

# Lipopolysaccharid-Konzentrationen im Magen-Darm-Trakt von Ponys nach Aufnahme von Heu bzw. einer kraftfutterreichen Ration

Institut für Tierernährung  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Key words:** horses, chyme composition, lipopolysaccharides, concentrate feeding, intestinal flora

## Einleitung

Wie aus Untersuchungen an verschiedenen Spezies, insbesondere an Wiederkäuern, bekannt ist, nimmt die Fütterung, d. h. sowohl Futtermittel als auch Futtermenge, Einfluß auf die Zusammensetzung und Aktivität der Magen-Darm-Flora.

Mikrobiologische Untersuchungen mit Keimdichten- und Speziesbestimmungen liefern zwar detaillierte Informationen, sind aber vergleichsweise aufwendig. Um dennoch ohne derartige Analysen Hinweise auf die Zusammensetzung (und Aktivität) der intestinalen Flora zu bekommen, kann man sich der Bestimmung mikrobiell gebildeter Metaboliten (z. B. Milchsäurekonzentration als Indikator für grampositive Bakterien) oder auch bestimmter Bakterienbestandteile bedienen. Lipopolysaccharide (LPS) sind Zellwandbestandteile aller gramnegativen Bakterien. LPS wurden in den letzten Jahren zunehmend als Indikatoren für den Besatz verschiedener Substrate mit gramnegativen Keimen verwendet (Kamphues, 1986). Ihre vergleichsweise einfache Bestimmung im Limulus-Amoebocyten-Lysat (LAL)-Test wurde unterdessen auch für die Chymusuntersuchung genutzt (Schwein: Ahrens, 1984, Kamphues, 1988, Kaninchen: Herrmann und Kamphues, 1990).

## Zusammenfassung

Acht Ponys (Lebendmasse [LM]: 147 – 311 kg) erhielten über mindestens 8 Wochen zwei sehr unterschiedliche Rationen: In der Kontrollgruppe (n = 4) bekamen die Ponys ausschließlich Heu (in der Trockenmasse [TS] 27,6 Prozent Rohfaser) unter Ergänzung durch eine Mineralstoff-Vitamin-Vormischung. Die Ration der Versuchsgruppe (n = 4) hingegen bestand zu nur 10 Prozent aus Heu und zu 90 Prozent aus Kraftfutter (Basis: Maisschrot und Weizenkleie). Fünf Stunden nach Zuteilung gleicher Mengen der jeweiligen Ration (1,25 kg TS/100 kg LM) wurden die Tiere zur Gewinnung des Magen-Darm-Inhalts getötet und im Chymus die Konzentration von Lipopolysacchariden (LPS), Zellwandbestandteilen gramnegativer Bakterien, bestimmt (Limulus-Amoebocyten-Lysat [LAL]-Test; Chymusinkubation bei 80 °C für 1 h, Zentrifugation, Pipettierung des Überstands auf Titerplatten mit LAL-Reagenz einer Empfindlichkeit von 1,2 EU, Inkubation bei 37 °C für 1 h, visuelle Beurteilung der Gerinnung nach Zusatz von Toluidinblau).

Mit Ausnahme des Magenchymus (ähnliche Werte in beiden Gruppen) traten bei den ausschließlich mit Heu gefütterten Ponys im Dünn- und Dickdarminhalt deutlich niedrigere LPS-Konzentrationen als bei den kraftfutterreich versorgten Tieren auf. Im Dünn- und Dickdarminhalt stieg die LPS-Konzentration generell an, und zwar auf Werte bis zu maximal 16 µg/g (Caecum nach Heufütterung) bzw. 160 µg/g (Colon ventrale bei kraftfutterreicher Ration). Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung führt eine extrem kraftfutterreiche Fütterung bei Pferden zu einem ca. 10fach höheren Besatz des Chymus mit gramnegativen Bakterien; vermutlich fördert die hohe Substratverfügbarkeit (Stärke) aber generell die Keimdichte und -aktivität im Verdauungskanal (parallel traten signifikant höhere Milchsäurekonzentrationen im Dünndarm auf).

Im Unterschied zu diesen Beobachtungen an adulten Ponys wurden durch eine stärkereiche Fütterung von Ferkeln oder auch Jungkaninchen die LPS-Konzentrationen im Chymus eher gemindert und speziell die grampositiven Bakterien gefördert. Im Falle einer forcierten LPS-Absorption, z. B. infolge einer Parasitose oder Mukosaschädigung (Caecumacidose), dürften kraftfutterreich gefütterte Pferde für mögliche extraenterale LPS-(Endotoxin)-Effekte besonders disponiert sein.

## Lipopolysaccharides in the alimentary tract of ponies fed hay or a concentrate ration

Ponies (n = 8, bodyweight [bw]: 147 – 311 kg) were adapted during at least 8 weeks to different feeding regimens. Four ponies were fed hay (supplemented by minerals and vitamins) whereas the experimental group (n = 4) ingested a ration consisting of 90 % concentrates (maize meal and wheat bran) and 10 % hay (27.6 % crude fiber). About 5 hours past offering equal amounts of feed in both groups (1.25 kg dry matter/100 kg bw) the ponies were sacrificed. After exenteration chyme samples were taken to estimate the concentrations of Lipopolysaccharides (LPS) as an indicator for the mass of gram-negative bacteria within the chyme of various sections of the alimentary tract. The LPS were measured by the Limulus amoebocyte lysate assay (heating [80 °C] the fresh mixed chyme sample for 1 h, centrifugation, measuring of LPS in the supernatant fluid [past dilution by pyrogenfree water] on titerplates [sensitivity: 1.2 EU, incubation for 1 h, 37 °C], visual examination of the clotting process).

In hay fed ponies marked lower LPS concentrations in the chyme of the small as well as of the large intestine were measured in general. In spite of variation within each group the LPS concentrations differed significantly in the small intestine as well as in the cecum and colon. In average the LPS concentrations of the concentrate fed ponies were about ten times higher than in hay fed animals.

Only the stomach content in both groups had similar LPS concentrations (about 10 µg/g chyme). In the chyme of the small intestine the LPS concentrations of the control group varied between 0.1 and 1.6 µg/g, whereas in concentrate fed ponies values between 1 and 28.5 µg/g were measured. In the large intestine the LPS concentrations increased markedly in both groups, in hay fed ponies up to 16 µg/g (cecum) and in concentrate fed animals up to 160 µg/g (colon ventrale).

The results are indicating that due to ingestion of highly available carbohydrates counts of gram-negative bacteria were favoured, but presumably the intestinal flora was stimulated in general (there were also increased lactic acid concentrations in the small intestine). Contrary to investigations in piglets and weaned rabbits rations with high proportions of concentrates resulted in elevated LPS concentrations within gut contents of horses. Therefore concentrates fed horses seem to be predisposed to endotoxin effects out of the intestine in the case of elevated LPS absorption due to enteral parasitism, gut wall damage by cecum acidosis or further processes allowing a higher escape of LPS from the intestine.

Mit der vorliegenden Untersuchung wurde der Frage nachgegangen, ob im Vergleich zu der eher natürlichen Fütterung (im wesentlichen Rohfutter) die bei hoher Leistung von Pferden zunehmend intensivere, d. h. kraftfutterreichere Fütterung die Besiedlung des Chymus mit gramnegativen Bakterien beeinflusst. Die LPS-Konzentrationen im Chymus sind aus klinischer Sicht von einigem Interesse, da bei intestinalen Störungen wie Stase, Acidose oder auch Parasitose eventuell eine verstärkte LPS-Absorption aus dem Darmtrakt stattfindet und hierdurch LPS-, d. h. Endotoxin-typische Reaktionen jenseits der Darmwand auftreten können.

### Material und Methoden

Für die Untersuchungen standen insgesamt 8 adulte Ponys mit einer Lebendmasse (LM) zwischen 147 und 311 kg zur Verfügung, die über mindestens 8 Wochen vor dem Versuch sehr unterschiedlich gefüttert wurden (Tab. 1).

In beiden Gruppen wurden die Pferde 5 Stunden nach Angebot gleicher Trockensubstanzmengen der jeweiligen Ration durch Bolzenschuß und Blutentzug getötet, der Magen-Darm-Trakt durch Ligaturen in verschiedene Abschnitte unterteilt und der Chymus gewonnen. Nach gründlicher Durchmischung des Inhalts eines jeden Segments wurde ein Aliquot des Chymus entnommen, für 1 h bei 80 °C erhitzt (Zerstörung der gramnegativen Bakterien zur Freisetzung der Zellwandbestandteile), zentrifugiert und der flüssige Überstand eingefroren (-20 °C).

Nach Auftauen wurden die Proben mit pyrogenfreiem, auf pH 7 gepuffertem Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt, abermals zentrifugiert und der Überstand in Stufen von 10<sup>0,25</sup> verdünnt auf die Titerplatten (mit dem LAL-Reagenz) gegeben. Die deklarierte und überprüfte Empfindlichkeit der Titerplatten betrug 1,2 EU. Bei gleicher bzw. höherer LPS-Konzentration kam es innerhalb der 1stündigen Inkubation bei 37 °C zu einer Gerinnung am Boden der Kavität, die - durch Zusatz von Toluidinblau leichter erkennbar - visuell beurteilt wurde. Die LPS-Konzentration im Chymus errechnet sich aus Verdünnungsfaktor und Empfindlichkeit der Testplatte.

Die Gewinnung des Mageninhalts erfolgte in leicht modifizierter Form: Nach Exenteration des gesamten Magens (samt Inhalt) wurde dieser unmittelbar schockgefroren (-172 °C), im gefrorenen Zustand in Längsrichtung zweigeteilt und von 2 unterschiedlichen Lokalisationen (Antrum- und Pylorusregion) entsprechende Chymusmengen aus der Oberfläche (Kernzone) entnommen. Gerade bei den tiefen pH-Werten des Magenichymus ist eine Abpufferung (s. o.) notwendig, um störende Einflüsse des pH-Wertes auf die Gerinnung mit dem LAL-Reagenz auszuschalten.

### Ergebnisse

#### - LPS-Konzentrationen im Mageninhalt

Weniger die Fütterung als vielmehr die Lokalisation der Probenentnahme erwies sich als wesentlicher Einflußfaktor auf die LPS-Gehalte im Mageninhalt:

In der Antrum-Region betrug die LPS-Konzentration in beiden Gruppen ca. 10 µg/g Chymusfrischmasse (mit Werten zwischen 1 und 28 µg/g). Zum Magenausgang hin gingen die Werte aber in beiden Gruppen deutlich zurück, und zwar im Mittel nach reiner Heufütterung auf ca. 0,7 µg/g bzw. auf 3,4 µg/g nach Aufnahme der kraftfutterreichen Ration.

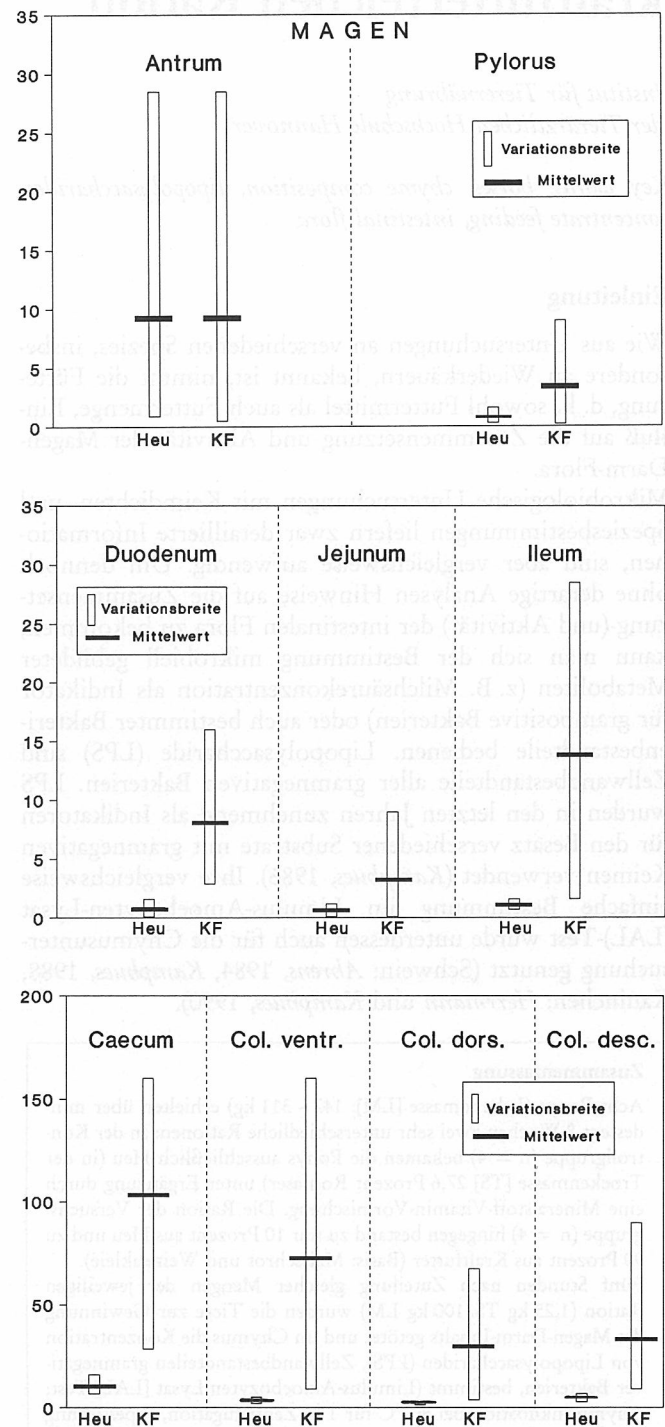


Abb. 1: Lipopolysaccharid-Konzentrationen (µg/g) im Magen-Darm-Inhalt von Ponys nach Fütterung von Heu bzw. einer kraftfutterreichen Ration (KF).

#### - LPS-Konzentrationen im Dünndarminhalt

Nach Aufnahme der Heurration blieben die LPS-Konzentrationen im Dünndarmchymus auf ähnlich niedrigem Niveau wie im pylorusnah gewonnenen Mageninhalt (Werte um bzw. unter  $1 \mu\text{g/g}$  Frischmasse (uS)). Die kraftfutterreich versorgten Pferde wiesen im Dünndarminhalt generell höhere, d. h. im Vergleich zu den mit Heu gefütterten Tieren etwa um den Faktor 10 höhere LPS-Konzentrationen auf.

Im Vergleich der einzelnen Dünndarmabschnitte untereinander zeigte das Jejunum unabhängig von der Fütterung im Mittel die niedrigsten LPS-Gehalte ( $0,5$  bzw.  $3,2 \text{ g/g}$  uS nach Heu- bzw. Kraftfutteraufnahme). Von hier aus stiegen die Werte zum Ileum schon wieder deutlich auf  $1,1$  bzw.  $14,0 \mu\text{g/g}$  uS an.

#### - LPS-Konzentrationen im Dickdarminhalt

Von allen untersuchten Abschnitten des Verdauungskanal wurden im Caecum allgemein die höchsten LPS-Gehalte im Chymus bestimmt (nach Fütterung von Heu: ca.  $11$  bzw. von Kraftfutter:  $104 \mu\text{g/g}$  uS); die hier in der Kontrollgruppe maximal erreichte LPS-Konzentration lag mit  $16,0 \mu\text{g/g}$  uS noch erheblich unter dem Wert, der nach Kraftfutteraufnahme als Minimumwert ( $28,5 \mu\text{g/g}$  uS) auftrat.

Vom Caecum zum Colon ventrale hin gingen die LPS-Gehalte im Chymus schon deutlich zurück ( $3$  bzw.  $72 \mu\text{g/g}$  uS nach Heu- bzw. Konzentratfütterung), erreichten im Colon dorsale ihre Minima ( $2,4$  bzw.  $30,3 \mu\text{g/g}$  uS), um schließlich im Colon descendens wieder leicht anzusteigen ( $4,8$  bzw.  $34,1 \mu\text{g/g}$  uS).

#### Diskussion:

##### - LPS-Gehalte im Inhalt des Verdauungskanal

Wie von anderen Spezies bekannt (Schwein: *Kamphues*, 1988, *Denell*, 1992; Kaninchen: *Herrmann* u. *Kamphues*, 1990) wurden im praecaecalen Bereich, d. h. Magen und Dünndarm, sehr viel niedrigere LPS-Konzentrationen als im Dickdarminhalt bestimmt. Dieses deckt sich mit mikrobiologischen Untersuchungen, denen zufolge im praecaecalen Bereich eher grampositive Keime dominieren und im postilealen Bereich gramnegative Bakterien in besonders hoher Dichte auftreten (*Geyer* u. *Drepper*, 1973).

Die im Magen- und Dünndarminhalt nachweisbaren LPS-Gehalte variieren insbesondere in Abhängigkeit von der Azidierung des Magenchymus und der möglichen Vermehrung gramnegativer Bakterien im Dünndarm.

Die hier im Mageninhalt nachgewiesenen unterschiedlichen LPS-Gehalte korrelieren mit den je nach Lokalisation differierenden pH-Werten (*Coenen*, 1992). Die nur wenig intensive Durchsäuerung des Chymus im Antrum-Bereich war dabei mit relativ hohen LPS-Konzentrationen gekoppelt, in Pylorusnähe wurden hingegen wesentlich niedrigere pH-Werte und parallel auch deutlich geringere LPS-Konzentrationen festgestellt, was sich mit Untersuchungen an Ferkeln (*Kamphues*, 1988) deckt. Offensichtlich führt eine intensive Azidierung des Magenchymus auch zur Elimination von gramnegativen Keimen und ihren Zellwand-

bestandteilen, die auch mit dem Futter (*Kamphues* et al., 1991) aufgenommen werden. Damit haben verschiedene vom Futter (Pufferkapazität) und von der Fütterung (Futtermenge/Zeiteinheit) ausgehende Einflüsse auf die Magen-chymusazidierung auch ihre Auswirkungen auf die im Chymus nachweisbaren LPS-Konzentrationen bzw. Keimzahlen. Die kraftfutterreiche Fütterung führte im Dünndarminhalt zu etwa 10fach höheren LPS-Konzentrationen. Hierbei handelte es sich vermutlich aber nicht um eine selektive Förderung der gramnegativen Keime, sondern eher um eine generelle Proliferation von Bakterien durch eine höhere Verfügbarkeit leicht abbaubarer Kohlenhydrate, da parallel nach Aufnahme der kraftfutterreichen Ration im Jejunum um den Faktor 5 bzw. im Ileum um den Faktor 20 höhere Milchsäurekonzentrationen nachgewiesen wurden (*Radicke*, 1992).

Die bei der sehr unterschiedlichen Fütterung differierenden LPS-Konzentrationen im Dünndarminhalt sind mit Sicherheit auch nicht Folge einer unterschiedlichen Chymusverdünnung, obwohl der Dünndarm-Chymus nach Heufütterung allgemein niedrigere Trockensubstanzgehalte aufwies (*Meyer*, 1992).

Die Hauptlokalisationen der mikrobiellen Verdauung des Pferdes, Caecum und Colon, wiesen erwartungsgemäß die höchsten LPS-Gehalte im Chymus auf. Aber anders als bei Kaninchen (*Herrmann* u. *Kamphues*, 1990) nach stärkereicher Fütterung bzw. bei Absetzferkeln nach Überfütterung mit einer getreidereichen Ration (*Kamphues*, 1988) beobachtet, führte die Aufnahme der kraftfutter- und damit stärkereicherer Ration zu deutlich höheren LPS-Konzentrationen im Dickdarminhalt als die Heufütterung. Ob es sich dabei um eine selektive Förderung gramnegativer Keime oder um eine generell höhere Keimdichte infolge eines höheren Substratangebots für die residente Flora handelte, ist nicht definitiv zu entscheiden; die im Dickdarmchymus insgesamt niedrigen Milchsäurekonzentrationen unterschieden sich jedenfalls nicht (*Radicke*, 1992). Andererseits lassen die höheren Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren nach Kraftfuttergabe eher auf eine generell geförderte mikrobielle Aktivität im Dickdarmchymus schließen.

*King* und *Gerring* (1988) stellten im Magen, Dünndarm, Caecum und Colon dorsale gesunder Pferde ähnliche Gehalte an LPS fest ( $4,7$ ,  $5,5$ ,  $70,0$  bzw.  $4,0 \mu\text{g/ml}$  Chymus) wie in den eigenen Untersuchungen, obwohl die verwendete Methode nicht völlig identisch war (Verzicht auf Erhitzen der Proben vor der Bestimmung). Die Beobachtungen von *Moore* et al. (1979) nach Verabreichung großer Mengen löslicher Stärke mit der Nasenschlundsonde zur experimentellen Auslösung einer Caecumacidose zeigen ebenfalls, daß der Gehalt an LPS im Caecumchymus zunimmt, wenn vermehrt Stärke zur Fermentation zur Verfügung steht. In dieser Untersuchung wurden, vermutlich infolge der weit höheren Stärkeverabreichung, allerdings noch erheblich höhere Gehalte beobachtet (bis zu  $500 \mu\text{g/ml}$  Chymus).

Vergleicht man die im Chymus von Pferden ermittelten LPS-Konzentrationen mit denen von Absetzferkeln

(Kamphues, 1988, Denell, 1992), so sind die Werte im gesamten Magen-Darm-Trakt sehr ähnlich, allerdings führte die Überfütterung mit einem stärkereichen Kraftfutter bei Schweinen sowohl im Dünn- als auch Dickdarminhalt zu reduzierten LPS-Gehalten und eher niedrigeren Keimzahlen gramnegativer Bakterien. Auch bei Kaninchen traten nach Aufnahme eines maisstärkereichen Futters (im Vergleich zu einer rohfaserreichen Diät) allgemein geringere LPS-Konzentrationen im Caecumchymus auf (Herrmann u. Kamphues, 1990), wobei aber auffällt, daß die LPS-Konzentrationen im Caecuminhalt von Kaninchen insgesamt deutlich niedriger liegen als bei Pferden (etwa 1 Fünftel bis 1 Zehntel der hier gemessenen Konzentrationen).

#### - Bedeutung intraluminaler LPS-Konzentrationen

Die physiologischerweise in den verschiedenen Abschnitten des Verdauungskanals unterschiedlich hohen Keimdichten und Anteile gramnegativer Bakterien in der Flora bedingen entsprechend differierende LPS-Konzentrationen. Erst bei Absterben und Lysis gramnegativer Bakterien werden LPS in großer Menge freigesetzt, von lebenden intakten Keimen hingegen werden sie nur in geringem Umfang nach außen abgegeben. Kommt es aber infolge einer Stasis oder einer Acidose zu einem massiven Zerfall gramnegativer Keime und der Freisetzung von LPS (= Endotoxine), so können bei forcierter Absorption auch extraenterale Effekte auftreten (Moore et al., 1979, Sprouse et al., 1987, King und Gerring, 1988) wie z. B. eine erhöhte Atemfrequenz, Unruhe, Ataxie, evtl. Kreislaufversagen und auch Hufrehe. Ob Pferde allein durch höhere LPS-Konzentrationen im Chymus für derartige Erkrankungen disponiert sind, ist sehr fraglich, da erst eine wesentlich forcierte Absorption aus dem Intestinaltrakt die Voraussetzung für solche Erkrankungen jenseits der Darmwand bildet. Vermutlich sind weniger die absoluten LPS-Konzentrationen im Chymus als vielmehr Bedingungen und Umfang ihrer Absorption von klinischer Relevanz, wie neuere Untersuchungen bei Ferkeln (Denell, 1992) vermuten lassen.

#### Literatur:

- Abrens, F. (1984): Messungen zur Fermentation im Dickdarm am Modell Miniaturschwein unter besonderer Berücksichtigung der Eiweißumsetzungen. Diss. Agr., Kiel 1984.
- Coenen, M. (1992): Beobachtungen zum Vorkommen von Magenulcera beim Pferd. Pferdeheilkunde, Sonderheft 188-191.
- Denell, S. (1992): Lipopolysaccharid-Konzentrationen im Verdauungskanal von Absetzferkeln unter verschiedenen Fütterungsbedingungen. Vet. Diss., Berlin 1992, in Vorber.
- Geyer, H., und Drepper, K. (1973): Mikrobielle Einwirkungen auf die Verdauung beim Pferd, in: Giesecke, D., und H. K. Henderickx (1973): Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung. BLV-Verlag München.
- Herrmann, A., und Kamphues, J. (1990): Parameter mikrobieller Aktivität im Verdauungskanal von Absetzkaninchen in Abhängigkeit vom Rohfaser- und Stärkegehalt des Futters. Proc. 7. Arb.tagung über Haltung und Krankheiten der Kaninchen, Pelztier und Heimtiere, Celle 1990, 103 - 111.
- Kamphues, J. (1986): Lipopolysaccharide in Futtermitteln - mögliche Bedeutung, Bestimmung und Gehalte - Übers. Tierernähr. 14, 131 - 156.
- Kamphues, J. (1988): Untersuchungen zu Verdauungsvorgängen bei Absetzferkeln in Abhängigkeit von Futtermenge und -zubereitung sowie von Futterzusätzen. Habil. Schrift, Tierärztl. Hochschule Hannover, 1988.
- Kamphues, J., Fimmen, H., Küstermann, S., und Meyer, H. (1991): Lipopolysaccharides in Feedstuffs for Horses. Equine Vet. Sci. 11, 36 - 41.
- King, J. N., und Gerring, E. L. (1988): Detection of endotoxin in cases of equine colic. Vet. Rec. 123, 269 - 271.
- Meyer, H. (1992): Intestinaler Wasser- und Elektrolytstoffwechsel des Pferdes. Pferdeheilkunde, Sonderheft 67-72.
- Moore, J. N., Garner, H. E., Berg, J. N., Sprouse, R. F. (1979): Intracecal endotoxin and lactate during the onset of equine laminitis, a preliminary report. Amer. J. Vet. Res. 40, 722 - 723.
- Radicke, S. (1992): persönliche Mitteilung.
- Sprouse, R. F., Garner, H. E. und Green, E. M. (1987): Plasma endotoxin levels in horses subjected to carbohydrate induced laminitis. Equine Vet. J. 19, 25 - 28.

Prof. Dr. J. Kamphues  
Institut für Tierernährung der FU Berlin  
Tierärztliche Fakultät  
Brümmerstraße 34  
D-1000 Berlin 33

Tab. 1: Versuchsbedingungen

Gruppe n	Heu 4	Kraftfutter 4
LM (kg)	147-311	151-243
Futtermittel	Heu <sup>1</sup>	Kraftfutter (90%) <sup>2</sup> + Heu (10%)
- Rohfaser (g/kg TS der Ration)	276	60,4
- verd. Rohprotein (g/kg TS der Ration)	138	87
tägl. Futtermenge (kg TS/100 kg LM)		
- Adaptationsphase	1,5	1,5
- vor der Schlachtung	1,25	1,25
Dauer der Futteraufnahme (Min.) (vor der Schlachtung)	150-300	40-70

<sup>1</sup> ergänzt durch Mineralstoffe und Vitamine

<sup>2</sup> 84,1 % Maisschrot, 12 % Weizenkleie und Min.-Vit.-Supplement, in Klammern Rationsanteile