

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielstellung der eigenen Untersuchungen und allgemeiner Überblick über das Versuchsvorhaben

Die vorliegende Arbeit sollte zur Klärung folgender Fragestellungen dienen:

1. Ermöglicht die Datenrekalkulation mit dem Softwareprogramm FAMOS (Fast Analysis and Monitoring of Signals) eine Betrachtung der respiratorischen Impedanz im Frequenzbereich < 5 Hz, und damit – im Vergleich zur Standardsoftware – eine exaktere Beurteilung der atmungsmechanischen Eigenschaften in der Lungenperipherie?
2. Welche pathophysiologischen Konsequenzen haben nicht-experimentell induzierte (spontan erworbene) Infektionen des respiratorischen Systems mit Chlamydien für die Lungenfunktion bei Schwein und Kalb?

Die im Rahmen dieser Arbeit anfallenden diagnostischen Untersuchungen fanden ausnahmslos im Friedrich-Loeffler-Institut [FLI], Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Jena statt.

In das Versuchsvorhaben wurden insgesamt 16 Schweine und 25 Kälber einbezogen.

Der Untersuchungszeitraum betrug für jedes Einzeltier sechs Monate. Während dieses Zeitraumes wurden in regelmäßigen Abständen klinische, serologische und lungenfunktionsdiagnostische Untersuchungen am Einzeltier vorgenommen (Abschnitt 3.3).

Zur Analyse der Lungenfunktion stand ein Impuls-Oszilloresistometrie-System (IOS) zur Verfügung, dessen Anwendung an beiden Tierarten unter Abschnitt 3.4 erläutert ist. Zur Berechnung der respiratorischen Impedanz im Frequenzbereich unter 5 Hz wurden die gemessenen IOS-Originaldaten (die sich lediglich auf den Frequenzbereich 5 - 35 Hz beziehen) nach Abschluss einer jeden Lungenfunktionsmessung mit Hilfe der Software FAMOS rekalkuliert (Abschnitt 3.4.5). Im Alter von ca. sieben Monaten wurde jedes Tier euthanasiert und pathologisch-histologisch untersucht (Abschnitt 3.6).

Die Einteilung der Tiere in Versuchsgruppen erfolgte *post mortem*. Entscheidend hierfür war der Nachweis von chlamydialer DNA mittels PCR in Gewebeproben des Tierkörpers (Abschnitte 3.6 und 3.7.1). Zusätzlich wurden serologische Untersuchungen (Abschnitt 3.7.1) sowie PCR-Untersuchungen an *intra vitam* entnommenen Augen-, Nasen- und Kottupfern durchgeführt (Abschnitte 3.5 und 3.7.1). Ergänzend erfolgten differenzialdiagnostische

Untersuchungen zum Nachweis bzw. Ausschluss anderer bakterieller und/oder viraler respiratorischer Infektionen (Abschnitt 3.5 und 3.7.2).

Mit Hilfe mathematisch-statistischer Methoden (Abschnitt 3.8) wurde zunächst geprüft, ob die mittels FAMOS rekalkulierten Daten der respiratorischen Impedanz (im Vergleich mit den IOS-Originaldaten) die Lungenfunktion der untersuchten Schweine und Kälber adäquat widerspiegeln. Hieraus leitete sich die weitere Nutzung der Software FAMOS für gezielte Untersuchungen zum Einfluss einer chlamydialen Infektion auf die funktionellen Eigenschaften der Lungenperipherie bei den untersuchten Tierarten ab (Fragestellung 1). Zur Beantwortung der Fragestellung 2 wurden für jede Spezies klinische und lungenfunktionsdiagnostische Kenngrößen von Tieren, bei denen keine Chlamydien nachgewiesen werden konnten (Chl -), mit den entsprechenden Kenngrößen von solchen Tieren statistisch verglichen, bei denen ein positiver Chlamydiennachweis (Chl +) geführt wurde.

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Schweine

In die Untersuchungen wurden 16 Schweine der Deutschen Landrasse einbezogen. Versuchstierlieferant war die Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Nach Angaben des Lieferanten stammten die Tiere aus einem seuchenhygienisch geschlossenen Betrieb, der eine standardisierte und gesundheitlich kontrollierte Zucht betreibt. Es erfolgte kein Tierzukauf, lediglich Ebersperma für die Realisierung der Reproduktion wurde zugekauft.

Das Absatzalter im Herkunftsbetrieb der Tiere betrug 26 Tage. Ab dem 5. Lebenstag wurde ein Ferkelaufzuchtfutter (prestarter) zugefüttert. Nach dem Absetzen erhielten die Tiere ein Ferkelvormastfutter (starter) mit einem 10 %-igen Ergänzungsfutteranteil. In den Futtermitteln waren keine antibiotischen Zusätze enthalten.

Die Gesundheitsüberwachung im Herkunftsbetrieb erfolgte regelmäßig durch parasitäre Prophylaxe, serologische Überwachung und Impfungen.

Die Parasitenprophylaxe erfolgte mit Dectomax per Injektion vor der Abferkelung, sowie einmal jährlich als Bestandsbehandlung. Viermal jährlich wurde der Schweinebestand stichprobenartig serologisch überwacht. Nach Angaben des Versuchstierlieferanten entspricht das Untersuchungsspektrum dem SPF-Standard für Schweine der Versuchstierhaltung des Virchowklinikums Berlin, wobei die konkreten labordiagnostischen

Untersuchungen im Thüringer Landesuntersuchungsamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Standort Bad Langensalza, durchgeführt wurden. Vorberichtlich war keine Information über das Vorhandensein von Chlamydien oder chlamydial-bedingten Gesundheitsstörungen im Herkunftsbestand der Schweine verfügbar.

Die Schweine wurden im Alter von 19 - 31 Tagen angekauft und in Gruppen zu drei bis fünf Tieren eingestallt. Alle Schweine waren weiblichen Geschlechts.

Das Einstallungsgewicht (MW \pm SD) betrug $9,3 \pm 1,3$ kg (Spannweite: 7,4 - 11,4 kg).

Die Haltung und Fütterung erfolgte entsprechend der Verordnung zum Schutz von Schweinen bei Stallhaltung in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Februar 1994. Gefüttert wurde zweimal täglich mit demselben kommerziell verfügbaren Futter, das die Tiere im Herkunftsbetrieb erhielten (beginnend mit zweimal täglich 50 g/Tier Ferkelvormastfutter, gesteigert entsprechend Alter und Lebendmasse bis 1050 g/Tier pelletiertes Futter zu Versuchsende). Wasser stand *ad libitum* aus automatischen Selbsttränken zur Verfügung.

Mit Einstellung in das Tierhaus des Jenaer Standortes des FLI wurde jedes Tier in ein routinemäßiges Einstellungsmonitoring einbezogen, das in Abbildung 2 schematisch dargestellt ist. Die klinische Überwachung erfolgte zweimal täglich durch das die Tiere betreuende Personal und umfasste die Kontrolle der Futteraufnahme und des Allgemeinverhaltens, die Ermittlung der Rektaltemperatur sowie die Beurteilung von eventuell vorhandenem Durchfall, Augen- oder Nasenausfluss, Husten. Bei jeglichen Symptomen mit Verdacht auf eine Erkrankung wurde der verantwortliche Tierarzt benachrichtigt. Nach einem Quarantänisierungszeitraum von zehn Tagen und dem Vorliegen der Ergebnisse des Einstellungsmonitorings (Tab. 2) wurden die Tiere in das Versuchsvorhaben einbezogen, die aufgrund der täglichen klinischen Untersuchungen als „klinisch unauffällig“ (d.h. ohne Symptome einer klinisch manifesten Erkrankung) eingestuft werden konnten.

Tab. 2: Ergebnisse des Einstallungsmonitorings bei den 16 untersuchten Schweinen

	Ifd. Tier-Nr.	Tier-Nr.	Alter in Tagen	KM in kg	Geschlecht	Salmonella spp.			
						Kottupfer (n = 2/Tier)	Nasentupfer (n = 3/Tier)	Pasteurella spp. (P.) Nasentupfer (n = 3/Tier)	Haemophilus spp. (H.) Nasentupfer (n = 3/Tier)
Gruppe I	1	391	26	11,0	w	negativ	negativ	<i>P. multocida</i> (2/3)	<i>H. parasuis</i> (3/3)
	2	392	25	9,4	w	negativ	negativ	<i>P. multocida</i> (3/3)	<i>H. parasuis</i> (2/3)
	3	394	25	9,8	w	negativ	negativ	<i>P. multocida</i> (1/3)	<i>H. parasuis</i> (2/3)
	4	395	26	9,0	w	negativ	negativ	<i>P. multocida</i> (1/3)	<i>H. parasuis</i> (1/3)
	5	397	25	11,4	w	negativ	negativ	<i>P. multocida</i> (1/3)	<i>H. parasuis</i> (3/3)
	6	399	25	11,4	w	negativ	negativ	negativ	<i>H. parasuis</i> (1/3)
	7	199	26	7,8	w	negativ	negativ	negativ	negativ
Gruppe II	8	200	26	7,6	w	negativ	negativ	negativ	<i>H. parasuis</i> (1/3)
	9	396	25	11,0	w	negativ	negativ	<i>P. multocida</i> (1/3)	<i>H. parasuis</i> (3/3)
	10	207	19	7,4	w	negativ	negativ	negativ	negativ
	11	203	31	8,8	w	negativ	<i>M. hyorhinis</i> (1/3)	<i>P. multocida</i> (1/3)	negativ
Gruppe III	12	208	22	9,0	w	negativ	negativ	<i>P. multocida</i> (1/3)	negativ
	13	204	31	9,4	w	negativ	<i>M. hyorhinis</i> (2/3)	negativ	negativ
	14	205	31	8,2	w	negativ	<i>M. hyorhinis</i> (2/3)	negativ	<i>H. parasuis</i> (1/3)
	15	198	27	8,8	w	negativ	<i>M. hyorhinis</i> (1/3)	<i>P. multocida</i> (1/3)	negativ
	16	202	24	8,4	w	negativ	negativ	negativ	negativ

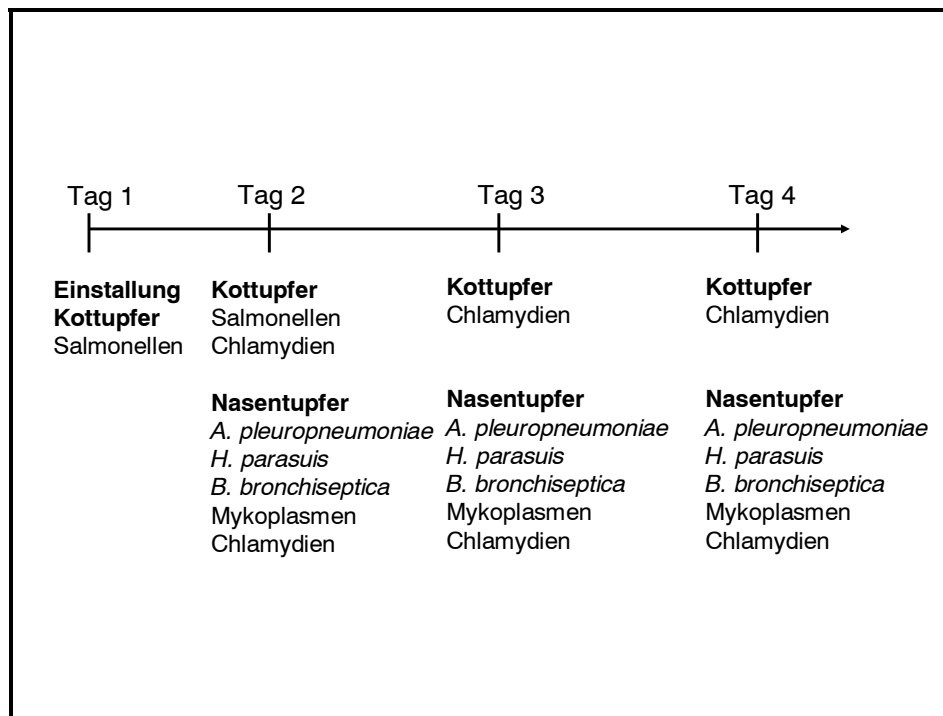


Abb. 2: Schematische Darstellung des Einstellungsmonitorings beim Schwein

3.2.2 Kälber

Die in das Versuchsvorhaben einbezogenen 25 Kälber stammten aus verschiedenen Erzeugerbetrieben. Zwölf Kälber stammten aus der Agrargenossenschaft Pfiffelbach (Thüringen). In diesem Betrieb gab es vorberichtlich keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Chlamydien-assoziierten Problemen der Tiergesundheit. Weitere 13 Tiere wurden aus verschiedenen Betrieben Nordrhein-Westfalens aufgekauft. Die Auswahl der Betriebe erfolgte anhand der Beurteilung des Hoftierarztes, der in diesen Betrieben Chlamydien-assoziierte Erkrankungen vermutete. Die Haltungsbedingungen in den einzelnen Betrieben waren sehr unterschiedlich und sind, soweit bekannt, kurz in Tabelle 4 aufgeführt. Bei den Kälbern handelte es sich um 21 Tiere der Rasse Holstein Schwarzbunte, drei Tiere der Kreuzung Milchrind x Milchrind und ein Tier der Rasse Holstein Rotbunte.

Das Alter der 25 Kälber betrug bei Einnahme 20 ± 5 Tage, die Körpermasse betrug $44,9 \pm 6,5$ kg. Es handelte sich um 19 weibliche und sechs männliche Kälber (Tab. 3).

Die Aufstallung der Kälber erfolgte in Laufställen mit Gruppen von drei bis fünf Tieren auf Stroh-Einstreu und entsprach der gültigen Verordnung zum Schutz von Kälbern bei der Haltung (Kälberhaltungsverordnung) in der Fassung vom 30. Dezember 1997.

Die Tiere wurden altersgerecht mit kommerziell verfügbaren Milchaustauschern getränkt, beginnend mit drei Mahlzeiten täglich, die etwa 4 - 6 Wochen nach Einstellung auf zwei Tränkmahlzeiten je Tag reduziert und der Lebendmasse entsprechend bis auf 4 Liter/Mahlzeit erhöht wurden. An Diarrhoe erkrankte Tiere erhielten statt Milchaustauscher die Diättränke Bio-Floracid® (Fa. Albrecht) sowie zwischen den regulären Mahlzeiten die Elektrolyttränke Glycostar® (WDT, Garbsen). Heu und Trinkwasser (aus Selbsttränken) standen jederzeit *ad libitum* zur Verfügung.

Auch die Kälber wurden mit der Einstellung in das Tierhaus einem individuellen Einstellungsmonitoring unterzogen, das für diese Tierart schematisch in Abbildung 3 dargestellt ist. Die Ergebnisse des Einstellungsmonitorings sind in Tabelle 3 dargestellt. Die zweimalige tägliche klinische Überwachung eines jeden Kalbes erfolgte durch das für die Betreuung der Tiere verantwortliche Pflegepersonal in Analogie zu dem bereits für Schweine beschriebenen Prozedere. Die Kälber wurden nach einem Quarantänisierungszeitraum von 10 Tagen in die Studie einbezogen.

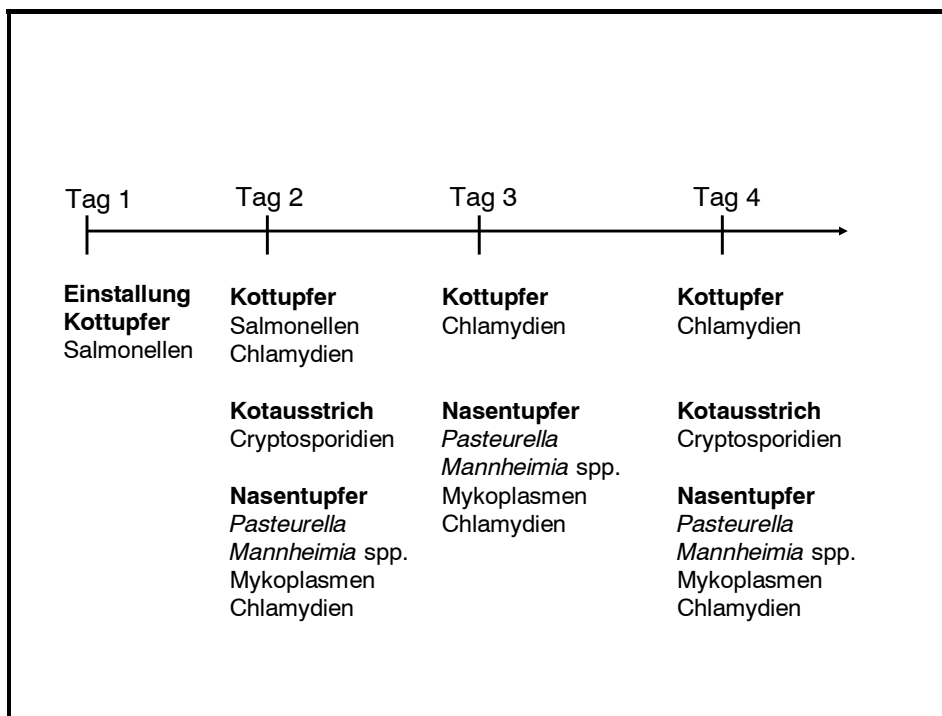


Abb. 3: Schematische Darstellung des Einstellungsmonitorings beim Kalb

Tab. 3: Ergebnisse des Einstallungsmonitorings bei den 25 untersuchten Kälbern

Ifd. Tier-Nr.	Tier-Nr.	Alter in Tagen	KM in kg	Geschlecht	Salmonella spp.		Cryptosporidien		Mycoplasma spp. (M.)		Pasteurella spp. (P.)	
					Kottupfer (n = 2/Tier)	Kottupfer (n = 2/Tier)	Kottupfer (n = 2/Tier)	Kottupfer (n = 2/Tier)	Nasentupfer (n = 3/Tier)	Nasentupfer (n = 3/Tier)	Nasentupfer (n = 3/Tier)	Nasentupfer (n = 3/Tier)
Gruppe I	1	0001	23	57,2	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovirhinis</i> (3/3)	negativ	negativ	
	2	0002	22	46,8	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovirhinis</i> (3/3)	negativ	negativ	
	3	0003	26	55,0	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovis</i> <i>M. bovirhinis</i> <i>M. arginini</i> (3/3)	negativ	negativ	
	4	0004	24	48,0	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovirhinis</i> (3/3)	negativ	negativ	
	5	0005	22	52,4	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovirhinis</i> (2/3)	negativ	negativ	
	6	0006	22	51,0	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovirhinis</i> (3/3)	negativ	negativ	
	7	0007	15	42,0	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovirhinis</i> (2/3)	negativ	negativ	
	8	0008	20	47,2	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovis</i> (3/3)	negativ	negativ	
	9	0009	27	50,2	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovis</i> (2/3)	negativ	negativ	
	10	0010	17	51,4	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovis</i> (2/3)	negativ	negativ	
	11	0011	18	43,4	w	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovis</i> (3/3)	negativ	negativ	
	12	0012	21	48,4	w	<i>S. thyphimurium</i> Impfstamm	positiv	positiv	<i>M. bovis</i> (2/3)	negativ	negativ	
Gruppe II	13	0464	15	48,6	m	negativ	positiv	positiv	<i>M. bovirhinis</i> (1/3)	<i>P. multocida</i> (1/3)	<i>P. multocida</i> (1/3)	
	14	0465	23	35,4	w	negativ	positiv	positiv	negativ	<i>P. multocida</i> (1/3)	<i>P. multocida</i> (1/3)	
	15	0466	23	34,5	w	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	
	16	0467	9	37,8	w	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	
	17	0468	10	48,0	w	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	
	18	0469	10	40,0	m	negativ	negativ	negativ	<i>M. bovirhinis</i> (2/3)	negativ	negativ	
	19	0470	26	47,2	m	negativ	negativ	negativ	<i>M. bovirhinis</i> (1/3)	<i>P. multocida</i> (1/3)	<i>P. multocida</i> (1/3)	
	20	0471	25	41,4	m	negativ	negativ	negativ	negativ	<i>P. multocida</i> (3/3)	<i>P. multocida</i> (3/3)	
	21	0473	15	38,0	w	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	
	22	0474	15	32,4	w	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	
	23	0475	23	42,0	m	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	<i>P. multocida</i> (1/3)	
	24	0476	22	44,6	m	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	
	25	0477	23	39,2	w	negativ	negativ	positiv	positiv	<i>A. laidlawii</i> (2/3)	negativ	

Tab. 4: Haltung und Ankauf der Kälber

Kalb (Ifd. Nr.)	Tiernummer (FLI)	Herkunftsbetrieb	Haltungsbedingungen im Herkunftsbetrieb
01-12	0001-0012	Agrargenossenschaft Pfiffelbach (Thüringen)	Laufstall mit Stroheinstreu
13	0464	P. Kuck (NRW)	nicht bekannt
14, 15,	0465, 0466	F. Mey (NRW)	abgetrennte große Laufställe mit Stroheinstreu
16, 17	0467, 0468	A. Klein (NRW)	Schleppdach, Kälberboxen aus Holz mit Strohunterlage
18	0469	F. Erasmi (NRW)	nicht bekannt
19, 20	0470, 0471	G. Eckeberg (NRW)	abgetrennte große Laufställe mit Stroheinstreu
21	0473	F. Mey (NRW)	abgetrennte große Laufställe mit Stroheinstreu
22	0474	R. Baumgarten (NRW)	abgetrennter Laufstall mit Stroheinstreu
23, 24, 25	0475, 0476, 0477	W. Viethen (NRW)	nicht bekannt

3.3 Studienprotokolle

3.3.1 Schweine

Der individuelle Untersuchungszeitraum je Tier erstreckte sich über 24 Wochen und ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Nach Abschluss des Quarantänisierungszeitraumes wurde jedes der 16 in das Versuchsvorhaben einbezogenen Schweine in der 5. Lebenswoche erstmalig lungenfunktionsdiagnostisch untersucht (Versuchszeitpunkt 1). Bis zur 27. Lebenswoche folgte im wöchentlichen Abstand ein weiterer Lungenfunktionstest pro Tier, so dass jedes Schwein während des sechsmonatigen Untersuchungszeitraums an insgesamt 23 lungenfunktionsdiagnostischen Tests teilnahm (entspricht 23 Versuchszeitpunkten).

Ebenfalls einmal wöchentlich wurde die Körpermasse eines jeden Tieres durch Wiegen unmittelbar vor Durchführung des Lungenfunktionstests ermittelt. Die Spannweite der Körpermasse innerhalb der Tiergruppe umfasste während des gesamten Untersuchungszeitraums den Bereich von 7,4 kg (leichtestes Tier zum Zeitpunkt 1) bis zu 100,7 kg (schwerstes Tier zum Zeitpunkt 23). Nach dem letzten Lungenfunktionstest in der 27. Lebenswoche wurde jedes Tier euthanasiert und der Sektion zugeführt.

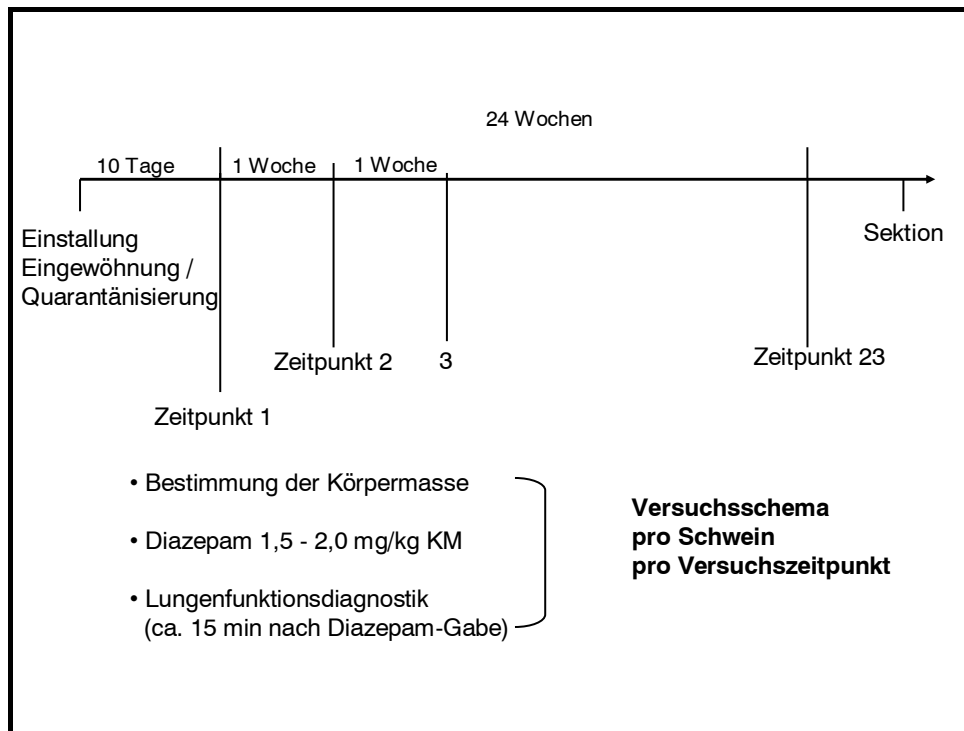


Abb. 4: Schematische Darstellung des Studienprotokolls für Schweine

3.3.2 Kälber

Der individuelle Untersuchungszeitraum je Kalb erstreckte sich ebenfalls über 24 Wochen und wird schematisch durch Abbildung 5 widergespiegelt.

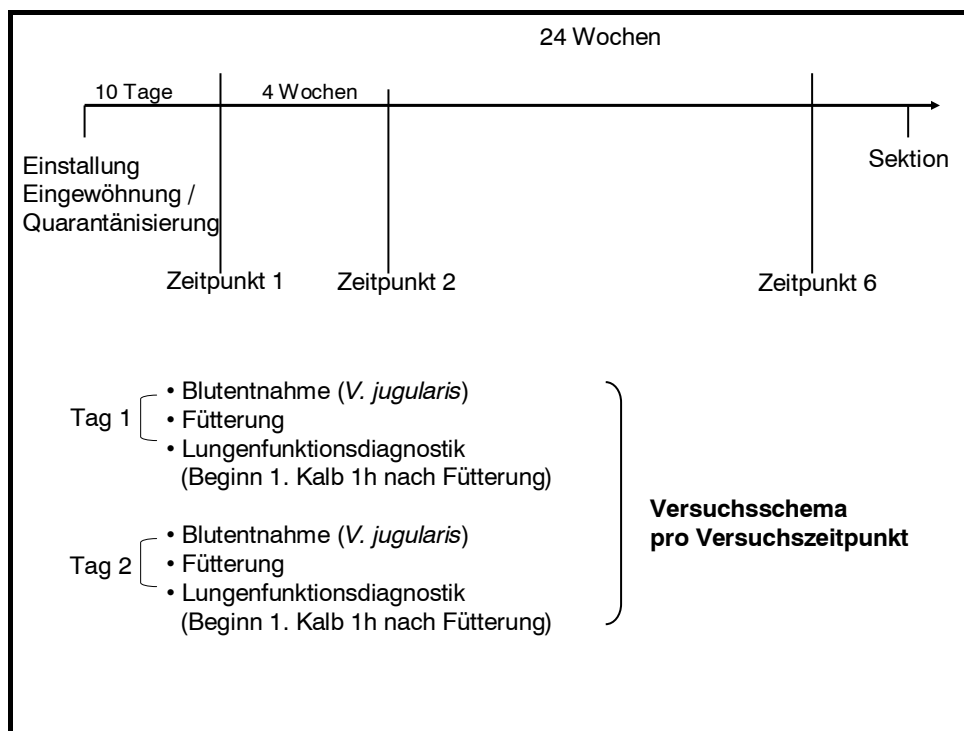


Abb. 5: Schematische Darstellung des Studienprotokolls für Kälber

Nach Abschluss des Quarantänisierungszeitraumes wurde jedes der 25 Kälber in das Versuchsvorhaben einbezogen. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der erstmaligen Lungenfunktionsdiagnostischen Untersuchung (Versuchszeitpunkt 1) mindestens 30 Tage alt. Bis zum 7. Lebensmonat erfolgte im Abstand von vier Wochen ein weiterer Lungenfunktionstest pro Tier. Die Lungenfunktionstests wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, so dass jedes Kalb während des sechsmonatigen Untersuchungszeitraums an insgesamt zwölf lungenfunktionsdiagnostischen Tests teilnahm (entspricht sechs Versuchszeitpunkten).

Die Körpermasse eines jeden Tieres wurde durch Wiegen am Tag vor Durchführung der Lungenfunktionstests ermittelt. Die Spannweite der Körpermasse innerhalb der Tiergruppe umfasste während des gesamten Untersuchungszeitraumes den Bereich von 39,5 kg (leichtestes Tier zum Zeitpunkt 1) bis zu 157,8 kg (schwerstes Tier zum Zeitpunkt 6). Während des gesamten Untersuchungszeitraumes wurden im monatlichen Abstand Augentupfer (insgesamt 5 Augentupfer/Tier) für ergänzende PCR-Untersuchungen zum Chlamydien-Nachweis entnommen. An beiden aufeinander folgenden Tagen der Lungenfunktionstests wurden vor der Morgenfütterung Blutproben für die serologische Differenzialdiagnostik entnommen. Im Anschluss an den sechsmonatigen Untersuchungszeitraum wurden die Tiere euthanasiert und der Sektion zugeführt, am Tag der Euthanasie wurden abschließende Nasentupfer- und serologische Proben zur Chlamydien- und Differenzialdiagnostik entnommen.

3.4 Lungenfunktionsdiagnostische Untersuchungen mittels Impuls-Oszilloresistometrie

3.4.1 Gerätetechnische und räumliche Voraussetzungen

Für die lungenfunktionsdiagnostischen Tests wurde das kommerziell verfügbare Gerät „Masterscreen-IO“ der Firma VIASYS Healthcare, Höchberg verwendet. Hierbei steht die Abkürzung IO für Impuls-Oszilloresistometrie-System. Die dem IO zugehörige Software „Labmanager Version 4.34“ ermöglichte die Steuerung des Messablaufs und die Erfassung der Messwerte mit dem an das System angeschlossenen Personalcomputer (PC).

Die Anwendbarkeit des Verfahrens der Impuls-Oszilloresistometrie und die Nutzbarkeit des Gerätesystems „Masterscreen-IO“ zur Lungenfunktionsdiagnostik wurde im Vorfeld dieser Untersuchungen sowohl für Schweine (Klein und Reinhold, 2001; Klein et al., 2003) als auch für Kälber (Reinhold et al., 1995, 1996, 1997b, c, 1998a, b) tiefgreifend validiert.

Innerhalb des Tierhauses diente ein speziell eingerichteter Untersuchungsraum als Lungenfunktionslabor. In diesem befanden sich unter anderem der auf einem transportablen Wagen montierte (und damit fahrbare) IOS-Messplatz inklusive PC-Arbeitsplatz sowie Fixierungseinrichtungen für die zu untersuchenden Tierarten. Entsprechend der Kopfformen und -größen der unterschiedlichen Tiere standen verschiedene Atmungsmasken aus durchsichtigem Plexiglas (Heiland VET GmbH, Hamburg) zur Verfügung. Durch Gummimanschetten wurde sichergestellt, dass die Maske sowohl am Kopf des jeweiligen Tieres als auch am Anschluss zum IOS-Adapter dicht geschlossen war.

3.4.2 Durchführung der impulsoszillometrischen Untersuchungen an beiden Tierarten

Zur Fixierung der **Schweine** während der lungenfunktionsdiagnostischen Untersuchungen waren im Eigenbau hergestellte Hängematten aus Segeltuch mit vier Öffnungen für die Beine des jeweiligen Tieres vorhanden (Abb. 6). Eine der Größe des zu untersuchenden Tieres entsprechende Matte wurde in einer entsprechenden Vorrichtung so aufgespannt, dass bei korrekter Positionierung des Tieres die Klauen weder den Boden noch die Seitenwände der Vorrichtung erreichen konnten.

Vor Beginn der impulsoszillometrischen Messungen wurde das zu untersuchende Schwein gewogen und durch intramuskuläre Applikation von Diazepam (Faustan®, AWD, Dresden) in einer Dosierung von 1,5 – 2,0 mg/kg KM leicht sediert. Nach Wirkungseintritt erfolgte die Platzierung des Probanden in der Hängematte sowie das Aufsetzen der Atmungsmaske. Bei auftretender Unruhe konnten durch den assistierenden Tierpfleger die Vordergliedmaßen leicht per Hand fixiert werden.

Jeder Lungenfunktionstest pro Schwein und Zeitpunkt umfasste die Aufzeichnung von zwei störungsfreien IOS-Einzelmessungen von je 60 Sekunden Dauer, denen eine ruhige und gleichmäßige Atmung des Tieres zugrunde lag.

Die impulsoszillometrischen Untersuchungen an **Kälbern** erfolgten ausnahmslos am unседierten Tier. Das jeweils zu untersuchende Kalb wurde in den Messraum geführt und hier zunächst kurz stehen gelassen, um sich an die Umgebung adaptieren zu können. Dann wurde dem Tier die Atmungsmaske aufgesetzt. Nach einer weiteren Ruhepause von etwa fünf Minuten zur Adaptation wurde mit der Aufzeichnung der lungenfunktionsdiagnostischen Messungen begonnen. Die Kälber standen hierbei aufrecht in physiologischer Körperhaltung (Abb. 7).

Bei den Kälbern umfasste jeder Lungenfunktionstest pro Tier und Zeitpunkt die Aufzeichnung von drei störungsfreien IOS-Einzelmessungen von je 60 Sekunden Dauer.

Messungen, die durch Artefakte wie Abwehrbewegungen, Kaubewegungen in der Maske, Schnarchen, Grunzen oder unregelmäßige Atmungszüge behaftet waren, wurden verworfen und nicht in die weitere Auswertung einbezogen.



Abb. 6: Anwendung der Impuls-Oszilloresistometrie beim Schwein

3.4.3 Vorbereitung des Mess-Systems und Durchführung der IOS-Einzelmessungen an beiden Tierarten

Vor Beginn der eigentlichen IOS-Messungen erfolgte täglich die Gerätekalibrierung und anschließende Qualitätskontrolle. Hierzu wurden an jedem Messtag die aktuellen Daten für Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftdruck im Untersuchungsraum elektronisch erfasst. Die Steuerungs- und Auswertesoftware des Mess-Systems führte eine automatische Korrektur der Messergebnisse auf die aktuellen Umweltbedingungen durch. Anschließend erfolgte manuell die Volumen-Kalibrierung des IOS-Gerätes mit Hilfe einer geeichten 2-Liter-Pumpe. Zur Qualitätssicherung der Kalibrierung wurde eine Probemessung an einem Referenzwiderstand (Siebwiderstand) mit bekannter Resistance ($0,2 \text{ kPa l}^{-1} \text{ s}$) und Reactance ($0,0 \text{ kPa l}^{-1} \text{ s}$) durchgeführt.

An den einzelnen Untersuchungstagen wurden die IOS-Messungen jeweils gegen 8:15 Uhr begonnen, so dass die zeitliche Differenz zwischen der Morgenfütterung der Tiere (erfolgte regulär zwischen 7:00 und 7:15 Uhr) und dem Beginn der lungenfunktionsdiagnostischen Untersuchungen mindestens eine Stunde betrug. Wenn an einem Messtag mehrere Tiere

untersucht werden mussten, so wurde die Reihenfolge der zu untersuchenden Tiere zu den unterschiedlichen Zeitpunkten stets beibehalten, um den Abstand zur letzten Fütterung weitgehend zu standardisieren. Die den Probanden vertrauten Tierpfleger begleiteten die Tiere in das Lungenfunktionslabor, um eventuellen zusätzlichen Stress durch fremde Personen zu vermeiden.



Abb. 7: Impulsoszillometrischer Messplatz und Anwendung beim Kalb

Jede IOS-Einzelmessung umfasste bei beiden Tierarten pro Tier und Zeitpunkt eine Dauer von 60 Sekunden. Während dieser Messung wurden drei Testsignale (Impulse) pro Sekunde generiert (d.h., innerhalb der 60 Sekunden Messdauer wurden der spontanen Atmung des Probanden insgesamt 180 Impulse aufgeprägt, wobei der zeitliche Abstand zwischen zwei Impulsen 330 ms betrug). Die Auswertung der Antwortreaktion des respiratorischen Systems auf jeden einzelnen Impuls erfolgte mit 32 Abtastpunkten (Stützstellen). Da das zeitliche Intervall zwischen zwei Stützstellen 5 ms beträgt, ergibt sich hieraus eine Auswertzeit pro Impuls von 160 ms.

3.4.4 Ermittlung der IOS-Originaldaten

Der Lautsprecher sendet impulsweise abwechselnd vorwärts und rückwärts gerichtete Druckstöße aus, auf die das respiratorische System antwortet und die dann analysiert werden. Zur Messung der respiratorischen Impedanz wurden drei Impulse pro Sekunde und 32 Abtastpunkte (Stützstellen) pro Impuls verwendet. Eine Stützstelle ist ein Messwertpaar, das aus Druck (P) und Atmungsstromstärke (V') besteht. Mittels Fast-Fourier-Transformation

werden die Resistance und Reactance als beschreibende Größen der respiratorischen Impedanz bei 5 - 35 Hz errechnet und in Abhängigkeit von der Frequenz graphisch dargestellt.

Berechnet wurden die Parameter:

- Resistance 3; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 Hz
- Reactance 3; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 Hz
- Kohärenz 3; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 Hz
- Atemzugvolumen
- Atmungsfrequenz.

3.4.5 Rekalkulation der IOS-Originaldaten mittels FAMOS

Die Software FAMOS (**F**ast **A**nalysis and **M**onitoring **O**f **S**ignals) ist ein Programm zur Analyse und Beurteilung von Messergebnissen, das zur Offline-Auswertung genutzt werden kann.

Aufgrund unterschiedlicher Auswahlkriterien der Impulse und verschiedener Berechnungsmodi für die Kohärenz ermöglicht die Software FAMOS eine exaktere Aussage über die Messung. Des Weiteren eröffnet die Nutzung eines speziellen Algorithmus (Smith, unveröffentlicht) die Möglichkeit, die atmungsmechanischen Variablen Resistance, Reactance und ihre entsprechende Kohärenz für Frequenzen < 5 Hz zu ermitteln. Für die Rekalkulation der gemessenen IOS-Originaldaten wurde ein Algorithmus mit drei Impulsen pro Sekunde und 32 Abtastpunkten genutzt.

Für die Rekalkulation der gemessenen IOS-Originaldaten ist jeder Originalfile in die Auswertung eingegangen. Hierzu wurde im Anschluss an die lungenfunktionsdiagnostischen Messungen jeder der gemessenen IOS-Originalfiles mittels der Software FAMOS rekalkuliert, um die niedrigen Frequenzen zu erschließen. Aufgrund des FAMOS-spezifischen Algorithmus wurden respiratorische Resistance, respiratorische Reactance und die Kohärenz für die einzelnen Frequenzen zwischen 1 - 10 Hz sowie 12, 15 und 20 Hz neu berechnet.

3.5 Gewinnung von Probenmaterial *in vivo*

Augentupfer

Augentupfer für die bakteriologische Untersuchung wurden vom Lidrand bzw. bei vorhandenem Ausfluss vom erkrankten Bereich entnommen. Verwendet wurden die

handelsüblichen sterilen Watte- oder Zellstofftupfer, welche ebenfalls die Gewinnung von Nasensekret ermöglichen.

Nasentupfer

Die Entnahme nasaler Tupferproben (Nasentupferproben) für die bakteriologische Untersuchung erfolgte stets vor der Fütterung (um Fremdkontaminationen zu vermeiden) und nach steriler Reinigung der Nasenlöcher. Verwendet wurden die handelsüblichen am Holzstab befestigten Watte- oder Zellstofftupfer, die die Gewinnung von Nasensekret ermöglichen.

Kottupfer, Kotabstriche

Kottupfer und Kotabstriche wurden im Rahmen des Einstellungsmonitorings entnommen. Zur Untersuchung auf Salmonellen wurden sterile Wattetupfer verwendet, die anschließend in ein flüssiges Anreicherungsmedium verbracht wurden. Zur Cryptosporidiendiagnostik wurden mittels sterilem Wattetupfer Kotabstriche genommen und anschließend auf einem Objektträger ausgestrichen.

Venöse Blutproben

Die Schweine wurden beim Einstellungsmonitoring sowie morgens vor der Sektion nüchtern geblutet. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der *V. jugularis*. Entnommen wurde eine 10 ml Monovette® Serum, Sarstedt, Nürnberg für die Chlamydiendiagnostik.

Die Kälber wurden beim Einstellungsmonitoring sowie am Versuchstag morgens und vor der Sektion nüchtern geblutet. Die Blutentnahme erfolgte aus der *V. jugularis*. Entnommen wurden stets vier Monovetten® Serum, Sarstedt, Nürnberg (Volumen je 10 ml). Alle Blutproben wurden nach der Blutentnahme aufbereitet, hierzu wurden sie 15 Minuten bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert (Labofuge 400 R, Kendro, Hanau) und das so gewonnene Serum wurde portioniert und in Eppendorfgläser pipettiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.6 Tötung der Tiere und Gewinnung von Probenmaterial *ex vivo*

3.6.1 Euthanasie der Tiere

Die Schweine wurden nach Versuchsende mit Surital® (Wirkstoff Thiamylal-Natrium; 20 ml/Tier) der Fa. Pharmacia & Upjohn GmbH euthanasiert.

Die Kälber wurden nach Beendigung des Versuches mit Trapanal® 2,5 g; Altana Pharma Deutschland GmbH (Wirkstoff Thiopental-Natrium; 1,5 g/100 kg) euthanasiert.

3.6.2 Gewinnung von Probenmaterial und pathomorphologische Untersuchung beim Schwein

Die Lunge wurde im Zusammenhang mit Luftröhre, Schlund und Zunge entnommen und auf morphologische Veränderungen untersucht. Makroskopisch sichtbare Veränderungen wurden auf einem speziellen Formblatt (Lungenstempel auf Millimeterpapier) dokumentiert.

Gewebeproben wurden aus folgenden Organen entnommen:

- Tonsille und Milz
- je eine Probe aus dem linken und rechten cranialen und caudalen Spitzenlappen sowie aus dem linken und rechten Basislappen.

Diese Gewebeproben wurden mittels PCR auf *Chlamydiaceae* untersucht.

3.6.3 Gewinnung von Probenmaterial und pathomorphologische Untersuchung beim Kalb

Die pathologisch-anatomische Untersuchung basierte auf Adspektion und Palpation der Lunge. Vorgefundene adspektorische und palpatorische Veränderungen wurden in Art, Aussehen und Ausdehnung auf einem speziellen Formblatt (Lungenstempel auf Millimeterpapier) zeichnerisch und schriftlich dokumentiert.

Zusätzlich wurden bei den untersuchten Kälbern makroskopisch veränderte Bezirke angeschnitten und zur bakteriologischen Beurteilung gegeben.

Folgende Gewebeproben wurden entnommen und für die diagnostische Auswertung herangezogen:

PCR / Anzucht Medium

- Lunge: linker und rechter cranialer und caudaler Spitzenlappen, linker und rechter Basislappen, rechter Mittellappen
- Tonsille, Milz, Aorta, Lungenlymphknoten, *A. pulmonalis*, Darmlymphknoten, Dünndarm, Dickdarm, Enddarm

Bakteriologie

- Lunge: linker caudaler Spitzenlappen, rechter Mittellappen
- Trachea, Tonsille, Lungenlymphknoten

Die Stellen der entnommenen Lungenproben wurden in den zuvor beschriebenen Formblättern dokumentiert.

Ergänzende pathologisch-histologische Untersuchungen beim Kalb

Die histologischen Präparate wurden am FLI Jena (AG Pathologie), entsprechend den aktuellen Laborarbeitsanweisungen angefertigt.

Zuerst erfolgte die Fixierung der entnommenen Gewebeproben in 5 %-ig neutral gepuffertem Formalin (LA 423_01 / Version 1), dann die Paraffineinbettung entsprechend LA 423_11 / Version 2, die Anfertigung von 2 µm dicken Paraffinschnitten (LA 423_21 / Version 2) und anschließender Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Mayer (LA 423_36 / Version 2).

3.7 Erregernachweise

3.7.1 Direkter und indirekter Nachweis von *Chlamydiaceae*

Direkter Erregernachweis bei Schwein und Kalb

Die diagnostische Absicherung, ob das jeweilige Tier mit Chlamydien infiziert war, erfolgte mittels PCR (und ggf. Kultivierung) aus Augentupfern (nur Kalb), Nasentupfern und Kottupfern sowie am Ende der Untersuchungen aus Gewebeproben.

Die PCR erfolgte zur Detektion der *omp1* Zielregion und anschließenden Sequenzierung der 16S rDNS zur weiteren Typisierung nach Everett und Mitarbeitern (1999). Die Untersuchungen erfolgten zunächst genusspezifisch, bei positivem Befund anschließend speziesspezifisch. Die DNS wurde mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden auf *C. trachomatis* (*C. suis*), *C. pecorum* und *C. psittaci* untersucht. Genutzt wurde eine nach Sachse und Hotzel (2002) modifizierte Version der nested PCR, die bei Kaltenböck et al. (1997) beschrieben ist.

Indirekter Erregernachweis (Serologie) bei Schwein und Kalb

Für die serologische Chlamydiendiagnostik beim Schwein wurde ein ELISA-Test verwendet, dessen Durchführung bei Henning et al. (2005) exakt beschrieben ist.

Die Serumproben der Kälber wurden mittels Komplementbindungsreaktion auf komplementbindende Antikörper gegen Chlamydien untersucht. Diese Untersuchung wurde im FLI, Standort Jena entsprechend der LA 416_14 / Version 2 durchgeführt.

3.7.2 Differenzialdiagnostische bakteriologische und virologische Untersuchungen

Differenzialdiagnostisch wurden weitere respiratorische Viren und Bakterien in das Untersuchungsspektrum eingeschlossen.

Alle differenzialdiagnostischen Untersuchungen wurden in den hauseigenen mikrobiologischen Laboratorien des Friedrich-Loeffler-Instituts durchgeführt. Die entnommenen Proben wurden den Laboratorien für die weiterführenden Untersuchungen unmittelbar nach Probenentnahme übergeben und dort unverzüglich, – entsprechend der gültigen Laborarbeitsanweisung, (Tab. 5 und 6) – weiter aufgearbeitet.

Schwein

Die beim Schwein angewandten Methoden zum differenzialdiagnostischen Erregernachweis sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: Methoden des direkten Erregernachweises beim Schwein

Untersuchter Parameter	Labor	Methodik
Pasteurellen / <i>Mannheimia haemolytica</i> / <i>Haemophilus</i> spp. aus NT / Gewebeproben	FLI, Jena AG Atemwegserkrankungen	LA 16_P01; 16_P02; 16_P03; 16_P04
Mykoplasmen aus NT / Gewebeproben	FLI, Jena AG Mykoplasmen	LA 416_01
Salmonellen aus KT	FLI, Jena AG Salmonellen	LA 411_60; 422_26

Legende zu Tab. 5: LA = Laborarbeitsanweisung; NT = Nasentupfer; KT = Kottupfer

Kälber

Virale Diagnostik

Die virale Diagnostik wurde von der AG Virologie, FLI Jena durchgeführt. Zur Abklärung viraler respiratorischer Infektionen beim Rind wurde ein BIO-X respiratorischer penta Elisa Kit (Bio-X-Diagnostics, Belgien) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen indirekten Test für Blutseren. Dieser Test ermöglicht die Testung der humoralen Immunität von Rindern gegenüber folgenden viralen Krankheitserregern: Bovines Herpesvirus 1 (BHV 1), Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal Disease Virus (BVDV), Bovines Respiratory Syncytial Virus (BRSV), Parainfluenza 3-Virus (PI 3) und Adenovirus Typ 3. Der Test wurde den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

Bakteriologische Diagnostik

Die Methoden der bakteriologischen Differenzialdiagnostik sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Methoden des direkten Erregernachweises beim Kalb

Untersuchter Parameter	Labor	Methodik
Pasteurellen / <i>Mannheimia haemolytica</i> aus NT / Gewebeproben	FLI, Jena AG Atemwegserkrankungen	LA 16_P01; 16_P02; 16_P03; 16_P04
Mykoplasmen aus NT / Gewebeproben	FLI, Jena AG Mykoplasmen	LA 416_01
Salmonellen aus KT	FLI, Jena AG Salmonellen	LA 411_60; 422_26
Kryptosporidien aus KA	FLI, Jena AG Pathologie	LA 22.61_3

Legende zu Tab. 6: LA = Laborarbeitsanweisung; NT = Nasentupfer; KT = Kottupfer; KA = Kotausstrich

3.8 Mathematisch-Statistische Methoden

Die mathematisch-statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte unter Verwendung der Software Microsoft Excel 97 und Statgraph 4.0 (Manucistics, inc., USA). Für die Analyse auf signifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen wurden parametrische und nichtparametrische Testverfahren angewendet. Angegeben sind, soweit nicht anders vermerkt, jeweils der Median sowie Minimum und Maximum der Beobachtungswerte.

Für die methodische Optimierung der Impuls-Oszilloresistometrie (verbundene Stichprobe) wurden die Medianwerte der Differenzen zwischen gemessenen IOS-Daten und rekalkulierten FAMOS-Daten gebildet und mittels Vorzeichenrangtest verglichen. Zur Einschätzung der Messwerte sind weiterhin das 5 %- und das 95 %-Perzentil angegeben. Perzentile zerlegen die Beobachtungswerte in Gruppen, wobei für das 5 %-Perzentil $x_{5\%}$ gilt, 5 % der Beobachtungswerte sind kleiner oder gleich $x_{5\%}$ und für das 95 %-Perzentil $x_{95\%}$ gilt 5 % der Beobachtungswerte sind größer oder gleich $x_{95\%}$. Der Vorzeichenrangtest hat die Prüfung der Nullhypothese zum Ergebnis. Die Nullhypothese statuiert, dass der Median der Differenz zwischen gemessenem IOS-Originalwert und rekalkuliertem FAMOS-Wert null ist. Andernfalls trifft die Alternativhypothese zu, diese statuiert, dass der Median der Differenz ungleich Null ist.

Die Auswahl der Testverfahren zur Klärung des Einflusses der Chlamydien auf die Lungenfunktion richtete sich nach der Anzahl der Gruppen (zwei oder mehr), die Merkmale waren alle unabhängig voneinander. Verglichen wurden Unterschiede zwischen den Gruppen zu einem Zeitpunkt. Zur Überprüfung auf Normalverteilung wurden mittels Statgraph 4.0 die „standardized skewness“ (standardisierte Schiefe) und die „standardized

kurtosis“ (standardisierte Kurtosis) berechnet. Wenn diese Werte sich außerhalb der Grenzen -2 und +2 befinden, kann eine Normalverteilung ausgeschlossen werden. Ergänzt wurden diese Berechnungen durch die graphische Darstellung der Einzelwerte („normal probability plot“). Bei einem Vergleich zweier Tiergruppen wurde bei normalverteilten Stichproben der t-Test (Mittelwertvergleich), hingegen bei nicht-normalverteilten Stichproben der W-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon angewendet. Der W-Test vergleicht Medianwerte bei nicht-normalverteilten unabhängigen Stichproben. Die Beobachtungswerte werden aufsteigend sortiert und Rangfolgen gebildet, die dann verglichen werden. Beim Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben wurde als Test bei parametrischen Stichproben die multifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, Option: mehrfacher Bereichstest) verwendet. Hierbei stellte der LSD („Fishers least significant difference procedure“) die definierte Signifikanzgrenze dar. Bei unbekannter Verteilung kam der H-Test nach Kruskal und Wallis zur Anwendung. Hierbei werden die Stichproben sortiert und Rangzahlen zugeordnet, anschließend wird für jede Stichprobe der Rangmittelwert gebildet und verglichen.

Zur Wertung aller Testergebnisse ist die Irrtumswahrscheinlichkeit p angegeben. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft und die entsprechende Nullhypothese wurde verworfen.

Bei der Darstellung der Ergebnisse wird das jeweils angewandte statistische Verfahren angegeben.