% der Fohlen tritt im Alter von 8-12 Tagen eine in der Regel komplikationslos verlaufende Diarrhöe auf. Diese wird irrtümlich, aufgrund des zeitlichen Zusammenhanges, als Fohlenrossedurchfall bezeichnet (Kuhl et al., 2011). Es handelt sich hierbei um eine sekretorische Diarrhöe. Sie wird durch eine Hypersekretion der Dünndarmschleimhaut, die durch das unreife Kolon noch nicht bewältigt werden kann, verursacht. Für diese Tatsache spricht ebenfalls, dass die Kotzusammensetzung nach Ende der Diarrhöe annähernd der eines erwachsenen Pferdes entsprach. Vor allem die Zusammensetzung der flüchtigen Fettsäuren lässt auf eine funktionierende Dickdarmflora schließen (Masri et al., 1986).

Die Diarrhöe durch Fütterungsfehler tritt meist bei Waisenfohlen oder zusätzlicher Flaschenfütterung auf. Ursachen können ein falsches Mischungsverhältnis des Milchaustauschers, Verfütterung von boviner Milch oder zu große Tränkemengen sein. Eine perinatale Asphyxie kann durch ischämische Darmschädigung zu einer osmotischen Diarrhöe führen. Bei der mechanischen Enterokolitis ist die Diarrhöe durch eine mechanische Irritation infolge einer Aufnahme großer Mengen Sand, Einstreu oder anderer Fremdkörper bedingt

(Velde und Kolm, 2011). Selten kann eine Diarrhöe beim Fohlen auch durch gastroduodenale Ulzera verursacht werden (Velde und Kolm, 2011).

Enteritiden aufgrund infektiöser Ursachen können beim Fohlen durch Viren, Bakterien, Parasiten oder Pilze hervorgerufen werden. Die bedeutendsten viralen Durchfallerreger des Fohlens sind Rota- und Coronaviren. Durch eine Rotavirusinfektion kommt es zu einer Schädigung der Mikrovilli im Dünndarm und dadurch zu einer Defizienz von Bürstensaumenzymen, die zu einer Maldigestion und -absorption und weiterhin zu einer osmotischen Diarrhöe führen (Lester, 2001). Des Weiteren können auch Adeno- und Parvoviren eine Diarrhöe beim Fohlen auslösen.

Zu den bakteriellen Ursachen von Diarrhöen beim Fohlen zählen Clostridieninfektionen (*Cl. perfringens* und *difficile*) als Verursacher von Enterokolitiden, endo- und enterotoxinbildende *E. coli*, *Salmonellen*, *Lawsonia intracellularis*, der eine regionale Ileitis mit Schleimhauthypertrophie und *Rhodococcus equi*, welcher eine multifokale ulzerative Enterokolitis auslöst. Weitere, seltenere bakterielle Durchfallerreger sind *Bacteroides spp.*, *Clostridium sordelli*, *Enterococcus durans*, *Actinobacillus equuli* und *Aeromonas hydrophilia*.

Parasiten, die beim Fohlen Diarrhöen verursachen sind Kryptosporidien, Kokzidien, Strongyliden und Giardien (Velde und Kolm, 2011). Aufgrund ihres unreifen Immunsystems sind besonders Fohlen anfällig für parasitäre Infektionen.

Auch Pilzinfektionen können beim Fohlen Durchfall hervorrufen. Soor ist eine Mykose, die beim Fohlen vorkommt und durch *Candida albicans* verursacht wird.

Prinzipiell können bei erkrankten Fohlen alle Durchfallerreger zu einer Septikämie führen.

### **3 Entwicklung der Mikrobiota**

Der Gastrointestinaltrakt von Fohlen ist bei der Geburt steril, da die Plazenta eine Barriere für kommensale, wie auch pathogene Keime darstellt (Schnorr et al., 2011). Überträgt man humanmedizinischen Erkenntnissen auf das Pferd, so kann man annehmen, dass auch beim Pferd die erste Besiedelung des Darmes durch Mikroben aus der Vaginalflora der Mutter während des Geburtsvorgangs erfolgt (Biasucci et al., 2010). Die weitere Darmbesiedelung beim Fohlen geschieht durch Aufnahme von Mikroben durch Saugversuche auch an anderen Körperstellen der Mutterstute beim Aufsuchen des Euters, erste Festfutteraufnahme und

Koprophagie. Bei der Aufnahme von Kot bevorzugen Fohlen frischen Kot vor allem von der Mutterstute (Crowell-Davis, 1985; 1995). Dadurch werden mehr lebende Mikroorganismen aufgenommen, die zur Entwicklung einer kommensalen Darmbesiedelung beitragen und dadurch könnte auch die Ähnlichkeit der intestinalen Mikroflora von Stute und Fohlen zustande (Earing et al., 2012). Untersuchungen bei Kälbern zeigten, dass die Besiedelung des Pansens sofort nach der Geburt beginnt. In den ersten Lebenswochen kommt es zu großen Schwankungen in Anzahl und Vorkommen verschiedener Bakterienpopulationen, aber ab einem Alter von acht bis zehn Wochen ist sowohl die Anzahl als auch die Diversität der Mikrobiota im Pansen mit der von adulten Rindern vergleichbar (Zoilecki et al., 1961, Minato et al., 1992).

In Untersuchungen, die mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion der bakteriellen 16S rRNA Region und anschließender Denaturierungsgradientengelelektrophorese (PCR-DGGE) durchgeführt wurden, konnten Bakterien der Stämme *Firmicutes*, *Bacteroidetes* und *Fibrobacter succinogenes* und *Ruminococcus flavefaciens* in der equinen intestinalen Mikroflora nachgewiesen werden (Sheperd et al., 2014). Diese ist eine bewährte Methode, kulturunabhängig, mikrobielle Gemeinschaften im Darm zu bestimmen (Earing et al., 2012; Grønvold et al., 2010; Janczyk et al., 2007; Pieper et al., 2010; Slovis et al., 2014; Urubschurov et al., 2015).

*Clostridium coccooides* war die am häufigsten vorkommende Bakterienpopulation in adultem menschlichem Stuhl in einer Studie von Matsuki et al. (2004). In Untersuchungen von Mariat et al. (2009) konnten altersbedingte Veränderungen in der intestinalen Mikrobiota des Menschen beobachtet werden, dabei wurde bei Kleinkindern der höchste Gehalt an *C. leptum* und *C. coccooides* nachgewiesen. Daly et al. (2003) identifizierte die *C. coccooides*-Gruppe auch beim Pferd als eine der vorherrschenden Bakterienarten im Intestinaltrakt.

#### **4 Besonderheiten des Magen-Darm-Traktes des Pferdes**

Das Pferd ist ein Herbivore und zählt anatomisch zu den Monogastriern und Dickdarmverdauern, dessen mikrobielle Verdauung vor allem im Kolon erfolgt. Kolon und Zäkum stellen umfangreiche Gärkammern dar, die für die Zelluloseverdauung notwendig sind und deren Größe vergleichbar ist mit den Vormägen der Wiederkäuer. Leichtverdauliche Kohlenhydrate und verdauliches Eiweiß werden im Magen und Dünndarm gespalten und als Monosaccharide und Aminosäuren bzw. Dipeptide resorbiert. Zellulose und andere



Zellwandbestandteile von Pflanzen können durch körpereigene Enzyme nicht abgebaut werden und gelangen unverdaut in den Dickdarm. Dort werden die Mono-, Di- und Polysaccharide durch mikrobielle Verdauung zu kurzkettigen Fettsäuren abgebaut und liefern somit 60-70% der Körperenergie des Pferdes (Breves und Diener, 2000). Während der Dickdarm des Pferdes vor allem als Gärkammer dient, stimulieren die dort enthaltenen Mikroben das Immunsystem, schützen vor Pathogenen, neutralisieren Toxine und regulieren die Genexpression im Epithelgewebe des Wirtes (Milinovich et al., 2010). Ein stabiles und gesundes gastrointestinales Mikrobiom ist sehr bedeutend für die Gesundheit des Pferdes. Untersuchungen der Zusammensetzung der Mikrobiota und die therapeutische Modifikation erfahren in den letzten Jahren gesteigertes Interesse. Probiotika sind eine Methode die Darmmikrobiota zu modifizieren und haben eine positive Wirkung in der Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen gezeigt.

## **5 Probiotika**

Schrezenmeir und de Vrese (2001) definierten Probiotika als eine Zubereitung lebender Mikroorganismen einer spezifischen Gattung und Spezies in ausreichender Menge, um das Mikrobiom des Wirtes durch Implantation oder Kolonisation zu verändern und um günstige Effekte auf den Wirt auszuüben.

Probiotika sind per definitionem lebende Mikroorganismen, die, bei oraler Verabreichung in angemessener Dosierung, einen gesundheitlichen Nutzen für ihren Wirt, zusätzlich zu ihrem eigentlichen Nährwert, liefern (Guarner and Schaafsma, 1998). Die mikrobielle Darmflora kann das Immunsystem positiv anregen, indem die probiotischen Keime die Aktivität der Makrophagen erhöhen und die Bildung von Plasmazellen bewirken (Fuller, 1989). Probiotika sollen neben dem Effekt der kompetitiven Hemmung pathogener Mikroorganismen auch antimikrobielle, immunregulierende, antiinflammatorische und antikanzerogene Effekte sowie direkte Auswirkungen auf die intestinale Mukosa haben (Weese et al., 2008). Die am besten geprüften und am weitesten verbreiteten Probiotika enthalten *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus* spp und *Saccharomyces* spp.

### **5.1 Probiotika in der Humanmedizin**

Bereits vor rund 100 Jahren stellte Metchnikoff (1907) die Hypothese auf, dass durch Reduktion bzw. Ersatz von Fäulnisregern im Darm durch Milchsäurebakterien (v.a. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) die Darmgesundheit gefördert und das Leben

verlängert wird. 1989 betonte Fuller, dass durch Probiotika der ursprüngliche Zustand der mikrobiellen Flora des Gastrointestinaltrakts wiederhergestellt wird und ein positiver Effekt auf den Ernährungs-, Wachstums- und Gesundheitszustand des Wirtes hervorgerufen wird (Fuller, 1989). Es konnte gezeigt werden, dass einige Probiotika die Schwere von Durchfallerkrankungen lindern können, z.B. bei infektiösen und antibiotika-assoziierten Durchfällen, Infektionen mit *Clostridium difficile*, Reizdarmsyndrom und entzündlichen Darmerkrankungen (Balakrishnan et al., 2012; Guarner et al. 2006). Van Niel et al. (2002) konnte eine deutliche Reduktion der Durchfalldauer und -frequenz bei akuten infektiösen Diarrhöen bei Kindern durch *Lactobacillus rhamnosus* GG darlegen.

## 5.2 Probiotika in der Veterinärmedizin

Neben dem therapeutischen Nutzen sind Probiotika bei lebensmittelliefernden Tieren auch als Wachstumsförderer, zur Steigerung der Futterverwertung und zur Stimulation des Immunsystems als Alternative zu Antibiotika von Interesse. Timmerman et al. (2005) konnten bei Kälbern, die sechs *Lactobacillus*spezies erhielten, neben erhöhter Futterverwertung und Tageszunahmen auch reduzierte Mortalität und Durchfallhäufigkeit, sowie weniger therapiewürdige Erkrankung feststellen. In Studien der Jahre 1973 - 2003 zur Wirkung von Probiotika auf neonatale Kälberdiarrhöe konnte nur in rund der Hälfte der Studien ein positiver Effekt auf Vorkommen und Schwere der Durchfälle nachgewiesen werden, wobei in 5 % der Fälle sogar ein nachteiliger Effekt beobachtet wurde (Rodriguez-Palacios et al., 2004; Yoon und Stern, 1995). *Lactobacillus rhamnosus* GG überlebte zwar die Darmpassage, zeigte jedoch keinerlei Wirkung auf Mortalität oder Kotkonsistenz bei Kälbern mit Diarrhöe (Ewaschuk et al., 2004, 2006).

Auch bei Ferkeln werden Probiotika zum Schutz vor Diarrhöe eingesetzt. Eine geringere Durchfallhäufigkeit, ein niedrigerer Durchfallscore und höhere Tageszunahmen konnten bei Ferkeln, die von der Geburt bis zum Absetzen *E. faecium* DSM 10663 (NCIMB 10415) erhielten, verzeichnet werden (Zeyner und Boldt, 2006). Ähnliche Effekte wurden beobachtet mit *B. cereus* CIP 5832 (Alexopoulos et al., 2001), *L. acidophilus* und *B. pseudolongum* (Abe et al., 1995).

Für Pferde ist derzeit futtermittelrechtlich EU-weit kein Probiotikum zugelassen, da die positiven Wirkeigenschaften nicht ausreichend erforscht und nachgewiesen sind. Die Beschränkung seitens des Gesetzgebers beugt eventuellen negativen Auswirkungen durch den unkontrollierten Einsatz von lebenden Mikroorganismen vor.

Durch das gehäufte Auftreten gastrointestinaler Krankheiten mit oftmals fatalen Folgen bei Pferden besteht auch hier ein großes Interesse an der Prävention von infektiösen (v.a. Salmonellen, Clostridien), stressbedingten und Antibiotika-assoziierten Durchfällen sowie von Koliken und insbesondere der Kontrolle des „Fohlenrossedurchfalls“. Jedoch konnte bisher kein nützlicher Effekt durch die Verabreichung von Probiotika beim Pferd beobachtet werden (Parraga et al., 1997; Kim et al., 2001). Weese et al. beschäftigten sich mit der These, dass sowohl die Auswahl der Mikroben, als auch die Dosis in den bisher durchgeführten Studien von Nachteil waren. Infolgedessen identifizierten sie equine Milchsäurebakterien aus dem Kot gesunder Pferde. In vitro konnte ein antagonistischer Effekt von *Lactobacillus pentosus* WE7 gegen einige enteropathogene Erreger nachgewiesen werden. Außerdem konnte dieser Keim nach oraler Verabreichung erneut aus dem Kot isoliert werden (Weese et al., 2004). In einer darauffolgenden Studie sollten die in vitro gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden. Es zeigte sich, dass die Verabreichung von *Lactobacillus pentosus* WE7 an Fohlen in Verbindung stand mit der Entwicklung von Diarrhöe und zusätzlichen klinischen Symptomen (Weese and Rousseau, 2005). In einer früheren Studie konnte das Vorhandensein von menschlichem *Lactobacillus rhamnosus* GG im Kot von Fohlen bis zu neun Tagen nach Beendigung der oralen Verabreichung belegt werden, wobei hier weder positive noch negative Effekte auf die Gesundheit der Pferde beobachtet wurden (Weese et al., 2003).

### 5.3 Milchsäurebakterien

Laktobazillen und Enterokokken zählen zu den Milchsäurebakterien. Sie wachsen in Umgebung hoher Konzentrationen von Kohlenhydraten, Proteinabbauprodukten und Vitaminen in Verbindung mit niedrigen Sauerstoffgehalten. Durch den Abbau von Kohlenhydraten zu Milchsäure produzieren sie große Mengen an Milchsäure und unterdrücken somit das Wachstum vieler anderer Bakterien durch Senkung des pH-Wertes der Umgebung (Sharpe, 1981). Sie gehören zur autochthonen Mikrobiota der Mundhöhle, des Verdauungs- und Geschlechtstrakts von Säugetieren. Innerhalb des Verdauungstrakts kommen Laktobazillen und Enterokokken vor allem in Ileum und Dickdarm in großen Zahlen vor.

### 5.4 *Enterococcus faecium* (DSM 7134) und *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 7133)

Enterokokken und Laktobazillen kommen in großen Mengen ( $10^8$  bzw.  $10^4 - 10^5$  KBE pro Gramm Chymus) in der physiologischen Darmflora von Tieren vor (Guilott, 2000). Des Weiteren gehören Enterokokken bei vielen Tieren bereits zur vorherrschenden Darmflora in

den ersten Lebenstagen (Hinrichs, 2005). Maragkoudakis et al. (2010) beschreiben einen direkten antiviralen Effekt dieser probiotischen Stämme in intestinalen Epithel- und Immunzellen, während Miyazaki et al. (2010) einen bakteriziden Effekt gegen entero-aggregative *Escherichia coli* nachwiesen.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Effekte einer frühen Besiedelung mit *Enterococcus faecium* (DSM 7134) und *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 7133) auf die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota und auf das Durchfallgeschehen, das Wachstum und die gesundheitliche Entwicklung von Fohlen zu erforschen.

### III PUBLIKATION I

Die folgende Publikation

**‘Effects of oral supplementation of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium* on diarrhoea events of foals in their first weeks of life’**

wurde am 16. April 2018 von der Zeitschrift „Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition“ zur Veröffentlichung angenommen.

Article available online May, 23rd 2018.

DOI: 10.1111/jpn.12923

J Anim Physiol Anim Nutr. 2018;102:1357–1365.

Article ID: JPN12923

Article DOI: 10.1111/jpn.12923

Internal Article ID: 15352478

Article: Effects of oral supplementation of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium* on diarrhoea events of foals in their first weeks of life

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition: <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12923>

**Effects of oral supplementation of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium* on diarrhoea events of foals in their first weeks of life**

Christina Ströbel<sup>1</sup>, Kristin Romanowski<sup>2\*</sup>, Elena Günther<sup>1</sup>, Vladimir Urubshurov<sup>1</sup>, Kirsten Büsing<sup>3\*</sup>, Annette Zeyner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Group Animal Nutrition, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

<sup>2</sup>Stülower Dorfstraße 1, Retschow OT Stülow, Germany

<sup>3</sup>District Administration Vulkaneifel, Department 8: Veterinary Office and Agriculture, Daun, Germany

\*Formerly Chair of Nutritional Physiology and Animal Nutrition, University of Rostock, Rostock, Germany.

Correspondence Prof. Dr. Annette Zeyner, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Group Animal Nutrition, Halle (Saale), Germany. Tel: ++49 (0)345-5522716; Fax: ++49 (0)345-5527050; Email: [annette.zeyner@landw.uni-halle.de](mailto:annette.zeyner@landw.uni-halle.de)

Keywords: growth performance of foals, health performance of foals, lactic acid bacteria, probiotic bacteria

Running head: effect of probiotic treatment on foals' diarrhoea

## ABSTRACT

Foal first diarrhoea is one of the most prominent problems in the early life of horses. Probiotics might have the potency to prevent or at least diminish neonatal diarrhoea. We hypothesised that the treatment of foals with probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium* starting early after birth and then daily over 2 weeks would prevent or mitigate foal heat diarrhoea. The influence of this probiotic treatment on diarrhoea incidence and growth and health performance of young foals was investigated. Thirty-four foals were randomly allocated to two groups. From day 1 to 14 of life, the foals received either placebo (PG, n = 16) or the probiotic treatment (TG, n = 18). Clinical examination was performed, and the faeces consistency score (FCS, 1–5; with diarrhoea defined by  $\leq 3$ ) was recorded once per day in weeks 1 and 2 and once weekly in weeks 3–8 of life (WL). The body height was measured at birth and after two and eight WL. Diarrhoea occurred in the 1st WL in 19% and 61% of PG and TG foals respectively. In the 1st WL, diarrhoea lasted  $0.3 \pm 0.8$  and  $1.6 \pm 1.4$  days in PG and TG foals respectively. In the 2nd WL, diarrhoea occurred in 94% and 84% of PG and TG foals, respectively, and lasted for  $3.0 \pm 1.5$  and  $3.7 \pm 1.6$  days respectively. At least two periods of diarrhoea developed in 33% and 65% of PG and TG foals respectively. The TG foals grew slightly slower than the PG foals. The results indicated that the probiotic treatment of neonatal foals as performed in this study was not suitable to reduce diarrhoea within the first two WL, because contrary to the hypothesis, the TG foals suffered more frequently and for longer periods from diarrhoea than the PG foals.

## 1 INTRODUCTION

Most diseases and losses of foals in equine breeding occur immediately after birth and within the first 2 weeks of life respectively. Other peaks occur from approximately the fifth until the tenth week and during the time of weaning (Bostedt, 2006). According to German studies, the morbidity rate within the first 2 weeks of life is 11%–42%, and the mortality rate is 3%–4% (Steiner & Lindner, 1993). Studies from Canada confirm these data (Haas, Bristol, & Card, 1996; Morley & Townsend, 1997). Gastrointestinal and respiratory diseases are the most frequent causes of foal losses. However, most foals suffer from “foal heat diarrhoea,” which is temporarily but not physiologically associated with the mare’s first oestrus after parturition (Kuhl et al., 2011). Although this type of diarrhoea is apparently normal and is self-

limiting in most cases, concerns are that this type of diarrhoea may lead to further disruptions. Therefore, the interest is huge in stabilising the microflora within the gut of foals. In this concern, probiotics may have positive effects, as has also been demonstrated in humans and other animals.

Probiotics are defined as “live micro-organisms, which when administered in adequate amounts, confer a health benefit for the host” (FAO, 2001). In particular, in horses, probiotics should only be used under certain conditions considering special requirements (Julliard & Zeyner, 2009).

The intestinal tract represents the largest mucosal surface, and 75% of all immunoglobulin (Ig) isotypes in the body are IgA, which is the predominant immunoglobulin isotype of the mucosa and is powerfully induced by the commensal microbes in the intestine. MacPherson and Uhr (2004) illustrated the importance of the mucosal immune system. As an example, in germ-free mice, Peyer’s patches are hypoplastic, IgA-producing plasma cells and lamina propria T cells are underdeveloped and spleen and lymphatic nodes are untextured; however, this condition is corrected in only a few weeks by contact with commensal microbes.

The duration and frequency of infectious diarrhoea in children are significantly reduced by *Lactobacillus rhamnosus* GG (Van Niel, Feudtner, Garrison, & Christakis, 2002). Feeding a diet supplemented with *Enterococcus faecium* or a combination of *E. faecium* and different *Lactobacillus* strains also significantly reduces postweaning diarrhoea in piglets (Büsing & Zeyner, 2015; Giang, Viet, Ogle, & Lindberg, 2010; Szabo et al., 2009; Taras, Vahjen, Macha, & Simon, 2006; Vrotniakienė & Jatkauskas, 2013; Zeyner & Boldt, 2006). In addition, administration of *E. faecium* reduces and shortens Rotavirus shedding in piglets (Kreuzer et al., 2012). Other studies in pigs treated with *E. faecium* and challenged with *Salmonella Typhimurium* DT104 demonstrated that the excretion of *Salmonella* in faeces and the colonisation of organs increase with no severe clinical signs of salmonellosis, although treated pigs have an earlier and more intense development of humoral immunity (Simon, 2010; Szabo et al., 2009). In calves, the administration of viable *Escherichia coli* strain Nissle 1917 has a clear beneficial effect on the prophylaxis and treatment of neonatal diarrhoea (von Buenau et al., 2005).

However, adverse effects of probiotic use also occur in studies with other animals. Cilieborg et al. (2011) showed an increased number of *E. faecium*-treated piglets clinically affected by necrotising enterocolitis. Similarly, Mafamane et al. (2011) and Scharek et al. (2005) found a significant decrease in CD8+ T cells in the epithelium of piglets treated with *E.*

*faecium*. Therefore, the probiotic-treated piglets suffered from a more severe infection with *Salmonella Typhimurium* DT104.

In equines, the effects of probiotic strains are not yet well investigated (for an overview see Julliand & Zeyner, 2013). Probiotic potential micro-organisms, such as *L. rhamnosus* strain GG, *Escherichia coli* Nissle 1917 and distinct strains of *Saccharomyces cerevisiae*, are in the faeces of foals and adult horses, respectively, for more than 1 week after the last oral application, indicating transient colonisation without adverse health effects (Julliand & Zeyner, 2009, 2013; Weese, Anderson, Lowe, & Monteith, 2003; Zeyner, Albers, Schrödl, & Krüger, 2005; Zeyner et al., 2003).

Most studies with probiotics in horses and foals do not reveal any beneficial health effect (John et al., 2015; Kim, Morley, Traub-Dargatz, Salman, & Gentry-Weeks, 2001; Parraga, Spier, Thurmond, & Hirsh, 1997; Schoster et al., 2015; Zeyner et al., 2005). In contrast, even adverse consequences are recorded in some cases. Weese et al. (2004) isolated one strain of *Lactobacillus pentosus* WE7 from the gut of healthy horses and foals that showed antimicrobial properties in vitro and intestinal colonisation in foals and adult horses. In a subsequent study, this strain was administered to 2-to 4-day-old foals, which resulted in adverse effects with increased diarrhoea incidence and clinical signs of illness (Weese & Rousseau, 2005). Foals receiving potential probiotic bacteria (*L. rhamnosus* SP1, *L. rhamnosus* LRH19, *L. plantarum* LPAL, *L. plantarum* BG112 and *Bifidobacterium animalis lactis*) for 3 weeks starting on day 3 of life showed similar diarrhoea incidence to that of placebo group foals; however, treated foals were more likely to develop diarrhoea requiring veterinary intervention (Schoster et al., 2015).

When application is started immediately after birth, potential probiotic bacteria (Yuyama, Yusa, & Takai, 2004: equine-specific *Lactobacillus* preparation; Zeyner & Neuhaus, cited by Julliand & Zeyner, 2009: *E. coli* Nissle 1917) can significantly reduce diarrhoea incidence in foals, indicating a more positive response of the immature gut.

From this observation, we hypothesised that the treatment of foals with a combination of probiotic strains of *L. rhamnosus* and *E. faecium* given early after birth over a two-week period would prevent or mitigate foal heat diarrhoea. The aim of this study was to evaluate the effects of 2 weeks of oral treatment of foals with the combined probiotic strains *L. rhamnosus* (DSM 7133) and *E. faecium* (DSM 7134) when administration was started immediately after birth on diarrhoea events within the first 2 weeks of life and the overall development until an age of 8 weeks.



## 2 MATERIALS AND METHODS

For probiotic treatment, a combination of *L. rhamnosus* (DSM 7133) and *E. faecium* (DSM 7134) was used, which was previously authorised to stabilise the gut of calves (Commission Regulation EC No. 1288/2004). The Landeslabor Schleswig-Holstein permitted the oral administration to foals. The application of authorisation for animal experimentation in accordance with animal welfare law was granted (exemption granted on 29.03.2011 according to § 69 (1) LFGB from 01.09.2005, BGBl. I p. 2618, indication no. LSH 3212).

### 2.1 Animals

The trial was performed on a warm-blood stud farm in Schleswig-Holstein between April and August. During this period, all new-born foals were allocated alternately by date of birth into either placebo (PG) or treatment group (TG); the TG foals received the probiotic bacterial strains. Ultimately, 16 PG foals and 18 TG foals were involved in the study. The unequal final number of foals in the two groups resulted from the necessary elimination of animals, particularly due to inevitable antibiotic treatment following severe illness. All foals whose mares were treated with antibiotics within the first 2 weeks of life were excluded from this study (PG, n = 5; TG, n = 4). Foals that required antimicrobial treatment after the first 2 weeks of life were eliminated from the day of medication (PG, n = 0; TG, n = 3). In detail, four foals of the PG received systemic antibiotic treatment because of pneumonia (n = 3) and umbilical inflammation (n = 1) that started within the first 6 days of life and one mare because of postpartum endometritis (n = 1). One foal of this group suddenly died on day 14 of life but was included in the evaluation until that day. In the TG, one mare was medicated because of postpartum endometritis. Three foals were treated with systemic antibiotics at approximately day 6 of life because of suspected thrush (n = 1), pneumonia (n = 1) and umbilical inflammation (n = 1). Three other foals received antibiotics due to pneumonia on days 40, 42 and 49 of life. No foal received antibiotic medication because of diarrhoea.

### 2.2 Administration of placebo and probiotic preparation

Immediately after birth and always before the first colostrum intake, the foals received 3 ml of either a pasty placebo (carrier substances of the treatment preparation: sunflower oil, palm fat and whey powder) or the treatment preparation with  $1.05 \times 10^9$  cfu of *E. faecium* (DSM 7134) and  $4.50 \times 10^8$  cfu of *L. rhamnosus* (DSM 7133) via a syringe directly into the

mouth. This treatment was continued every 24 hr over an entire period of 14 days. The probiotic product applied in this study passed through a quality control and was stored at refrigerator temperature before use, based on the manufacturer’s data.

### 2.3 Housing systems

Pregnant mares were separated and housed in individual boxes several days before the expected date of birth. The mares had access to an outdoor paddock for a few hours every day. After foaling, the mare-foal pairs were kept in the individual boxes. From 5 to 10 days after foaling, each mare-foal pair had access to pasture for at least 6 hr a day (Table 1.1). On pasture, the mare-foal pairs were grouped together with up to 8 other mare-foal pairs from the corresponding treatment group (i.e., placebo or treatment). From an age of 2–3 weeks, these groups of mares and foals were transferred into group housing in big pens. The pens were half-roofed, separated by iron rods, with straw bedding, and the outer area was covered with sand. The boxes and the pens were spread with straw daily and mucked out completely every 2 to 3 months. Before mares were brought into new individual boxes, the boxes were superficially mucked out, spread with new straw, and the walls were disinfected with a 2% solution of Wofasept® (Kesla Pharma Wolfen GmbH, Bitterfeld-Wolfen, Germany). When the foals were 5–6 weeks old, the mare-foal pairs were permanently turned out on pasture within groups of the corresponding treatment (i.e., placebo or treatment). During the entire study, no contact, either direct or indirect (e.g., through feedstuff or material from the bedding), occurred between foals of different groups.

**Table 1.1.** Number of foals per group on separated meadows (labelled 1-5) from day 5-10<sup>a</sup>.

Meadow	Placebo group	Treatment group
1	8	
2	8	
3		6
4		6
5		6

<sup>a</sup>Meadows 1 and 2 were strictly separated from meadows 3 to 5 so that the foals of both groups did not have any contact.

## 2.4 Feeding

Pregnant and lactating mares were fed twice daily. The daily ration consisted of 4 kg of crushed oats, 2 kg of a pelleted mixed feed (Pferdefutter Energy, Raiffeisen HaGe Nord AG, Reinfeld, Germany) and approximately 6 kg of haulage. Proximate nutrients were analysed according to Naumann and Bassler (1976). Nutrient contents in the feedstuffs are given in Table 1.2. The foals had access to the mares feed. On permanent pasture, mares and foals received no concentrates but obtained minerals from licking bowls (Horsal®; H. Wilhelm Schaumann GmbH, Pinneberg, Germany; 15 kg for 8 mares every 2 weeks).

**Table 1.1.** Analyzed content of proximate nutrients of the used feedstuffs (DM, in g/kg; proximate nutrients in g kg<sup>-1</sup> DM)

feedstuff	DM	CA	CP	AEE	CF	NDF	ADF	ADL	sugar
oats grain	887	24	129	58	84	223	93	27	18
haylage	881	65	120	18	337	640	349	43	109
compounded feed	886	82	126	34	72	213	82	17	45

AEE, acid ether extract; ADF, acid detergent fiber; ADL, acid detergent lignin; DM, dry matter; CA, crude ash; CP, crude protein; NDF, neutral detergent fiber.

## 2.5 Healthcare routine around foaling

Immediately after birth, the foals were examined for vitality and maturity using the “Gießener Vorsorgeschema” I and II (Bostedt, Hospes, & Herfen, 1997). Part I of this scoring system evaluates the lying position, respiration, rising attempts and first udder contact of the neonate at different time points within the first 60 min after birth. Part II scores standing ability, body temperature, excretion of meconium, urination, respiration and contact to the dam within the 6th and 24th hour of life. On the basis of these observations, the foals were classified by scores into three categories: 1 = “vital and normally developed”; 2 = “at risk of disease”; and 3 = “at high risk of disease.”

The colostrum quality of all mares was evaluated by an estimate of the concentration of IgG using a hand-refractometer (MHRB-32 ATC; Gro.-und Einzelhandel Müller GmbH, Erfurt, Germany) with degrees in brix as the unit of measurement. Brix units (%) were

converted to IgG concentrations (g/L) according to the values of Knottenbelt (2004). This calculation was performed before the first udder contact of the foal. When brix values were measured at less than 19%, indicating an IgG concentration below 50 g/L colostrum, the foal in question received an additional amount of 400–500 ml of high-quality colostrum from the stocks own colostrum bank.

When a foal did not ingest colostrum from the mare by itself within the first 3 hr after birth, the foal received 400–500 ml of colostrum milked from the own mother in a bottle.

Between 6 and 24 hr after birth, all foals received an injection with the para-immunity inducer Zylexis (Pfizer GmbH, Berlin, Germany).

The mares were dewormed one day after foaling with ivermectine (Eraquell®; Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Germany), and all foals at an age of 10 days and again at 6 weeks of age received fenbendazol (Panacur®; Intervet Germany GmbH, MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Germany).

## 2.6 Health control including diarrhoea events and growth of the foals

All foals underwent general clinical examinations by a veterinarian involved in the study. Foals were examined daily within the first 14 days of life and then were examined clinically once a week from day 15 to 56. In this process, the faeces consistency (diarrhoea score), the behaviour, the skin turgor and the nutritional condition were assessed. The scores graduated from 1 to 5 for faeces consistency and the nutritional condition were assessed independently from one another (Table 1.3). A faeces consistency score (FCS) equal to three or lower defined diarrhoea. The skin turgor was recorded with a pinch of skin fold on the side of the neck and counting the seconds until the fold disappeared. The body temperature was measured rectally, the lungs and the heart were auscultated, and the umbilicus and joints controlled. The foals were checked for nasal discharge, injuries or swellings.

The body height of the foals was measured via a measuring tape on the 1st, 14th and 56th day of life. The measuring tape was fixed on the ground directly behind the distal limb of the foal and applied to the highest position at the withers.

**Table 1.2.** Scoring system for faeces consistency, behavior, skin turgor and nutritional condition

score	faeces consistence <sup>1</sup>	behaviour	skin turgor	nutritional condition
1	watery	comatose	> 4 s	extremely emaciated
2	soup-like	apathetic	4 s	ribs are easily to see
3	thin-mushy	somnolent	3 s	rib contour slightly shining through
4	mushy-pasty	weak	2	ribs not to see, but easy to touch
5	formed	attentive	≤ 1	thick fatty layer on the ribs

<sup>1</sup> scores ≤ 3 were classified as diarrhoea

## 2.7 Feed sampling and analyses

Throughout the entire study, feed samples were collected frequently and subsamples pooled into one sample for later laboratory analyses. Feed analyses were performed according to the German key book for feed analysis (VDLUFA, 2012). In detail, the following methods were applied: dry matter (method no. 3.1), crude ash (method no. 8.1), crude protein (method no. 4.1.1), acid ether extract (method no. 5.1.2), crude fibre (method no. 6.1.2), neutral detergent fibre (method no. 6.5.1), acid detergent fibre (method no. 6.5.2), acid detergent lignin (method no. 6.5.3) and sugar (method no. 7.1.2).

## 2.8 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS statistical software package for windows (SPSS 20.0; Chicago, IL, USA). Chi-square tests ( $\chi^2$  test) were applied to analyse differences for the traits based on numbers and scoring systems between experimental groups within different time points. The means of the withers height at individual time points of the study and withers height gains within individual periods of time of the two groups were compared by Wilcoxon tests. Differences of means were considered significant when p-values were less than 0.05.

### 3 RESULTS

#### 3.1 Vitality of the neonates

According to the “Gießener Vorsorgeschema,” 15 of the 16 (94%) PG foals were classified as “vital and normally developed.” One foal could not stand steadily within 2 hr after birth and was assessed “at risk of disease” but subsequently showed normal development. In the TG, all 18 foals were classified as “vital and normally developed.”

#### 3.2 Colostrum intake and colostrum quality

All foals suckled spontaneously within 3 hr after birth. The mean of brix units in the colostrum was  $25 \pm 5.0\%$  and  $27 \pm 4.8\%$  in the PG and TG respectively. The colostrum of three PG mares (3/16) could not be measured because of uncooperative behaviour during milking of the mares. One PG mare and six TG mares provided colostrum of very good quality (brix units indicated  $>80$  g/L IgG). Four PG mares and two TG mares had colostrum of borderline quality (brix units indicated  $\leq 50$  g/L IgG). Two PG foals required additional high-quality colostrum from the stocks colostrum bank because of the very low quality of their dams' colostrum.

#### 3.3 Diarrhoea

Occurrence of diarrhoea was spread over the first 2 weeks of life with first peaks at approximately day 9 and 3 of life in PG and TG foals respectively (Figure 1.1). Diarrhoea occurred in 94% of foals in both groups at least once during the first 2 weeks of life. During the first and second week of life, 19% and 94% of the PG foals but 61% ( $p < 0.05$ ) and 89% of the TG foals developed diarrhoea respectively (Table 1.4, Figure 1.1). For all foals, in week 1 of life, one individual diarrhoea period was 1.3 days shorter in the PG than that in TG foals ( $0.3 \pm 0.8$  and  $1.6 \pm 1.4$  days, respectively,  $p < 0.05$ ; Figure 1.2). In week 2 of life, one diarrhoea event was longer than that in week 1 of life, but the difference between PG and TG foals was not significant ( $3.0 \pm 1.5$  and  $3.7 \pm 1.6$  days, respectively,  $p > 0.05$ ; Figure 1.2).

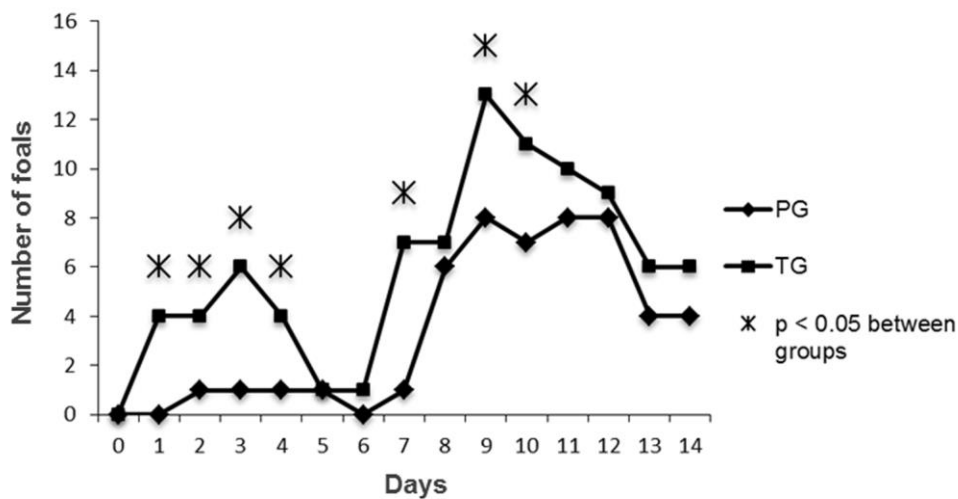
Combining all foals in weeks 1 and 2, a diarrhoea event was 1.9 days longer in the TG than that in the PG ( $5.2 \pm 2.0$  and  $3.3 \pm 1.5$  days, respectively,  $p < 0.05$ ). In foals suffering from diarrhoea, the diarrhoea score was  $2.4 \pm 0.4$  and  $2.5 \pm 0.5$  for PG and TG foals, respectively, with no difference between groups ( $p > 0.05$ ; Figure 1.3). Within the first 2 weeks of life, 33% of PG foals developed two episodes of diarrhoea ( $1.3 \pm 0.5$  periods) compared with 65% of TG foals ( $2.1 \pm 1.0$  periods) with more than one and up to four events of diarrhoea ( $p < 0.05$ ).

Colostrum quality based on the estimated IgG content was clearly not related to the occurrence or severity of diarrhoea events.

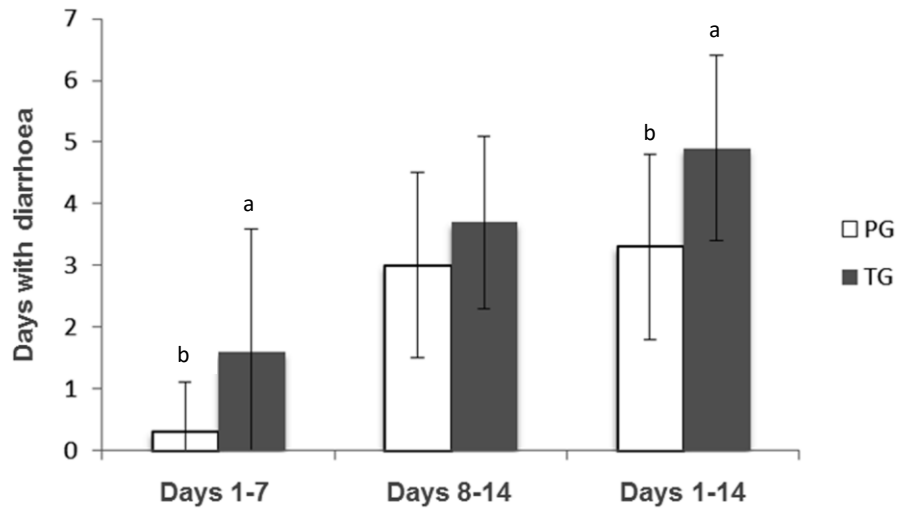
**Table 1.3.** Mean number of days with diarrhoea within the first two weeks of the placebo group (n = 15) and treatment group (n = 17)

day of life	placebo group	treatment group
1 – 7	0.3 ± 0.8 <sup>b</sup>	1.6 ± 1.4 <sup>a</sup>
8 - 14	3.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	3.7 ± 1.6 <sup>a</sup>

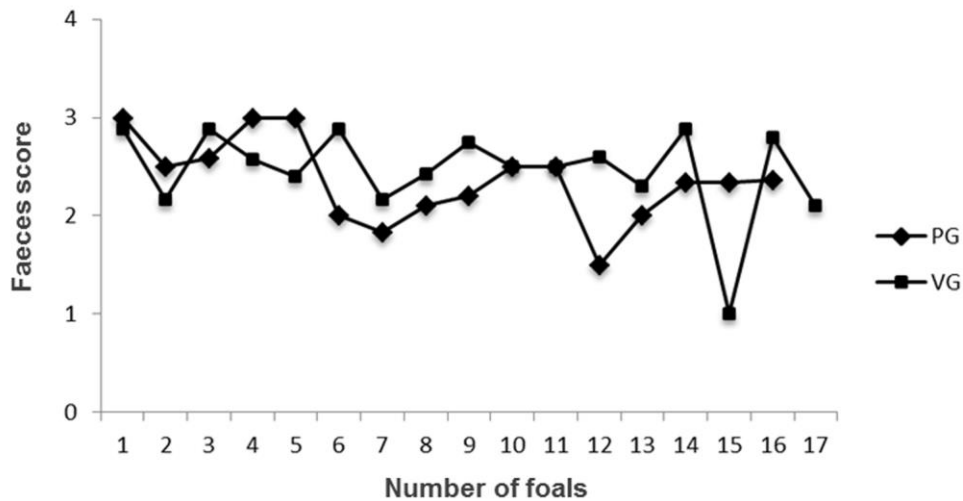
<sup>ab</sup> Different superscripts within one row indicate significant different means (p < 0.05)



**Figure 1.1.** Number of foals per group (PG: n = 15; TG: n = 17) with diarrhoea during the first 14 days of life.



**Figure 1.2.** Average number of days with diarrhoea per group within the first, second and first two weeks of life. Different letters indicate significant differences in means between groups ( $p < 0.05$ ).

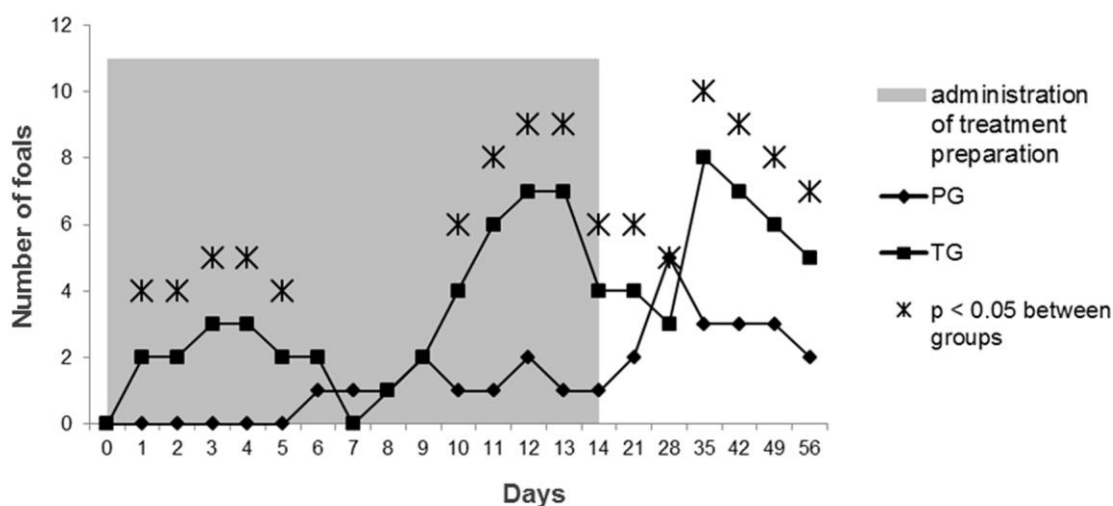


**Figure 1.3.** Average faeces consistency score (FCS) per group and day over the first two weeks of life with only foals suffering from diarrhoea taken (FCS < 3) into account.



### 3.4 Results of pulmonary auscultation

Foals were classified as respiratory conspicuous when slightly pathologic respiratory sounds were observed by auscultation for at least three consecutive days or a moderate pathologic respiratory sound was heard for at least one day. These diagnostic findings indicated a slightly present or beginning lung infection. Within the first 2 weeks of life, one of the PG foals and five of the TG showed respiratory conspicuous signs. From day 15 to 56 of life, one of the PG foals and five of the TG foals were classified as respiratory apparent. From day 1 to 14 of life, no foal in the PG and three foals in the TG were detected with tough lung sounds. During the entire study, 2/16 (13%) of the PG foals and 7/18 (39%) of the TG foals were respiratory conspicuous ( $p < 0.05$ ). A statistically significant higher number of foals in the TG showed apparent pathologic respiratory sounds during the first 2 months of life, except for day 28 when the number of respiratory apparent foals was higher in the PG ( $p < 0.05$ ; Figure 1.4). No relation was detected between respiratory signs and colostrum quality. However, within the first 2 weeks of life, the number of foals with pathologic respiratory sound tended to coincide with that suffering from diarrhoea.



**Figure 1.4.** Whole number of foals with noticeable lung examination results per group within the first 56 days of life.

### 3.5 Nutritional condition

One PG foal and two TG foals were born with a nutritional score of 3 and reached the score 4 only at days 3, 4 (PG) and 5 (TG) of life. A nutritional condition of score 4 was observed in 13/16 PG foals and 15/18 TG foals. Two of the PG foals and one of the TG foals had a score of 5 from week 5 and week 8 of life on respectively.

### 3.6 Behaviour

No difference in behaviour was observed between the clinically inconspicuous foals of the two groups. The behaviour was always attentive. The foals detected with a weak behaviour (very calm behaviour, slow reaction, frequent lying) simultaneously showed clear symptoms of disease (less appetite, fever, nasal discharge, cough, dyspnoea).

### 3.7 Withers heights

No differences in withers heights or withers heights gain were detected between foals of the two groups during individual time segments of the study or for the entire study period (Table 1.5). Within the first 2 weeks of life, the PG foals with the fewest days with diarrhoea (3.6 days) tended to grow faster than those TG foals with a clearly longer period of time suffering from diarrhoea (5.2 days).

**Table 1.4.** Mean withers height at birth of placebo group (n = 16) and treatment group (n = 18) foals and height growth until an age of 56 days (in cm).

group	withers height <i>post natum</i>	withers height gain		
		d 1 - 14	d 14 - 56	d 1 - 56
placebo	111 ± 4.99	7 ± 2	11 ± 2.3	19 ± 2.5
treatment	111 ± 3.93	7 ± 2	11 ± 2.7	19 ± 2.5

## 4 DISCUSSION

Corresponding to the well-known phenomenon called “foal heat diarrhoea,” the highest incidence of diarrhoea in the two groups in the present study occurred at approximately nine to eleven days of life. Although no difference was detected in the severity of diarrhoea

according to the FCS between the groups, the number of foals suffering from diarrhoea and the occurrence of consecutive diarrhoea events in weeks one and two were remarkably higher in foals treated with the combination of probiotic strains of *L. rhamnosus* and *E. faecium* than in the foals of the PG. A clearly different result from that hypothesised. The inappropriate choice of probiotics, dosage or timing might explain these unfavourable effects.

Schoster et al. (2015) found similar results reflecting adverse effects of probiotics in foals in a clinical study in which probiotic treatment of foals also resulted in increased emergence of diarrhoea. Detrimental effects are also observed in foals receiving probiotic strains (*L. pentosus* WE 7) previously isolated from the horses' gut and tested as helpful against pathogens in vitro (Weese & Rousseau, 2005). In these cases, the absence of beneficial effects and, particularly, the detrimental reactions are difficult to explain because this type of adverse immune reaction is expected from non-host-specific strains and not those isolated from the target species. However, efficacious probiotics isolated from the same species as that of the target might better survive gastrointestinal transit to colonise the intestinal tract (Gibson & Fuller, 2000). This assumption is confirmed by other studies; for example, Chung et al. (2012) colonised germ-free mice with mouse or human microbiota and showed that only a species-specific microbiota sufficiently induced host immune maturation. Furthermore, the probiotic potential yeast *Kazachstania slooffiae*, isolated from the porcine gut, was given orally to weaned piglets, and the yeast colonised the intestine after only one supplementation (Urubschurov et al., 2017) and elevated growth performance under practical housing conditions (von Langendorff, Wensch-Dorendorf, Schliffka, Hanczakowska, & Zeyner, 2017). In foals, the use of host-specific probiotic lactobacilli caused no adverse effects and even improved growth and intestinal health (Yuyama et al., 2004). Because of the contradictory literature results, whether the choice of probiotic strains not isolated from the host in the current study could explain the measured adverse effect on diarrhoea incidence is difficult to determine.

At present, information is lacking on an adequate dosage of probiotics in foals and the suitable age to begin application. In piglets, Li et al. (2012) showed a high dose of *L. rhamnosus* was associated with diarrhoea. In foals, Weese et al. (2003) reported colonisation of the gut following administration of  $10^{10}$ – $10^{11}$  cfu of *L. rhamnosus* strain GG with no negative effects. Furthermore, Yuyama et al. (2004) demonstrated positive results of the administration of  $1.0$ – $4.0 \times 10^{10}$  cfu of a mix of five different *Lactobacillus* strains to foals. Zeyner and Neuhaus (cited from Julliand & Zeyner, 2009) observed reduced diarrhoea incidence in foals following daily application of  $1.5 \times 10^9$  cfu of *E. coli* Nissle 1917. To our knowledge, the administration

of *E. faecium* to foals has not been previously reported. Therefore, the chosen dosage in the present study was even lower than that applied to other species in former studies (Büsing & Zeyner, 2015; Li et al., 2012; Zeyner & Boldt, 2006).

As inferred from Yuyama et al. (2004) and Zeyner & Neuhaus (cited from Julliard & Zeyner, 2009), probiotic administration in this study started immediately after birth, to give probiotic bacteria the best possible chance to colonise a nearly untouched intestine. However, this early application might have led to bacterial overgrowth of the immature intestine and contributed to elevated diarrhoea incidence in the first week of life. Wagner, Warner, Roberts, Farmer, and Balish (1997) found lethal effects of *Lactobacillus* isolates administered to neonatal mice, whereas adult mice showed no negative effects. This result suggests a remarkable difference in the effect of probiotic strains used in adults and neonates and interactions with both.

Lactic acid bacteria show enormous metabolic activities in the digestive process. Therefore, targeted manipulation of the metabolic pathways by changing the composition of the intestinal microbiota with probiotics could lead to potentially detrimental consequences for the organism (Ishibashi & Yamazaki, 2001). Nafday et al. (2004) demonstrated that short-chain fatty acids introduced intraluminally into the proximal colon cause injury to colonic mucosa in new-born rats. This type of mechanism might explain the incidence of diarrhoea without clinical signs of disease that was observed in the present study. Furthermore, the young foals apparently benefited less from the oral administration of lactic acid bacterial species, or at least the strains selected in this study, than other farm animals such as pigs. Some species of the *Enterococcus* genus can be harmful, which explains why these species may play a role as nosocomial pathogens and show antibiotic resistance. These bacterial strains have high genetic variability with possible acquisition of pathogenic potential through horizontal gene transfer in strains used as probiotics (Jores & Wieler, 2003; Vancanneyt et al., 2002). This observation shows that probiotic bacteria are a potential risk to cause adverse effects, but these effects are very rarely connected to enteric disruptions, as was apparent in the present study.

One characteristic among the criteria used to select functional probiotic microbes is the ability of a micro-organism to strongly adhere to the intestinal mucosa in order to colonise the host's intestine. Nevertheless, such strong adherence may also lead to increased pathogenicity, because this property is an important requirement for virulence (Apostolou et al., 2001; Boyle, Robins-Browne, & Tang, 2006; Jett, Huycke, & Gilmore, 1997). Therefore, strains used as probiotics must have no characteristics that indicate virulence because of the potential to act as opportunistic pathogens, at least in non-immunocompetent patients.

The health status regarding respiratory conspicuousness differed widely between the two groups in the present study. As the number of born foals increased, the incidence of respiratory signs increased, which was a finding more likely associated with the increase in infectious pressure resulting from the increasing number of foals than the application of the probiotic.

The withers height measured with a measuring tape can result in higher values than those measured by a measuring stick, dependent on the nutritional condition of the foal (Mack, 2007). Therefore, the data obtained in this study require careful assessment, although we did not find obvious differences between the two groups in the mean score for nutritional condition or the trunk circumference.

Finally, on stud farms suffering from infectious diarrhoea, which was not the case in this study, probiotic treatment may first require the opportunity and time to develop a positive effect. This possibility is supported by studies with probiotic-treated piglets (Büsing & Zeyner, 2015; von Langendorff et al., 2017; Zeyner & Boldt, 2006).

The results of the present study revealed that the supplementation of *E. faecium* and *L. rhamnosus* in the used dosage did not reduce foal diarrhoea. Weese and Rousseau (2005) and Schoster et al. (2015) found similar unfavourable results previously in foals receiving probiotic potential lactobacilli and bifidobacteria strains.

Whether the dosage was inadequate, the early application was inappropriate or the probiotic strains caused the detrimental effect is unclear. Identifying the mechanisms that caused the unfortunate results in the foals of the current study and determining whether other probiotic strains or application to older individuals would improve results are worthwhile for future investigations.

#### ORCID

V. Urubschurov <http://orcid.org/0000-0003-3105-0214>

A. Zeyner <http://orcid.org/0000-0001-5901-1394>

## 5 REFERENCES

Apostolou, E., Kirjavainen, P. V., Saxelin, M., Rautelin, H., Valtonen, V., Salminen, S. J., & Ouwehand, A. C. (2001). Good adhesion properties of probiotics: A potential risk for

bacteremia? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 31, 35–39.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2001.tb01583.x>

Bostedt, H. (2006). Erkrankungen des neugeborenen Fohlens. In O. Dietz, & B. Huskamp (Eds.), *Handbuch pferdepraxis*, 3rd ed. (pp. 132–162). Stuttgart, Germany: Enke Verlag.

Bostedt, H., Hospes, R., & Herfen, K. (1997). Programm zur frühzeitigen Erkennung von Krankheitszuständen bei Fohlen in den ersten 24 Lebensstunden. *Tierärztliche Praxis*, 25, 594–597.

Boyle, R. J., Robins-Browne, R. M., & Tang, M. L. (2006). Probiotic use in clinical practice: What are the risks? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1256–1264.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1256>

Büsing, K., & Zeyner, A. (2015). Effects of oral *Enterococcus faecium* strain DSM 10663 NCIMB 10415 on diarrhoea patterns and performance of sucking piglets. *Beneficial Microbes*, 6, 41–44. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0008>

Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Edelman, S. M., Troy, E. B., ... Kasper, D. L. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*, 149, 1578–1593. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.037>

Cilieborg, M. S., Thymann, T., Siggers, R., Boye, M., Bering, S. B., & Jensen, B. B. (2011). The incidence of necrotising enterocolitis is increased following probiotic administration to preterm pigs. *The Journal of Nutrition*, 141, 223–230. <https://doi.org/10.3945/jn.110.128561>

Commission Regulation EC No 1288/2004 of 14 July 2004 Concerning the permanent authorisation of certain additives and the provisional authorisation of a new use of an additive already authorised in feedingstuffs. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Retrieved from [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)

Giang, H. H., Viet, T. Q., Ogle, B., & Lindberg, J. E. (2010). Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with potentially probiotic complexes of lactic acid bacteria. *Livestock Science*, 129, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.01.010>

Gibson, G. R., & Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition*, 130(2S Suppl.), 391S–395S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.391S>

Haas, S. D., Bristol, F., & Card, C. E. (1996). Risk factors associated with the incidence of foal mortality in an extensively managed mare herd. *Canadian Veterinary Journal*, 37, 91–95.

Ishibashi, N., & Yamazaki, S. (2001). Probiotics and safety. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 465–470. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.465s>

Jett, B. D., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1997). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 462–478.

John, J., Rödiger, K., Aldaher, N., Krüger, M., Coenen, M., & Vervuert, I. (2015). Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* supplementation on the occurrence of diarrhea and faecal microflora characteristics in foals. *BMC Veterinary Research*, 11, 34. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0355-3>

Jores, J., & Wieler, L. H. (2003). Populationsgenetische Untersuchung bei Bakterien und deren mögliche Anwendung bei der Risikoabschätzung von Probiotika in der Tierproduktion. *Lohmann Information*, 2, 3–7.

Julliand, V., & Zeyner, A. (2009). The pros and cons of probiotics. In N. E. Robinson, & K. A. Sparyberry (Eds.), *Current therapy in equine medicine* (6th revised ed., pp. 83–86). St Louis, MI: Saunders Elsevier.

Julliand, V., & Zeyner, A. (2013). Dietary strategies for optimizing gastrointestinal health: An update on pre- and probiotics. In *Horse health nutrition* (6th ed., pp. 75–84). Belgium: Proc. 6th European Equine Health & Nutrition Congress.

Kim, L. M., Morley, P. S., Traub-Dargatz, J. L., Salman, M. D., & Gentry-Weeks, C. (2001). Factors associated with Salmonella shedding among equine colic patients at a veterinary teaching hospital. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218, 740–748. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.740>

Knottenbelt, D. C. (2004). *Neonatologie der pferde*, 1st ed. (p. 472). München, Germany: Urban & Fischer Verlag.

Kreuzer, S., Janczyk, P., Assmus, J., Schmidt, M. F., Brockmann, G. A., & Nockler, K. (2012). No beneficial effects evident for *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in weaned pigs infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 4816–4825. <https://doi.org/10.1128/AEM.00395-12>

Kuhl, J., Winterhoff, N., Wulf, M., Schweigert, F. J., Schwendenwein, I., Bruckmaier, R. M., ... Aurich, C. (2011). Changes in faecal bacteria and metabolic parameters in foals during the first six weeks of life. *Veterinary Microbiology*, 151, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.017>

Li, X. Q., Zhu, Y. H., Zhang, H. F., Yue, Y., Cai, Z. X., Lu, Q. P., ... Wang, J. F. (2012). Risks associated with high-dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* model of piglet diarrhoea: Intestinal microbiota and immune imbalances. *PLoS ONE*, 7, e40666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.004066622848393>

Mack, J. (2007). Einfluss des Kraftfutterangebots auf Parameter des Wachstums bei Warmblutfohlen. Diss med vet, Ludwig-Maximilians-Universität München 2007.

MacPherson, A. J., & Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303, 1662–1665. <https://doi.org/10.1126/science.1091334>

Mafamane, H., Szabo, I., Schmidt, M. F., Filter, M., Walk, N., & Tedin, K. (2011). Studies on the effect of an *Enterococcus faecium* probiotic on T-cell populations in peripheral blood and



intestinal epithelium and on the susceptibility to Salmonella during a challenge infection with Salmonella Typhimurium in piglets. *Archives of Animal Nutrition*, 65, 415–430. Epub 2012/01/20. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2011.623351>

Morley, P. S., & Townsend, H. G. (1997). A survey of reproductive performance in thoroughbred mares and morbidity, mortality and athletic potential of their foals. *Equine Veterinary Journal*, 29, 290–297. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb03126.x>

Nafday, S. M., Chen, W., Peng, L., Babyatsky, M. W., Holzman, I. R., & Lin, J. (2004). Short-chain fatty acids induce colonic mucosal injury in rats with various postnatal ages. *Pediatric Research*, 57, 201–204.

Naumann, C., & Bassler, R. (1976). Die chemische untersuchung von futtermitteln. In C. Naumann, & R. Bassler (Eds.), *VDLUFA-methodenbuch*. Darmstadt, Germany: VDLUFA-Verlag.

Parraga, M. E., Spier, S. J., Thurmond, M., & Hirsh, D. (1997). A clinical trial of probiotic administration for prevention of Salmonella shedding in the postoperative period in horses with colic. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11, 36–41. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1997.tb00071.x>

Scharek, L., Guth, J., Reiter, K., Weyrauch, K. D., Taras, D., & Schwerk, P. (2005). Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 105, 151–161. Epub 2005/03/31. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.12.022>

Schoster, A., Staempfli, H. R., Abrahams, M., Jalali, M., Weese, J. S., & Guardabassi, L. (2015). Effect of a probiotic on prevention of diarrhea and *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* shedding in foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29, 925–931. <https://doi.org/10.1111/jvim.12584>

Simon, O. (2010). An interdisciplinary study on the mode of action of probiotics in pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 19, 230–243. <https://doi.org/10.22358/jafs/66284/2010>

Steiner, N., & Lindner, A. (1993). Reproduction data in breeding mares, diseases and losses among suckling foals and preventive husbandry in German stud farms. *Tierärztliche Praxis*, 21, 316–322.

Szabo, I., Wieler, L. H., Tedin, K., Scharek-Tedin, L., Taras, D., Hensel, A., ... Nöckler, K. (2009). Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. *Applied Environmental Microbiology*, 75, 2621–2628. <https://doi.org/10.1128/AEM.01515-08>

Taras, D., Vahjen, W., Macha, M., & Simon, O. (2006). Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *Journal of Animal Science*, 84, 608–617. <https://doi.org/10.2527/2006.843608x>

Urubschurov, V., Büsing, K., Freyer, G., Herlemann, D., Souffrant, W., & Zeyner, A. (2017). New insights into the role of the porcine intestinal yeast, *Kazachstania slooffiae*, in intestinal environment of weaned piglets. *FEMSA Microbiology Ecology*, 93(2), fiw245. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw245>

Van Niel, C. W., Feudtner, C., Garrison, M. M., & Christakis, D. A. (2002). *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: A meta-analysis. *Pediatrics*, 109, 678–684. <https://doi.org/10.1542/peds.109.4.678>

Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Björkroth, K. J., ... Holzappel, W. H. (2002). Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 1381–1391. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1381-1391.2002>

VDLUFA (2012). *Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch). Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.* Verband deutscher landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalten, VDLUFA, Vol. III. Darmstadt, Germany: VDLUFA Verlag.

von Buenau, R., Jaekel, L., Schubotz, E., Schwarz, S., Stroff, T., & Krueger, M. (2005). *Escherichia coli* strain Nissle 1917: Significant reduction of neonatal calf diarrhea. *Journal of Dairy Science*, 88, 317–323. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72690-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72690-4)

von Langendorff, C., Wensch-Dorendorf, M., Schliffka, W., Hanczakowska, E., & Zeyner, A. (2017). Untersuchungen an Absetzferkeln zur Wirkung einer oralen Gabe der im Schweinedarm endemischen Hefe *Kazachstania slooffiae* auf die Vitalität und zootechnische Parameter. 14. Tagung Schweine- und Geflügelernährung (Tagungsband). Lutherstadt Wittenberg: 21–23, November 2017, S. 217-219 (ISBN: 978-3-86829-891-8).

Vrotniakienė, V., & Jatkauskas, J. (2013). Effects of probiotics dietary supplementation on diarrhea incidence, fecal shedding of *Escherichia coli* and growth performance in post-weaned piglets. *Veterinarija ir Zootechnika*, 63, 85.

Wagner, R. D., Warner, T., Roberts, L., Farmer, J., & Balish, E. (1997). Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria. *Infection and Immunity*, 65, 3345–3351.

Weese, J. S., Anderson, M. E., Lowe, A., & Monteith, G. J. (2003). Preliminary investigation of the probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in horses: Fecal recovery following oral administration and safety. *Canadian Veterinary Journal*, 44, 299–302.

Weese, J. S., Anderson, M. E., Lowe, A., Penno, R., da Costa, T. M., Button, L., & Goth, K. C. (2004). Screening of the equine intestinal microflora for potential probiotic organisms. *Equine Veterinary Journal*, 36, 351–355.

Weese, J. S., & Rousseau, J. (2005). Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 2031–2034. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.2031>

Yuyama, T., Yusa, S., & Takai, S. (2004). Evaluation of a host-specific *Lactobacillus* probiotic in neonatal foals. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 2, 26–33.

Zeyner, A., Albers, N., Schrödl, W., & Krüger, M. (2005). Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in adult horses: Oral tolerance and presence of viable bacteria in the faeces. *Tierärztliche Praxis G*, 32, 82–83.

Zeyner, A., Albers, N., Schrödl, W., Vallentin, G., Fuhrmann, H., & Krüger, M. (2003). Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in adult horses: Tolerance and presence of viable bacteria in faeces. In R. Schubert, G. Flachowsky, G. Jahreis & R. Bitsch. *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier* (pp. 420–423).

Zeyner, A., & Boldt, E. (2006). Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90, 25–31. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2005.00615.x>

## IV PUBLIKATION II

Die folgende Publikation

**‘Effects of oral supplementation of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium* on the composition of the faecal microbiota of foals’**

wurde am 19. Februar 2019 von der Zeitschrift „Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition“ zur Veröffentlichung angenommen.

Article available online March, 10th 2019.

DOI: 10.1111/jpn.13079

J Anim Physiol Anim Nutr. 2019; 103(3):915-924.

Article ID: JPN13079

Article DOI: 10.1111/jpn.13079

Internal Article ID: 16407483

Article: Effect of oral supplementation of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium* on the composition of the faecal microbiota of foals

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition: <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.13079>

**Effect of oral supplementation of a preparation with *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 7133) and *Enterococcus faecium* (DSM 7134) on composition of the faecal microbiota of foals**

V.Urobschurov<sup>1\*</sup>, C. Stroebel<sup>2</sup>, E. Guenther<sup>2</sup>, K. Romanovski<sup>3</sup>, K. Buesing<sup>3</sup>, A. Zeyner<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Group Animal Nutrition, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany.

<sup>2</sup> Stülower Dorfstraße 1, Retschow OT Stülow, Germany.

<sup>3</sup> District Administration Vulkaneifel, Department 8: Veterinary Office and Agriculture, Daun, Germany.

Correspondence Vladimir Urobschurov, Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Department of Animal Nutrition, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Theodor-Lieser-Straße 11, 06120 Halle (Saale), Germany. Tel.:+49 (0) 345 55 22700; fax: +49 (0) 345 5527050; email: urubschurov@web.de

Keywords: PCR-DGGE; faeces; foals; gut microbiota; probiotics

Running head effect of probiotic treatment on the faecal microbiota

## ABSTRACT

Since establishment of the intestinal microbiota is very important to maintaining the host's health, scientists have been searching for agents which could positively influence or maintain the intestinal microbial balance. Effects of different probiotics on the intestinal microbiota in foals is nowadays largely unknown. Therefore, the aim of this study was to investigate whether supplementation of a preparation containing cells of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 7133) and *Enterococcus faecium* (DSM 7134) may influence the composition of the faecal microbiota of foals. A total of 34 newborn foals randomly assigned to 2 groups [placebo (PG, n = 16) and treatment group (TG, n = 18)] were used. From day 1 to 14, foals orally received 3 mL either of a preparation [ $1.05 \times 10^9$  CFU of *E. faecium* and  $4.50 \times 10^8$  CFU of *L. rhamnosus*] or placebo (carrier substances) once a day. Faeces was collected directly from the rectum immediately after birth (meconium), at 14 and 56 days of life. Samples of 12 foals per group were selected for microbiological analysis. DNA was extracted and used for polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and quantitative PCR. No DNA or amplicons were obtained from meconium samples. There were no differences in richness of bands and Shannon index of diversity regarding the *Clostridium* cluster XIVa between groups. But, cluster analysis and Principal Coordinate Analysis of DGGE data showed a clear effect of age. Five of thirty reamplified bands were identified to species level. Others were assigned either to family (mainly *Lachnospiraceae*) or genera level (*Akkermansia*). The bands related to *Akkermansia muciniphila* or *Akkermansia* spp. appeared almost in all DGGE profiles. Taken together, two-week supplementation of the preparation to foals had no significant impact on the composition of the faecal microbiota.

## 1 INTRODUCTION

At the time from birth to weaning, foals are particularly susceptible to respiratory diseases and frequent occurrence of diarrhea which is one of the major causes of morbidity and mortality in breeding of young horses (Magdesian, 2005). The etiology of diarrhea can be of different nature and is usually related to foals' age. Especially in the first two weeks of life, many foals develop diarrhea (known as "foal heat diarrhea") whose causes are not fully understood (Mallicote et al., 2012).

Establishment of the gastrointestinal microbiota has been considered as one of many factors that influence the development of diarrhea (Magdesian, 2005; Wohlfender et al., 2009). It is well known that the balance of the intestinal microbiota is very important to maintain host's health. Overgrowth of various causative agents (e.g. bacteria, viruses, parasites) could lead to diarrhea (Mallicote et al., 2012), while yeasts (at least in the first 15 days of age) do not seem to be a reason (Sgorbini et al., 2008). Some pathogens, however, can also be detected in healthy foals (Slovic et al., 2014). It is therefore often difficult to properly diagnose the cause of the disease. In addition, the fact that current knowledge of the intestinal microbiota in adult horses is very limited (Costa and Weese, 2012) and is even hardly examined in foals, complicates the understanding of ecology and physiology of the microbiota in the digestive tract.

Probiotics (live microorganisms), prebiotics (non-digestible food ingredients that promote the growth and/or activity of potentially favorable microorganisms) and synbiotics (a combination of both) could contribute to favorable modification of the "normal" intestinal microbiota. According to the regulation of the European Commission (EC, 2015), some strains of bacteria belonging to the genera *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Clostridium* and of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are allowed to be used as feed additives for piglets, calves and poultry in the EU. In equines, however, only three strains of *S. cerevisiae* for adult horse and none for foals have been authorized in the EU (EC, 2015). Furthermore, the effects of probiotics and prebiotics in horses have not been adequately studied up to now (reviewed by Juliand and Zeyner, 2013). Hence, there is a great demand in finding potential candidate microbes that could have a probiotic effect in the digestive tract of foals.

The probiotic bacteria *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus rhamnosus* are the most commonly studied lactic acid bacteria. Probiotic strains of these species are widely used for prevention or treatment of gastrointestinal diseases associated with diarrhoea in livestock and children (Franz et al., 2011; Taras et al., 2007; Vandenplas et al., 2015; Zeyner and Boldt, 2006). Recently, we reported a study (Stroebel et al., 2018) where a preparation with live cells



of probiotic strains *L. rhamnosus* (DSM 7133) and *E. faecium* (DSM 7134) were administered to foals orally once a day during the first 2 weeks of life. The supplementation of the preparation had rather undesired effects because the probiotic-treated foals suffered more frequently and for longer periods from diarrhea compared to placebo-treated foals. Moreover, the foals fed with probiotics have grown slightly slower than placebo animals. In this context it was interesting to explore how the intestinal microbiota has responded to the administration of these probiotics.

In the present study, polymerase chain reaction (PCR) - denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was applied to investigate the composition of the faecal microbiome in foals, and Real-Time quantitative PCR (qPCR) was used for the enumeration of bacteria from the *Clostridium coccooides* group. Both techniques are well established for the investigation on intestinal microbial communities (Earing et al., 2012; Grønvold et al., 2010; Janczyk et al., 2007; Pieper et al., 2010; Slovis et al., 2014; Urubschurov et al., 2015). The aim of this research was to investigate whether supplementation of a preparation containing cells of the probiotic strains *L. rhamnosus* (DSM 7133) and *E. faecium* (DSM 7134) may affect the composition of faecal microbiota of foals.

## 2 MATERIALS AND METHODS

The use of the combination of *L. rhamnosus* (DSM 7133) and *E. faecium* (DSM 7134) for oral administration to foals has been permitted by the Landeslabor Schleswig-Holstein (exemption granted on 29.03.2011 according to § 69 (1) LFGB from 01.09.2005, BGBl. I p. 2618, indication no. LSH 3212). The application of authorization for animal experimentation in accordance with animal welfare law was granted. The whole procedure of the experimental design, including results of diarrhea incidence, growth and health performance as routine foal and mare's examinations, is described in details by Stroebel et al. (2016). This manuscript will report on the operations concerning only microbiological analyzes of faeces.

### 2.1 Animals, housing and treatment

The study was performed on a warm-blood stud farm in Schleswig-Holstein between April and August. A total of 34 newborn foals randomly assigned to 2 groups [placebo (PG, n = 16) and treatment group (TG, n = 18)] were used. The foals orally received 3 mL of the treatment preparation [ $1.05 \times 10^9$  colony forming units (CFU) of *E. faecium* (DSM 7134) and  $4.50 \times 10^8$  CFU of *L. rhamnosus* (DSM 7133)] or of carrier substances without probiotics

(placebo). The treatment was done once daily from day 1 to 14 and started before the first colostrum intake. The foals were kept with mares in the beginning (5 -10d after foaling) in individual boxes and in big pens (up to 8 mares with foals per pen) from an age of 2 - 3 weeks, in both cases with access to pasture. When the foals were 5 - 6 weeks old, the mare-foal pairs were turned out on pasture permanently. During the whole study, there was no contact neither direct nor indirect (e.g. through the stuff or material from the bedding) between foals of different treatment groups.

## 2.2 Animals feeding

Pregnant and lactating mares were fed twice daily [per day: 4 kg of crushed oats, 2 kg of a pelleted mixed feed (Pferdefutter Energy, Raiffeisen HaGe Nord AG, Reinfeld, Germany) and approximately 6 kg of haylage]. Proximate nutrients of the feedstuffs are shown in Table 2.1. The foals had access to the mares feed. On permanent pasture, mares and foals received no concentrates, but had access to minerals from licking bowls (Horsal<sup>®</sup>, H. Wilhelm Schaumann GmbH, Pinneberg, Germany; 15 kg for 8 mares every 2 weeks).

**Table 2.1.** Calculated nutrients of the feedstuffs (g/kg DM).

Nutrients <sup>1</sup>	Oats	Haylage	Compounded feed
DM	887	881	886
crude ash	24	65	82
crude protein	129	120	126
crude fat	58	18	34
crude fibre	84	337	72
NDF	223	640	213
ADF	93	349	82
ADL	27	43	17
sugar	18	109	45

<sup>1</sup> the nutrients were analyzed according to Naumann and Bassler (1976). DM – dry matter, NDF - neutral detergent fiber, ADF - acid detergent fiber, ADL - acid detergent lignin

## 2.3 Faeces sampling

Immediately after birth, meconium was sampled, before an enema was administered. Furthermore, faeces were collected at the age of 14 and 56 days of life. All samples were taken

directly from the *ampulla recti* and stored at -18 °C until further analysis. For microbiological analysis, samples of 12 foals per group were selected according to the criteria i) no antibiotic treatment, neither in foals still in mares, and ii) sufficient amount of faeces samples on all dates.

#### 2.4 DNA isolation

Genomic DNA was extracted using innuSPEED Stool DNA Kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany) according to the manufacturer's instructions. Concentration of DNA was measured using Quant-iT™ dsDNA Broad-Range Assay Kit (Invitrogen, Darmstadt, Germany) on a Qubit® 1.0 Fluorometer (Invitrogen, Darmstadt, Germany). DNA was diluted with sterile PCR grade water to set up a working solution containing 5 ng DNA per µL.

#### 2.5 PCR and DGGE

The PCR-DGGE was performed as described in detail by Pieper et al (2008). Briefly, PCR products (V6-V8 variable regions of the 16S rDNA) were amplified using primer set S-D-Bact-0968-a-S-GC and SD Bact-1401-aA-17 (Nübel et al., 1996) and reagents from Analytik Jena [innuTaq DNA Polymerase (5U/µl), 10x PCR-Buffer (MgCl<sub>2</sub> 25 mM), dNTP Mix (12.5 mM)]. The amplicons were separated (16h at 85 V, 60 °C) by DGGE in a DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, Munich, Germany) with a vertical gradient 30 - 60% (42.16% urea and 40 % formamide in 100% denaturant). Gel were stained using SYBR-Gold and photographed in BioDocAnalyze digital gel documentation system (Biometra GmbH, Goettingen, Germany). After recording, the dominant bands were excised using sterile needles, reamplified and sequenced (Pieper et al., 2008).

#### 2.6 DGGE band identification and classification

Obtained sequences were checked for the presence of chimeras using DECIPHER's Find Chimeras web tool (Wright et al., 2012). Then they were compared with GenBank database on the website of "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) using the "Basic Local Alignment Search Tool search algorithm" (BLAST) (Altschul et al., 1997) and classified using naive Bayesian rRNA classifier version 2.10 (October 2014; confidence threshold = 80 %), available on the website of "Ribosomal Database Project" (RDP) (Wang et al., 2007). The sequences were deposited in GenBank under the accession numbers KT726876 - KT726905.

## 2.7 Real Time qPCR

Bacteria of the *Clostridium coccooides* group (also known as the *Clostridium* cluster XIVa) were quantified on a StepOnePlus Real-Time PCR System (v. 2.2, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) using the one point calibration method as described previously (Urubschurov et al., 2015). Genomic DNA of *C. clostridioforme* (NCTC 11224) was used as a calibrator. All samples including negative control were analyzed in triplicates. The reaction volume per well was 20  $\mu$ L containing SensiMix SYBR<sup>®</sup> Hi-ROX Kit (Bioline, Luckenwalde, Germany), 0.25  $\mu$ M of each primer [g-Ccoc-F and g-Ccoc-R (Matsuki et al., 2002)] and 2  $\mu$ L of the working solution. The qPCR program was set at 10 min at 95°C, 35 cycles of 95°C for 15 s, 52°C for 15 s, 72°C for 15 s, followed by a melt curve stage (0.5°C/s from 60°C to 95°C). The copy numbers were subsequently given as log copies per 10 ng DNA.

## 2.8 Statistical analysis

The DGGE profiles were analysed using BioNumerics software Version 5.0 (Applied Maths, Inc., Sint-Martens-Latem, Belgium). Cluster analysis was calculated on the basis of Dice (band-based) similarity coefficient and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The band matching data (classes, relative positions and intensity of bands) exported from BioNumerics was used for calculation of Shannon diversity index and richness (number of bands in a DGGE profile) by means of CANOCO 4.5 (Lepš and Šmilauer, 2003), and for Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the Bray-Curtis distance by means of PAST, v.3.0 (Hammer et al., 2001). All values were analyzed using a multifactorial model of ANOVA followed by post hoc analysis Tukey HSD test for unequal N with the software Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, USA). Differences between the factors group and age were considered significant if  $P < 0.05$ .

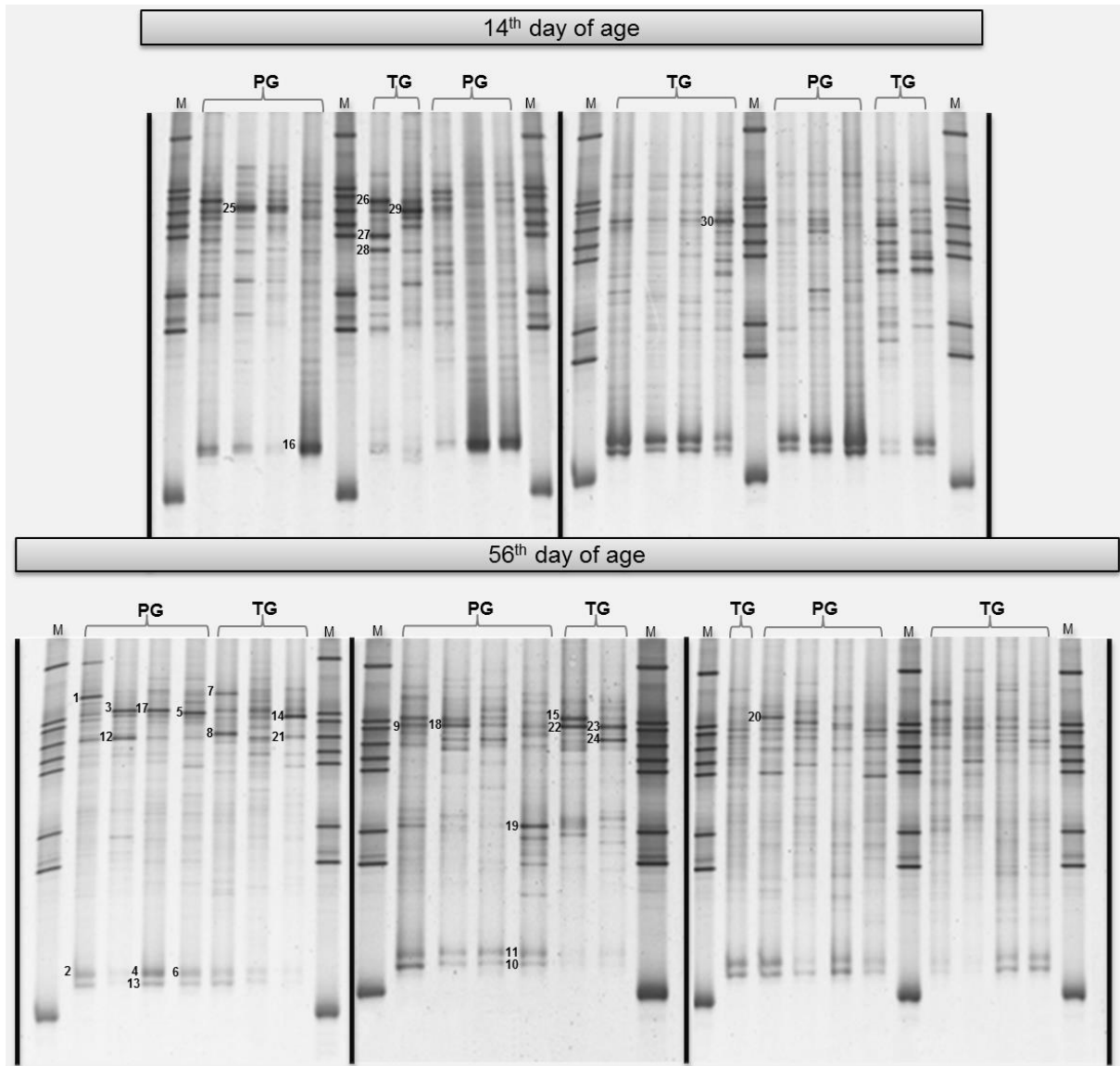
# 3 RESULTS

## 3.1 Analysis of DGGE profiles, qPCR

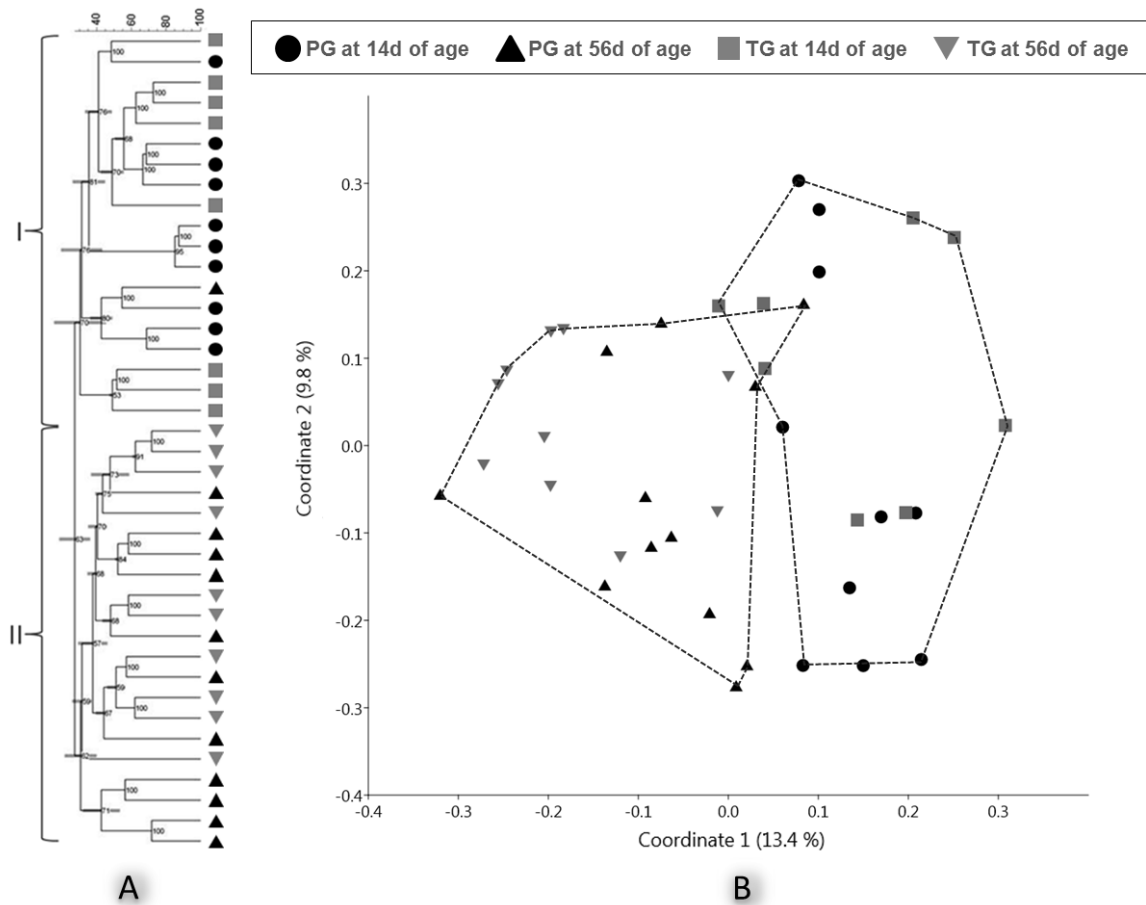
After two repetitions, low concentration of DNA could only be isolated in 9 of 24 studied meconium specimens. But, with used primers, no amplicons were amplified from these samples. Also, no clear DGGE bands could be obtained from 8 samples collected at 14d and 56d, so that they were not used for further analysis. DGGE gel images of other samples are shown in Figure 2.1.

The cluster analysis revealed that all samples were divided in two clusters depending on the age (Figure 2.2 A). Cluster I contained only samples from 14d with the exception of one sample and cluster II samples only from 56d. Furthermore, the samples of different groups formed a group-specific subcluster within each cluster. Similar results can be seen in the PCoA plot (Figure 2.2 B); the samples collected on different days were depicted mainly in separate areas.

Looking only at bacteria from the *Clostridium* cluster XIVa, there were no differences in richness and Shannon index, neither between groups or different days (Table 2.2). But, calculation of Dice coefficients showed that the similarity of DGGE profiles of PG decreased ( $P < 0.001$ ) from 14d to 56d (Table 2.2), whereas the similarity of DGGE profiles of TG tended to increase with age. At 14d, there was no significant difference in Dice coefficients between PG and TG, but there was a significant difference at 56d ( $P < 0.01$ ; 32.7% vs. 42.3%, in PG and TG respectively).



**Figure 2.1.** DGGGE of amplicons of V6 – V8 regions of 16S rRNA gene obtained from faecal microbiota of foals from placebo (PG, at d14 [n=10] and at d56 [n= 12]) and treatment group (TG, at d14 [n=8] and at d56 [n=10]). M – marker lane. Each line represents one sample. The numbers depicted next to the bands indicate the excised bands which were reamplified for sequencing and identification (Table 2.2).



**Figure 2.2.** Cluster (A) and a plot (B) of principal coordinate analysis (PCoA) of DGGE banding patterns of amplicons of the bacterial 16S rDNA obtained from faecal microbiota of foals from placebo (PG) and treatment group (TG). Each symbol represents one sample. The cluster was formed by means of unweighted pair group method with averaging based on the Dice coefficient of similarity. The scale bar indicates the percentage of similarity. The error flags at each node indicate standard deviation within each cluster. The numbers on the branches indicate the cophenetic correlation values which express the consistency of a cluster. PCoA plot was calculated based on Bray-Curtis distances between samples.

**Table 2.2.** The counts of *Clostridium coccoides* group quantified using qPCR, values of similarity and diversity indices calculated from DGGE profiles and numbers of DGGE bands of the foals' faecal samples collected from placebo (at d14 [n=10] and at d56 [n=12]) and treatment group (at d14 [n=8] and at d56 [n=10]). All results are shown as mean values  $\pm$  standard deviation.

	Age	Placebo group	Treatment group
Clostridium coccoides group (Log of copies/10 $\mu$ L)	14d	6.85 $\pm$ 0.16	6.99 $\pm$ 0.31
	56d	6.98 $\pm$ 0.16	7.04 $\pm$ 0.17
Shannon index of diversity	14d	2.76 $\pm$ 0.13	2.67 $\pm$ 0.14
	56d	2.61 $\pm$ 0.21	2.63 $\pm$ 0.22
Number of bands	14d	16.70 $\pm$ 2.00	15.75 $\pm$ 2.05
	56d	15.00 $\pm$ 3.77	15.30 $\pm$ 3.16
Dice coefficient of similarity (%)	14d	44.54 $\pm$ 17.30 <sup>a</sup>	40.76 $\pm$ 16.12
	56d	32.69 $\pm$ 13.06 <sup>Bb</sup>	42.30 $\pm$ 12.91 <sup>A</sup>

<sup>ab</sup>Lowercase mark significant differences (P<0.05) between days of age within a group.

<sup>AB</sup>Uppercase mark significant differences between groups within a day of age.

### 3.2 Identification and classification of bands

A total of 30 reamplified bands were sequenced, identified and classified (Table 2.3). Using the RDP classifier, 22 sequences could be assigned merely to order *Clostridiales*, family *Lachnospiraceae*, and the remaining to genera *Akkermansia*, *Roseburia* and *Escherichia/Shigella*. The comparison with the NCBI database revealed that the majority of band sequences were matched (97-100 %) to uncultured bacteria and only 5 sequences (band 11 and 16 *Akkermansia muciniphila*, band 19 *Escherichia coli* /*Salmonella enterica* (both 100 % of identity), band 27 *Roseburia hominis*, and band 28 putative (96 %) *Roseburia inulinivorans*) were identified to species level. From 10 bands which sequences were assigned to genus or species level, only bands (see Figure 2.1, double bands in the lower part of gels) identified as *Akkermansia spp.* or *A. muciniphila* appeared almost in all DGGE profiles.



**Table 2.3.** Identification and classification of reamplified DGGE bands (PG n=17 and TG n=13).

Band No <sup>1</sup>	AN <sup>2</sup>	RDP data base			NCBI data base	
		order	family	genus <sup>3</sup>	species identity	AN <sup>4</sup>
1	KT726876	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (99 %)		uncl. Lachnospiraceae (98 %)	GQ358488
2	KT726877	Verrucomicrobiales (100 %)	Verrucomicrobiaceae (100 %)	Akkermansia (92 %)	uncl. bacterium (100 %)	EU777960
3	KT726878	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (87 %)		uncl. bacterium (99 %)	EU773127
4	KT726879	Verrucomicrobiales (100 %)	Verrucomicrobiaceae (100 %)	Akkermansia (94 %)	uncl. bacterium (99 %)	EU777960
5	KT726880	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (84 %)		uncl. bacterium (97 %)	EU773127
6	KT726881	Verrucomicrobiales (100 %)	Verrucomicrobiaceae (100 %)	Akkermansia (91 %)	uncl. bacterium (100 %)	EU468281
7	KT726882	Clostridiales (99 %)	Lachnospiraceae (96 %)		uncl. bacterium (95 %)	EU474601
8	KT726883	Clostridiales (99 %)	Lachnospiraceae (90 %)		uncl. bacterium (95 %)	KF550884
9	KT726884	Clostridiales (99 %)	Lachnospiraceae (99 %)		uncl. bacterium (97 %)	EU463771
10	KT726885	Verrucomicrobiales (99 %)	Verrucomicrobiaceae (99 %)	Akkermansia (90 %)	uncl. bacterium (99 %)	EU777960
11	KT726886	Verrucomicrobiales (100 %)	Verrucomicrobiaceae (100 %)	Akkermansia (100 %)	Akkermansia muciniphila(100 %)	LC071790
12	KT726887	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (72 %)		uncl. bacterium (97 %)	EU773122
13	KT726888	Verrucomicrobiales (100 %)	Verrucomicrobiaceae (100 %)	Akkermansia (84 %)	uncl. bacterium (99 %)	EU461533
14	KT726889	Clostridiales (98 %)	Lachnospiraceae (90 %)		uncl. bacterium (98 %)	EU463456
15	KT726890	Clostridiales (99 %)	Lachnospiraceae (96 %)		uncl. bacterium (98 %)	EU463439
16	KT726891	Verrucomicrobiales (100 %)	Verrucomicrobiaceae (100 %)	Akkermansia (100 %)	Akkermansia muciniphila(98 %)	LC071790
17	KT726892	Clostridiales (97 %)	Lachnospiraceae (72 %)		uncl. bacterium (95 %)	EU773127
18	KT726893	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (96 %)		uncl. bacterium (98 %)	EU463504

19	KT726894	Enterobacteriales (100 %)	Enterobacteriaceae (100 %)	Escherichia/Shigella (97%)	Escherichia coli (100 %) / Salmonella enterica (100 %)	KP868689/ CP012349
20	KT726895	Clostridiales (92 %)	Lachnospiraceae (78 %)		uncl. bacterium (91 %)	EU771275
21	KT726896	Clostridiales (99 %)	Lachnospiraceae (96 %)		uncl. bacterium (96 %)	EU773057
22	KT726897	Clostridiales (99 %)	Lachnospiraceae (99 %)		uncl. bacterium (99 %)	EU463771
23	KT726898	Clostridiales (99 %)	Lachnospiraceae (97 %)		uncl. bacterium (95 %)	AJ408045
24	KT726899	Clostridiales (98 %)	Lachnospiraceae (98 %)		uncl. bacterium (98 %)	EU463771
25	KT726900	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (92 %)		uncl. bacterium (97 %)	EF409953
26	KT726901	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (95 %)		uncl. bacterium (96 %)	HQ796614
27	KT726902	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (100 %)	Roseburia (99 %)	Roseburia hominis (99 %)	CP003040
28	KT726903	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (100 %)	Roseburia (84 %)	Roseburia inulinivorans (96 %)	AJ270474
29	KT726904	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (100 %)		uncl. bacterium (97 %)	JQ084945
30	KT726905	Clostridiales (100 %)	Lachnospiraceae (79 %)		uncl. Bacterium (96 %)	EF409953

<sup>1</sup> Refer to Figure 2.1; <sup>2</sup> NCBI accession numbers of bands; <sup>3</sup> Genus names with identities below 80 % are not shown in the column; <sup>4</sup> NCBI accession numbers of the closest matches; uncl. - uncultured; PG - placebo group, TG - treatment group.

## 4 DISCUSSION

In accordance with another work (Earing et al., 2012), no DNA or amplicons were obtained from meconium collected immediately after birth in this study. This finding supports again the general opinion that the digestive tract of newborn foals is germ-free. However, it is worth noting that microbes acquired during birth rapidly colonize the gut within the first 24 hours (Sadet-Bourgetean and Julliand, 2010). So, for example, it was found that stool microbiota of human infants who were less than 24 hours old (Dominguez-Bello et al., 2010) and faecal microbiota of one-day-old foals (Costa et al., 2015b) was already rich and diverse.

Like in others animals, the intestinal microbiota of young foals is very dynamic and rapidly adapts to the prevailing conditions in the gut, which are influenced by various determinants like age, environment and nutrition. Thus, it was not surprising that in this study the faecal samples of foals clustered by age, in agreement with previous report (Costa et al., 2015b). Bearing in mind, however, that the foals of TG suffered more from diarrhea than PG foals in the first 2 weeks of life [reported earlier by Stroebel et al., (2016)], it would be expected that the composition of the microbiota of TG could also be different (at least at 14d of age) from that in PG. But, in all indexes calculated in this study, there were no significant differences between groups. The results suggest that two-week administration of the probiotics did not affect the main microbial groups because by means of DGGE chiefly dominant microbes are detected. Even though no faeces were taken between birth and 14d of age, however, it can be assumed that the changes in the microbiota may have happened at an earlier date in this study. An indication of this assumption could be the fact that the peak of diarrhoea occurrence in TG was around 9 or 10 days of age (Stroebel et al., 2016).

Calculation of Dice coefficients showed that intestinal microbiota of horses is more likely individual-specific. Interestingly, at the end of the experiment (at 56d) the DGGE profiles of TG were significantly more similar than those in PG although the last probiotic supplementation was performed 42 days ago. Whether it is an outcome of the probiotic feeding or of chance of nature cannot be found in this study. Nevertheless, it is not excluded that in consequence of the two-week administration of the preparation a certain selection of bacteria takes place.

In this research, analysis of the sequences showed that the majority of the excised bands could not be assigned to any known bacteria. Once more, this is evidence confirming the

findings of recent studies, based on culture-independent molecular methods, which clearly demonstrated that the current knowledge about horse's intestinal flora is largely unexplored (Costa et al., 2015a; 2015b; Daly et al., 2001; Shepherd et al., 2012). Furthermore, 66.7 % of sequences obtained in the present study were classified as *Clostridia* (family *Lachnospiraceae*). Many members of the *Lachnospiraceae* family (especially species of *Clostridium* cluster XIVa and IV) produce volatile fatty acids mainly butyrate which play a crucial role in intestinal homeostasis (Lopetuso et al., 2013; Meehan and Beiko, 2014).

*Clostridia*, one of the most common intestinal bacterial groups, belong to the “normal” microbiota of mammals although some of them are opportunistic pathogens (Lopetuso et al., 2013). Using a high-throughput DNA sequencing method, Costa et al. (2015b) analyzed faeces from healthy foals at different ages (from 1 day to 9 month) and mares, and found the members of *Clostridiales* (such as *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Clostridium* cluster XIVa) among dominant groups. Hence the finding, no differences in quantity of *Clostridium* cluster XIVa, obtained in this study corroborates the supposition of the DGGE results mentioned above.

In this study, the bands related to *Akkermansia spp.* and *A. muciniphila* were visible in almost all DGGE profiles. According to LPSN-database (Parte, 2014), currently only one known species, a mucin-degrading bacterium *A. muciniphila* (Derrien et al., 2004), belongs to the genus *Akkermansia*. Based on metagenomics data, however, it can be assumed that at least eight other different species of this genus may occur in the human intestine (van Passel et al., 2011). The DGGE findings suggest also the presence of unknown *Akkermansia* species.

*A. muciniphila* determined in high abundance in the intestine of humans is attributed to a health-promoting effect (Belzer and de Vos, 2012; Derrien, 2007). The role of other *Akkermansia spp.*, which presumably occur in the gut of animals, is not yet known. However, taking into account that bacteria related to *Akkermansia* genus are widely distributed in the gut of different vertebrates (Belzer and de Vos, 2012), including equines (Costa et al., 2015b; Liu et al., 2014), it can be assumed that these bacteria are not negligible in the intestinal environment. Therefore, in further studies, more attention should be paid to *A. muciniphila* and to other *Akkermansia* species, which could also be specific for the equine gastrointestinal tract.

## 5 CONCLUSIONS

Two-week supplementation of probiotic strains *L. rhamnosus* and *E. faecium* to foals had no significant effect on the composition of the faecal microbiota. However, the data of this study again emphasizes how little is known about the composition and functions of the intestinal microbiota. Considerably more work needs to be done to determine the role of specific microbial groups, e.g, *Lachnospiraceae* and other *Clostridia* group or species as well as *Akkermansia spp.*

## ORCID

V. Urubschurov <http://orcid.org/0000-0003-3105-0214>

A. Zeyner <http://orcid.org/0000-0001-5901-1394>

## 6 REFERENCES

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.

Belzer C and de Vos WM. 2012. Microbes inside-from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *Isme Journal* 6: 1449-1458.

Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P and Weese JS. 2015a. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Veterinary Journal* 205: 74-80.

Costa MC, Stampfli HR, Allen-Vercoe E and Weese JS. 2015b. Development of the faecal microbiota in foals. *Equine Vet. J*, doi: 10.1111/evj.12532.

Costa MC and Weese JS. 2012. The equine intestinal microbiome. *Anim Health Res Rev* 13: 121-128.

Daly K, Stewart CS, Flint, H.J. and Shirazi-Beechey SP. 2001. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *Fems Microbiology Ecology* 38: 141-151.

Derrien M. 2007. Mucin Utilisation and Host Interactions of the Novel Intestinal Microbe *Akkermansia muciniphila*, PhD. thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM and de Vos WM. 2004. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1469-1476.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N and Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl. Acad. Sci U. S. A* 107: 11971-11975.

Earing JE, Durig AC, Gellin GL, Lawrence LM and Flythe MD. 2012. Bacterial colonization of the equine gut; comparison of mare and foal pairs by PCR-DGGE. *Advances in Microbiology* 2: 79-86, 8.

EC. 2015. Reg (EC) No 1831/2003 European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation. Edition 217. Appendixes 3e, 4 - 04. 09. 2015. Edition 217. Appendixes 3e, 4 - 04. 09. 2015.

Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W and Galvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J Food Microbiol* 151: 125-140.

Grønvold AM, L'Abee-Lund TM, Strand E, Sorum H, Yannarell AC and Mackie RI. 2010. Fecal microbiota of horses in the clinical setting: potential effects of penicillin and general anesthesia. *Vet. Microbiol.* 145: 366-372.

Hammer Ø, Harper DAT and Ryan PD. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1-9.

Janczyk P, Pieper R, Smidt H. and Souffrant WB. 2007. Changes in the diversity of pig ileal lactobacilli around weaning determined by means of 16S rRNA gene amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Ecol* 61: 132-140.

Juliand V and Zeyner A. 2013. Dietary strategies for optimizing gastrointestinal health: an update on pre- and probiotics. In: *Horse Health Nutrition (6<sup>th</sup> ed.)*, The 6<sup>th</sup> European Equine Health & Nutrition Congress. (Belgium), Vol. Belgium, Country, pp. 75-84.

Lepš J and Šmilauer P (eds.), 2003. *Multivariate Analysis of Ecological Data*, Cambridge University Press, New York, Country.

Liu X, Fan H, Ding X, Hong Z, Nei Y, Liu Z, Li G and Guo H. 2014. Analysis of the gut microbiota by high-throughput sequencing of the V5-V6 regions of the 16S rRNA gene in donkey. *Curr. Microbiol* 68: 657-662.

Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Petito V and Gasbarrini A. 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens* 5.

Magdesian KG. 2005. Neonatal foal diarrhea. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* 21: 295-+.

Mallicote M, House AM and Sanchez LC. 2012. A review of foal diarrhoea from birth to weaning. *Equine Veterinary Education* 24: 206-214.

Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H and Tanaka R. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ. Microbiol.* 68: 5445-5451.

Meehan CJ and Beiko RG. 2014. A Phylogenomic View of Ecological Specialization in the Lachnospiraceae, a Family of Digestive Tract-Associated Bacteria. *Genome Biology and Evolution* 6: 703-713.

Milinovich, GJ, Klieve AV, Pollitt CC, and Trott DJ. 2010. Microbial events in the hindgut during carbohydrate-induced equine laminitis. *Vet. Clin. Equine.* 26:79–94.

Naumann C, Bassler R (1976) Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. In: Naumann, C. and Bassler, R. (eds) *VDLUFA-Methodenbuch*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt.

Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W and Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178: 5636-5643.

Parte AC. 2014. LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research* 42: D613-D616.

Passel van MWJ, Kant R, Zoetendal EG, Plugge CM, Derrien M, Malfatti SA, Chain PSG, Woyke T, Palva A, de Vos WM and Smidt H. 2011. The Genome of *Akkermansia muciniphila*, a Dedicated Intestinal Mucin Degradator, and Its Use in Exploring Intestinal Metagenomes. *Plos One* 6.

Pieper R, Janczyk P, Urubschurov V, Hou Z, Korn U, Pieper B and Souffrant WB. 2010. Effect of *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbial community composition and response to enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in weaning piglets. *Livest Sci* 133: 98-100.

Pieper R, Jha R, Rossnagel B, Van Kessel AG, Souffrant WB and Leterme P. 2008. Effect of barley and oat cultivars with different carbohydrate compositions on the intestinal bacterial communities in weaned piglets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66: 556-566.



Sadet-Bourgetean S and Julliand V. 2010. Equine microbial gastro-intestinal health. In: Ellis AD, Longland AC, Coenen M and Miraglia N (eds.). The impact of nutrition on the health and welfare of horses. 5th European Workshop on Equine Nutrition, Cirencester, UK, 19-22 September, 2010.. Wageningen Academic Publishers, Country, pp. 161-182.

Sgorbini M, Nardoni S, Mancianti F, Rota A and Corazza M. 2008. Foal-heat diarrhea is not caused by the presence of yeasts in gastrointestinal tract of foals. *Journal of Equine Veterinary Science* 28: 145-148.

Shepherd ML, Swecker WS, Jensen RV and Ponder MA. 2012. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. *Fems Microbiology Letters* 326: 62-68.

Slovis NM, Elam J, Estrada M and Leutenegger CM. 2014. Infectious agents associated with diarrhoea in neonatal foals in central Kentucky: A comprehensive molecular study. *Equine Veterinary Journal* 46: 311-316.

Stroebel C, Guenther E, Romanowski K, Buesing K, Urubschurov V and Zeyner A. 2018. Effects of oral supplementation of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 7133) and *Enterococcus faecium* (DSM 7134) on diarrhoea events of foals in their first weeks of life. *J Anim Physiol Anim Nutr.* (Epub ahead of print). doi: 10.1111/jpn.12923.

Taras D, Vahjen W and Simon O. 2007. Probiotics in pigs - modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance. *Livest. Sci.* 108: 229-231.

Urubschurov V, Buesing K, Janczy P, Souffrant WB and Zeyner A. 2015. Development and Evaluation of qPCR Assay for Quantitation of *Kazachstania slooffiae* and Total Yeasts Occurring in the Porcine Gut. *Curr. Microbiol* 71: 373-381.

Vandenplas Y, Huys G and Daube G. 2015. Probiotics: an update. *J Pediatr. (Rio J)* 91: 6-21.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM and Cole JR. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ. Microbiol.* 73: 5261-5267.

Wohlfender FD, Barrelet FE, Doherr MG, Straub R and Meier HP. 2009. Diseases in neonatal foals. Part 2: Potential risk factors for a higher incidence of infectious diseases during the first 30 days post partum. *Equine Veterinary Journal* 41: 186-191.

Wright ES, Yilmaz LS and Noguera DR. 2012. DECIPHER, a Search-Based Approach to Chimera Identification for 16S rRNA Sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 717-725.

Zeyner A and Boldt E. 2006. Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets. *J. Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 90: 25-31.

# V DISKUSSION

## 1 Diskussion der eingesetzten Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde die Widerristhöhe mithilfe eines Bandmaßes gemessen. Die so gemessenen Werte sind ungefähr 4,0 cm (Tag 0-4), 6,6 cm (Tag 5-34) und 7,3 cm (Tag 35-60) länger als mit einem Maßstab gemessene Werte und werden zusätzlich von dem Ernährungszustand des Fohlens beeinflusst (Mack, 2007). Daraus könnten falsch positive Ergebnisse resultieren.

Um direkte negative Effekte nachzuweisen, die durch die Probiotika alleine verursacht waren, hätten Kotproben auf Durchfallerreger untersucht werden können.

Der Gesundheitsstatus der verglichenen Gruppen unterschied sich sehr. Eine Erklärung hierfür könnte in der zunehmenden Anzahl an geborenen Fohlen und dem dadurch wachsenden Infektionsdruck liegen. Es ist eher unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen, dass die erhöhte Erkrankungsrate in der Verumgruppe auf die Verabreichung des Probiotikums zurückgeführt werden kann.

## 2 Diskussion der Ergebnisse

In der Ersten der vorliegenden Veröffentlichungen zeigte sich kein Unterschied in der Größe, im Größenwachstum und dem Ernährungszustand zwischen Fohlen der Placebo- und Verumgruppe.

Die Durchfallinzidenz war in beiden Gruppen um den neunten bis elften Lebenstag am höchsten. Das deutet auf eine Übereinstimmung mit dem Fohlenrossephänomen. Aber in dem gesamten Beobachtungszeitraum war in der Verumgruppe eine deutlich höhere Durchfallinzidenz, längere Durchfalldauer und größere Anzahl an Fohlen, die aufeinanderfolgende Durchfallperioden zeigten, zu verzeichnen. In einer anderen Studie entwickelten mit Probiotika behandelte Fohlen auch eine hohe Durchfallinzidenz, wobei die verabreichten probiotischen Bakterien aus dem Darm von Pferden isoliert werden konnten (Weese et al, 2005). Möglicherweise führte die Verabreichung der hier verwendeten probiotischen Stämme zu einem Ungleichgewicht der Darmflora. Folglich konnte eine Überwucherung des neonatalen

Darmes mit Milchsäurebakterien in einer erhöhten Durchfallinzidenz resultieren (Weese et al., 2005).

Die Dosis der verabreichten Probiotika wurde bewusst sehr niedrig gewählt, da andere Autoren über nachteilige Wirkungen mit einer hohen Dosierung berichteten (Weese et al., 2003; Zeyner and Boldt, 2006; Büsing and Zeyner 2015, Xiao-Qiong et al., 2012).

Spezies-spezifische Keime eine bessere Chance, den Darm zu kolonisieren (Gibson and Fuller 2000). Eventuell waren die nicht pferde-spezifischen, hier verwendeten, Stämme nicht verträglich für den unreifen Verdauungstrakt des Fohlens (Chung H. et al., 2012). Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit erhielt Yuyama et al. (2004) positive Ergebnisse nach Verabreichung von spezies-spezifischen Probiotika bei Fohlen. Da das Keimspektrum des Intestinaltraktes von Fohlen dem der Mutterstuten sehr ähnlich ist, wäre es sehr vielversprechend die Darmflora von Fohlen über eine Beeinflussung der Darmflora der Mutterstute zu verändern. Faubladiet et al. (2013) konnte zeigen, dass die Unterstützung der Mutterstute mit fermentierten Futterzusätzen eine positive Entwicklung von intestinalen Keimen und das Wachstum des Fohlens stimulierten.

Obwohl die Wirksamkeit von Probiotika gegen bestimmte pathogene Keime in vivo und in vitro nachgewiesen wurde, verursachten hier eventuell andere Pathogene den Durchfall der Fohlen, deren Wachstum die hier verwendeten probiotischen Stämme nicht unterdrücken konnten (Weese et al., 2004).

In der vorliegenden Studie konnten keine positiven Effekte wie Stabilisierung der Darmflora, Vermeidung von Durchfall und Stärkung des Immunsystems beobachtet werden. Im Gegenteil: es wurden sogar eher negative Effekte beobachtet. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese negativen Effekte ist eine inadäquate Bakterienwahl oder eine zu hohe Dosierung. Darüber hinaus wurde mit der Verabreichung der Probiotika direkt nach der Geburt des jeweiligen Fohlens begonnen, um eine möglichst hohe Besiedlung mit den verabreichten Keimen in dem sterilen Darm zu erreichen. Daher ist es denkbar, dass diese frühe Verabreichung zu einer Überwucherung des unreifen Darmes führte. Ein Indikator für eine unkontrollierte Überwucherung ist die hohe Durchfallinzidenz in der Verumgruppe vor allem in der ersten Lebenswoche.

Milchsäurebakterien haben eine enorme metabolische Aktivität, deshalb kann eine gezielte Manipulation und ein dadurch verschobenes Gleichgewicht der intestinalen Mikroflora durch Probiotika zu negativen Effekten auf den Organismus führen (Ishibashi and Yamazaki, 2001). Bei neugeborenen Ratten verursachen direkt in das Darmlumen verabreichte, kurzkettige Fettsäuren Verletzungen in der Dickdarmschleimhaut (Nafday et al.,

2004). Diese Tatsache würde die in dieser Studie aufgetretene erhöhte Durchfallinzidenz ohne klinische Erscheinungen der Fohlen, die mit dem Probiotikum behandelt wurden, erklären.

Die Spezies *Enterococcus* z.B. beinhaltet auch pathogene Spezies, die vor allem als nosokomiale Erreger eine Rolle spielen und antibiotische Resistenzen zeigen. Deren hohe genetische Variabilität lässt die Überlegung zu, dass durch horizontalen Gentransfer im Darm pathogene Keime entstehen (Vancanniet et al., 2002; Jores and Wieler, 2003). Einige *Lactobacillus*-Arten können in Ausnahmefällen auch Bakteriämien, Endokarditiden und andere Infektionen auslösen (Boyle et al., 2006). Dies zeigt, dass trotz einer geringen Wahrscheinlichkeit, probiotische Bakterien das Potential haben, adverse Effekte zu verursachen, wie es auch in dieser Studie geschehen sein könnte.

Ein wichtiges Kriterium von probiotischen Keimen ist die Fähigkeit sich in der intestinalen Schleimhaut festzusetzen, um sich besser im Darm anzusiedeln, was wiederum auch einen Virulenzfaktor darstellt (Boyle et al., 2006). Jett et al. (1997) und Apostolou et al. (2001) konnten einen Zusammenhang sowohl bei Laktobazillen als auch Enterokokken zwischen der Adhäsion in der Darmschleimhaut und der Pathogenität nachweisen.

Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Kolostrumqualität und der Kotkonsistenz oder dem Auftreten von Durchfall in der vorliegenden Studie. Auch ein Zusammenhang zwischen der Kolstrumqualität und respiratorischen Symptomen konnte nicht gezeigt werden.

Obwohl die Rolle der Zusammensetzung der intestinalen bakteriellen Mikrobiota in der Humanmedizin einem großen Forschungsbedarf unterliegt, ist dieser im Bereich Pferd sehr neu.

Deshalb wurde in der zweiten vorliegenden Studie die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora von 24 Fohlen bei der Geburt, 14 und 56 Tage nach der Geburt anhand von Polymerase-Ketten-Reaktion der bakteriellen 16S rRNA Region und Denaturierungsgradienten-gelelektrophorese (PCR-DGGE) untersucht. Es konnte nicht aus allen Mekoniumproben DNA isoliert werden. Auch nach zweimaliger Wiederholung der DNA Extraktion konnte in den Mekoniumproben in nur 9 von 24 Proben sehr geringe Mengen an DNA isoliert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die negativen Proben tatsächlich steril waren. Frühere Studien bestätigen diese Ergebnisse, wonach der Darm von Neonaten grundsätzlich steril ist, die Besiedelung aber bereits während des Geburtsvorgangs beginnt (Sadet-Bourgetean and Jullian, 2010; Favier et al., 2002, Biasucci et al., 2010). Neuere humanmedizinische Studien hingegen fanden ein eigenes plazentales Mikrobiom, bestehend aus nichtpathogenen kommensalen Mikroben der Stämme Firmicutes, Tenericutes,

Proteobacteria, Bacteroidetes, und Fusobacteria (Aagaard, 2014). Diese präpartale Besiedelung konnte auch an Mäusen bestätigt werden (Jiménez et al., 2008). Es bleibt aber fraglich, ob diese Theorie vom Menschen auf das Pferd übertragbar ist, da sie sich ihre Plazentatypen in der Leistungsfähigkeit für Austauschprozesse unterscheiden. Die Plazenta epitheliochorialis des Pferdes ist im Vergleich zu der Plazenta haemochorialis von Mensch und Nagetier sehr viel weniger durchlässig für jeglichen Stoffaustausch. Eine andere Erklärung für die negative Mekoniumproben könnte in der Extraktionsmethode liegen. Das Resultat der DNA-Extraktion ist abhängig von mehreren Faktoren. Eine geringe Menge von bakterieller DNA in der Probe und eine hochgradige Verdünnung mit Wirts-DNA kann das Ergebnis dahingehend beeinflussen, dass die bakterielle DNA nicht detektiert werden kann (Weaver and Rowe, 1997; Wilson, 1997). Weiterhin ist die zur Auswertung verwendete DNA-Bibliothek maßgebend für eine aussagekräftige Interpretation der Sequenzierungsergebnisse. Es können nur diese Bakterien angeglichen werden, die auch in der Datenbank gespeichert sind. Das könnte erklären, warum ein Großteil der Sequenzen aus den Kotproben der Studientiere keinen Bakterien in der Datenbank zugeordnet werden konnten.

Die intestinale Mikrobiota von Fohlen unterliegt sehr raschen Veränderungs- und Anpassungsvorgängen, wie auch bei anderen Tierarten und dem Menschen. Diese Veränderungen sind abhängig von Alter, Ernährung und Umwelt, wie in vorherigen Studien gezeigt (Costa et al., 2015b, Earing et al., 2012). Da die Fohlen der Verumgruppe weit häufiger Durchfall zeigten, als die der Placebogruppe, könnte man erwarten, dass sich die beiden Gruppen in der Zusammensetzung der Mikrobiota unterscheiden. Jedoch gab es in keiner Auswertung dieser Studie einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine zweiwöchige Verabreichung der probiotischen Formulierung keinen Einfluss auf das mikrobielle Hauptmilieu im Fohlendarm hatte, da mit Hilfe der DGGE nur die überwiegend dominanten Keime erfasst werden können. Möglicherweise waren die hier verabreichten Probiotika nicht geeignet, sich in dem Darm neonataler Fohlen anzusiedeln. Eventuell hätten spezies-spezifische Keime eine bessere Chance gehabt, den Darm zu kolonisieren, wie in früheren Arbeiten bestätigt (Yuyama et al., 2004, Chung H. et al., 2012, Gibson and Fuller 2000).

Die Clusteranalyse zeigt, dass alle Proben in zwei Cluster, abhängig vom Alter, unterteilt werden können. Außerdem ist innerhalb der Cluster ein Gruppen-spezifisches Subcluster erkennbar. Die gleichen Ergebnisse werden in der graphischen Darstellung der Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) deutlich. Die Proben von verschiedenen Tagen liegen in verschiedenen Bereichen. Diese Ergebnisse lassen auf immense Veränderungen und

Entwicklungsvorgänge im Darm der Fohlen vor dem 14. Lebenstag schließen. Die Tatsache, dass die Durchfallinzidenz bei allen Fohlen um den neunten und zehnten Lebenstag am höchsten war, lässt vermuten, dass die größten Veränderungen der Mikrobiota zu diesem Zeitpunkt stattfinden. Diese Instabilität in den ersten Lebenstagen könnte das Auftreten von „Fohlenrossedurchfall“, sowie die erhöhte Durchfallinzidenz erklären.

Der Dice-Koeffizient zeigte eine signifikant hohe Ähnlichkeit der DGGE-Profile am 56. Tag in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe, obwohl die letzte Probiotikaverabreichung 42 Tage vorher stattfand. Es ist nicht erwiesen, aber denkbar, dass diese Ähnlichkeit eine Folge der Probiotikagabe ist oder sich natürlich entwickelte.

Es wurden sehr viele Sequenzen in dieser Studie gefunden, die bisher noch nicht klassifiziert wurden, wie auch vorher schon in anderen veröffentlichten Studien gezeigt wurde (Costa et al., 2015a; 2015b; Daly et al., 2001; Shepherd et al., 2012). Der größte Teil der Sequenzen dieser Studie wurden als *Clostridia* (Familie *Lachnospiraceae*) klassifiziert. Es ist bekannt, dass intestinale kommensale *Clostridien* durch die Produktion von flüchtigen Fettsäuren eine wichtige Rolle in der Regulation des Gleichgewichtes des Intestinaltrakts spielen, v.a. *Clostridium* cluster XIVa (auch bekannt als *Clostridium Coccoides* Gruppe) und *Clostridium* cluster IV (auch bekannt als *Clostridium leptum* Gruppe) (Lopetuso et al., 2013; Meehan and Beiko, 2014). *Clostridien* sind eine der am häufigsten im Intestinaltrakt von Säugetieren vorkommenden Kommensalenarten, obwohl einige dieser Gattung auch pathogene Erreger darstellen. In einer Studie von Costa et al. (2015b) wie auch in der vorliegenden Arbeit, traten *Clostridien* als häufigste Gruppe von Kommensalen im Fohlendarm auf.

Ein großer Teil der DGGE-Profile dieser Studie wiesen Keime auf, die dem Genus *Akkermansia* spp. zugeordnet wurden. Die einzige derzeit bekannte Spezies dieses Genus ist *A. municipihila*. Van Passel et al. (2011) fanden mindestens acht verschiedene repräsentative Spezies des Genus *Akkermansia* im menschlichen Verdauungstrakt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch in der vorliegenden Studie verschiedene unbekannte Arten von *Akkermansia* vorliegen. *A. municipihila* kommt im Verdauungstrakt vieler Wirbeltiere, inklusive dem Pferd, vor (Belzer and de Vos, 2012; Costa et al., 2015b; Liu et al., 2014). Daher kann man annehmen, dass diese Kommensalen eine nicht unerhebliche Rolle in der Mikrobiota des Pferdes spielen und es sollte auch in Zukunft im Forschungsinteresse liegen, weitere *Akkermansia* Spezies zu differenzieren.

Weiterhin besteht ein hoher Forschungsbedarf im Bereich der Zusammensetzung der Mikrobiota beim Pferd und von Probiotika, da enorme Unterschiede in den Ansprüchen der

verschiedenen Spezies bestehen und die Verabreichung von am Markt erhältlichen Probiotika beim Pferd noch weitgehend ineffektiv ist.

Weiterhin ist es denkbar, dass die Verabreichung eines Probiotikums an Fohlen in Gestüten, in denen eine große Problematik mit infektiösen Enteritiden vorliegt, positive Effekte erreichen kann, das war hier aber nicht der Fall.

## VI ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegenden Studien untersuchten Effekte der probiotischen Stämme *Enterococcus faecium* (DSM 7134) and *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 7133) auf die Durchfallinzidenz, das Wachstum und den Gesundheitsstatus, sowie auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota junger Fohlen. Vierunddreißig Fohlen wurden zufällig zwei Gruppen zugeordnet und erhielten entweder das Placebo- (PG, n=16) oder Verumpräparat (TG, n=18). Die erste orale Verabreichung fand direkt nach der Geburt statt und anschließend täglich innerhalb der ersten zwei Lebenswochen. Jedes Fohlen wurde klinisch untersucht und die Kotkonsistenz mithilfe eines Kotkonsistenzschlüssels bewertet (FCS 1-5, 5 entspricht geformt und 1 bedeutet wässrige Kotkonsistenz; Durchfall entsprach einer Bewertung  $\leq 3$ ). Diese Untersuchung erfolgte in den ersten zwei Lebenswochen der Fohlen täglich und dann einmal wöchentlich bis zum Alter von sechs Wochen. Kotproben wurden direkt aus der Ampulla recti sofort nach der Geburt, am 14. und 56. Tag genommen. Zu diesen Zeitpunkten wurde auch das Stockmaß der Fohlen gemessen.

Durchfall trat in den ersten zwei Lebenswochen bei 19% der Fohlen der Placebogruppe und bei 61% der Fohlen der Verumgruppe auf. In der ersten Lebenswoche hatten die Fohlen der Placebogruppe durchschnittlich  $0.3 \pm 0.8$  Tage Durchfall, die Fohlen der Verumgruppe  $1.6 \pm 1.4$  Tage. In der zweiten Lebenswoche traten bei Fohlen der Placebogruppe durchschnittlich  $3.0 \pm 1.5$  Durchfalltage und bei Fohlen der Verumgruppe  $3.7 \pm 1.6$  Durchfalltage auf. 33% der Fohlen in der Placebogruppe entwickelten zwei Durchfallperioden, wohingegen bei 65% der Fohlen in der Verumgruppe zwei bis vier Durchfallperioden innerhalb der ersten zwei Lebenswochen beobachtet werden konnten. Das Wachstum der Fohlen in der Verumgruppe war geringfügig langsamer als das der Placebogruppe. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die hier verwendete probiotische Verabreichung die Durchfallinzidenz und –dauer



innerhalb der ersten zwei Lebenswochen nicht reduzieren konnte. Die Fohlen der Verumgruppe entwickelten sogar öfter Durchfall und dieser bestand über längere und häufigere Perioden als Fohlen der Placebogruppe.

Die Kotproben von zwölf Fohlen wurden anhand einer PCR mit folgender DGGE-Analyse mikrobiell untersucht. Es traten keine Unterschiede in der Bandenanzahl, dem Shannon-Index der Biodiversität sowie in der Bakterienanzahl aus der *Clostridium coccooides* Gruppe zwischen den Gruppen auf. Aber in der Clusteranalyse sowie in der Hauptkoordinatenanalyse der DGGE-Ergebnisse ist ein deutlicher Alterseffekt erkennbar. In fünf von 30 neu amplifizierten Banden konnte das Artniveau ermittelt werden. Die restlichen Banden konnten entweder einer Familie, meist *Lachnospiraceae*, oder der Gattung *Akkermansia* zugeordnet werden. Die Banden, die *Akkermansia muciphila* oder *Akkermansia spp.* zugeordnet werden konnten, erschienen fast in allen DGGE-Profilen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die zwei-wöchige Verabreichung der probiotischen Zubereitung keinen Effekt auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora der Fohlen hatte.

## VII SUMMARY

The intestinal microflora is extremely important for human and animal health. Probiotics are a way of modifying the microbiota and have successfully demonstrated to prevent and treat diseases. In this study, we investigated the influence of the probiotic *Enterococcus faecium* (DSM 7134) and *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 7133) on incidence of diarrhoea, growth and health performance of young foals. 34 foals were randomly assigned into two groups and received either the placebo preparation (PG, n=16) or the probiotic treatment (TG, n=18). The first application started immediately after birth and then daily for the first two weeks of life. A clinical examination was performed and the faecal consistency was judged by using a faeces consistency score (FCS 1-5, 5 meant formed and 1 watery consistency; with diarrhoea defined by  $\leq 3$ ) once a day for the first two weeks and subsequently once a week until the age of eight weeks. Faeces were collected directly from the rectum immediately after birth (meconium), at 14 and 56 day of life. At these dates also the body height was measured. Diarrhoea occurred in the first week of life in 19% of foals in the PG, but in 61% of foals in the TG. While diarrhoea occurred for  $0.3 \pm 0.8$  days on average in PG

foals in the first week, the foals of the TG had diarrhoea for  $1.6 \pm 1.4$  days. In the second week diarrhoea was seen in  $3.0 \pm 1.5$  days in PG foals and  $3.7 \pm 1.6$  days in TG foals on average. 33% of the PG foals developed two periods of diarrhoea, whereas 65% of the TG foals showed more than two and up to four events of diarrhoea within the first two weeks of life. Also growth of TG foals was slightly slower than of PG foals. The results suggest that the probiotic treatment of neonatal foals was not suitable to reduce diarrhoea within the first two weeks of life in this study. Quite the opposite appeared and foals of the TG suffered more frequently and for more and longer periods from diarrhoea than foals of the PG.

Faecal samples of 12 foals per group were selected for microbiological analysis. DNA was extracted and used for polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and quantitative PCR. There were no differences in richness of bands and Shannon index of diversity as in counts of *Clostridium* cluster XIVa between groups. But, cluster analysis and Principal coordinate analysis of DGGE data shown a clear effect of age. Five of thirty reamplified bands were identified to species level. Others were assigned either to family level (mainly Lachnospiraceae) or to genera *Akkermansia*. The bands related to *Akkermansia muciniphila* or to *Akkermansia* spp. appeared almost in all DGGE profiles. Taken together, two-week supplementation of the preparation to foals had no significant impact on the composition of the faecal microbiota.

## VIII LITERATURVERZEICHNIS

Aagaard K, Ma J, Antony K M, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. 2014. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine*. (6): 237.65

Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E and Retetangos C. Mode of Delivery Affects the Bacterial Community in the Newborn Gut. 2010. *Early Human Development*, Vol. 86, Suppl. 1.13-15.

Apostolou, E., Kirjavainen, P. V., Saxelin, M., Rautelin, H., Valtonen, V., Salminen, S. J., & Ouwehand, A. C. (2001). Good adhesion properties of probiotics: A potential risk for bacteremia? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 31, 35–39.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2001.tb01583.x>

Belzer C and de Vos WM. 2012. Microbes inside-from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *Isme Journal* 6: 1449-1458.

Boyle, R. J., Robins-Browne, R. M., & Tang, M. L. (2006). Probiotic use in clinical practice: What are the risks? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1256–1264.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1256>

Büsing, K., & Zeyner, A. (2015). Effects of oral *Enterococcus faecium* strain DSM 10663 NCIMB 10415 on diarrhoea patterns and performance of suckling piglets. *Beneficial Microbes*, 6, 41–44. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0008>

Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Edelman, S. M., Troy, E. B., ... Kasper, D. L. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*, 149, 1578–1593. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.037>

Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P and Weese JS. 2015a. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Veterinary Journal* 205: 74-80.

Costa MC, Stampfli HR, Allen-Vercoe E and Weese JS. 2015b. Development of the faecal microbiota in foals. *Equine Vet. J.*, doi: 10.1111/evj.12532.

Costa MC and Weese JS. 2012. The equine intestinal microbiome. *Anim Health Res Rev* 13: 121-128.

Daly K, Stewart CS, Flint, H.J. and Shirazi-Beechey SP. 2001. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *Fems Microbiology Ecology* 38: 141-151.

Earing JE, Durig AC, Gellin GL, Lawrence LM and Flythe MD. 2012. Bacterial colonization of the equine gut; comparison of mare and foal pairs by PCR-DGGE. *Advances in Microbiology* 2: 79-86. 8.

Faubladier, C., Chaucheyras-Durand, F., da Veiga, L. and Julliand, V. (2013). Effect of transportation on fecal bacterial communities and fermentative activities in horses: Impact of *Saccharomyces Cerevisiae* CNCM I-1077 supplementation. *Journal of Animal Science* 91(4). <https://doi:10.2527/jas.2012-5720>

Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM and Akkermans ADL. 2002. Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1):219-226.

Gibson, G. R., & Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition*, 130(2S Suppl.), 391S–395S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.391S>

Ishibashi, N., & Yamazaki, S. (2001). Probiotics and safety. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 465–470. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.465s>

Jett, B. D., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1997). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 462–478.

Jiménez E, Marín M L, Martín R, Odriozola J M, Olivares M, Fernández J X L, Rodríguez J M. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* 159, 187–193.

Jores, J., & Wieler, L. H. (2003). Populationsgenetische Untersuchung bei Bakterien und deren mögliche Anwendung bei der Risikoabschätzung von Probiotika in der Tierproduktion. *Lohmann Information*, 2, 3–7.

Liu X, Fan H, Ding X, Hong Z, Nei Y, Liu Z, Li G and Guo H. 2014. Analysis of the gut microbiota by high-throughput sequencing of the V5-V6 regions of the 16S rRNA gene in donkey. *Curr. Microbiol* 68: 657-662.

Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V and Gasbarrini A. 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens* 5.

Mack, J. (2007). Einfluss des Kraftfutterangebots auf Parameter des Wachstums bei Warmblutfohlen. Diss med vet, Ludwig-Maximilians-Universität München 2007.

Meehan CJ and Beiko RG. 2014. A Phylogenomic View of Ecological Specialization in the *Lachnospiraceae*, a Family of Digestive Tract-Associated Bacteria. *Genome Biology and Evolution* 6: 703-713.

Nafday, S. M., Chen, W., Peng, L., Babyatsky, M. W., Holzman, I. R., & Lin, J. (2004). Short-chain fatty acids induce colonic mucosal injury in rats with various postnatal ages. *Pediatric Research*, 57, 201–204.

Passel van MWJ, Kant R, Zoetendal EG, Plugge CM, Derrien M, Malfatti SA, Chain PSG, Woyke T, Palva A, de Vos WM and Smidt H. 2011. The Genome of *Akkermansia muciniphila*, a Dedicated Intestinal Mucin Degradar, and Its Use in Exploring Intestinal Metagenomes. *Plos One* 6.

Sadet-Bourgetean S and Julliand V. (2010). Equine microbial gastro-intestinal health. In: Ellis AD, Longland AC, Coenen M and Miraglia N (eds.). *The impact of nutrition on the health and welfare of horses. 5th European Workshop on Equine Nutrition*, Cirencester, UK, 19-22 September, 2010. Wageningen Academic Publishers, Country, pp. 161-182.

Shepherd ML, Swecker WS, Jensen RV and Ponder MA. 2012. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. *Fems Microbiology Letters* 326: 62-68.

Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Björkroth, K. J., ... Holzapfel, W. H. (2002). Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 1381–1391. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1381-1391.2002>

Weaver J.W., and Rowe M.T.: Effect of non-target cells on the sensitivity of the PCR for . *Lett. Appl. Microbiol.* 1997; 25: pp. 109-112

Weese, J. S., Anderson, M. E., Lowe, A., & Monteith, G. J. (2003). Preliminary investigation of the probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in horses: Fecal recovery following oral administration and safety. *Canadian Veterinary Journal*, 44, 299–302.

Weese, J. S., Anderson, M. E., Lowe, A., Penno, R., da Costa, T. M., Button, L., & Goth, K. C. (2004). Screening of the equine intestinal microflora for potential probiotic organisms. *Equine Veterinary Journal*, 36, 351–355.

Weese, J. S., & Rousseau, J. (2005). Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 2031–2034. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.2031>

Wilson I.G.: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: pp. 3741-3751

Yuyama, T., Yusa, S., & Takai, S. (2004). Evaluation of a host-specific *Lactobacillus* probiotic in neonatal foals. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 2, 26–33.

Zeyner A and Boldt E. 2006. Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets. *J. Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 90: 25-31.

## **IX DANKSAGUNG**

Ein besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. Ellen Kienzle für die Überlassung des interessanten Themas und Ihre wissenschaftliche und organisatorische Unterstützung. Der gleiche Dank gilt Frau Prof. Dr. Anette Zeyner für die geduldige Betreuung und die stets konstruktive Hilfe bei der Anfertigung der Dissertation. Frau Prof. Dr. Anette Zeyner stand mir während meiner ganzen Promotionsphase mit Rat und Tat bei inhaltlichen sowie methodischen Fragen zur Seite. Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. Lothar Köhler für die Vermittlung der Dissertationsstelle bedanken. Ein großes Dankeschön geht an Kristin Romanowski für die nette und immer freundliche Unterstützung in allen organisatorischen Fragen zur Durchführung der Studie. Elena Günther danke ich ganz herzlich, als Weggefährtin, für die schöne und kurzweilige Zusammenarbeit während der klinischen Datenaufnahme.

Mein besonderer Dank gilt der H. Wilhelm Schaumann Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Ich möchte mich bei Herrn von Allwörden für die zur Verfügung gestellten Pferde bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich bei Michael Möller und allen Mitarbeitern des Gestütes in Seedorf für die tatkräftige Unterstützung bei den klinischen Untersuchungen der Fohlen. Dr. med. vet. Kirsten Büsing, Dr. Vladimir Urobschurov und Frau Bremer möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Laborarbeiten danken. Sebastian Kieckhäven für die nette Unterhaltung im Labor bei der Auswertung der Proben.

Ein großer Dank gilt an dieser Stelle auch meinen Eltern. Ihre liebevolle und unermüdliche Unterstützung ermöglichte mir das lang ersehnte Tiermedizinstudium und meinen weiteren Lebensweg. Herzlichen Dank auch an meinen Freund Jürgen und an alle, die mich in dieser Zeit immer wieder motiviert und unterstützt haben.

Danke.