

## **6. Zusammenfassung**

### **Untersuchung zu Inhaltstoffen des Atemkondensates beim Kalb**

#### Aufgabenstellung

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit war, folgende Inhaltsstoffe des Atemkondensates (AKO) auf ihre Eignung zu überprüfen, pulmonale Entzündungsvorgänge widerzuspiegeln: Gesamtproteingehalt, 8-Isoprostan, Leukotrien B<sub>4</sub>, Nitrit, Harnstoff, Ammonium und die Protonenkonzentration. Hierzu wurden folgende Arbeitsschritte konzipiert:

1. Zwecks Standardisierung der AKO-Gewinnung waren zunächst die Einflussfaktoren zu ermitteln, welche das Volumen des kondensierten Exhalates bestimmen. Des Weiteren war für die o. g. Inhaltsstoffe (außer pH) zu prüfen, ob die im AKO nachweisbaren Konzentrationen (je Milliliter AKO) und die auf das Atemvolumen bezogenen exhalierten Mengen (je 100 Liter Exhalat) unterschiedliche biologische und diagnostische Informationen widerspiegeln.
2. Um die physiologische Variabilität der AKO-Inhaltsstoffe einschätzen zu können, waren an gesunden Kälbern die Einflüsse von Fütterung, Alter, Kenngrößen der Atmung auf die exhalierten Marker zu evaluieren. Außerdem galt es, mögliche biologische Zusammenhänge zwischen den diagnostischen Medien Blut, broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) und AKO zu untersuchen.
3. Um entzündungsspezifische Änderungen der AKO-Inhaltsstoffe zu erfassen, sollten gezielt Atemkondensatproben von Kälber mit natürlich erworbenen (*Chlamydien-assoziierten*) und experimentell induzierten (*Mycoplasma bovis*) respiratorischen Affektionen untersucht und mit AKO-Proben von entsprechenden Kontrolltieren verglichen werden.

#### Methodik

*Tiere:* Insgesamt standen 43 Kälber zur Verfügung, die vom Friedrich-Loeffler-Institut angekauft und im Tierhaus des Standortes Jena aufgestellt wurden. Anhand der Anamnese in den Herkunftsbeständen und der Ergebnisse von Einstellungs- Verlaufs- und Sektionsuntersuchungen wurde eine Zuordnung ausgewählter Kälber zu folgenden Untersuchungsabschnitten (UA) vorgenommen:

UA 1: ohne klinische Hinweise auf respiratorische Erkrankungen (n = 12)

UA 2: natürlich erworbene respiratorische Infektion mit Chlamydien (n = 16)

(Anhand des Antikörper-Titers und/oder der bakteriellen Untersuchung der Lunge, sowie der Lungenlymphknoten wurden 10 Tiere als *Chlamydia*-positiv und 6 Kälber aus UA 1 als –negativ beurteilt.)

UA 3: experimentell induzierte respiratorische Infektion mit *Mycoplasma bovis* (n = 18)

(12 infizierte Versuchstiere; 6 Kontrolltiere)

*Untersuchungsabschnitte:* Die Untersuchungsabschnitte 1 und 2 erstreckten sich für alle einbezogenen Kälber auf den Zeitraum 2. bis 7. Lebensmonat. Innerhalb dieser Zeitspanne wurde an jedem Kalb in monatlichen Abständen Atemkondensat gewonnen (6 AKO-Proben/Tier; jeweils 2-4 h nach der Morgenfütterung). Nach Abschluss des jeweiligen Untersuchungszeitabschnittes wurden alle Tiere der Sektion zugeführt. Unmittelbar vor der Euthanasie erfolgte eine letzte (7.) AKO-Gewinnung am ungetränkten Tier. Im Anschluss daran wurde an der frisch exenterierten Lunge BALF gewonnen. Venöse Blutproben wurden

parallel zur 6. AKO-Gewinnung (nach der Fütterung) und zur letzten AKO-Gewinnung vor Tötung (ohne vorherige Fütterung) gewonnen.

In den Untersuchungsabschnitt 3 wurden Kälber aus einem nachweislich *M. bovis*-freien Herkunftsbestand in Altern von 8–25 Tagen einbezogen. Die Dauer des Untersuchungsabschnitts 3 betrug insgesamt 7 Wochen. *Ante infectionem* wurden je Tier 2 AKO-Proben gewonnen. Nach erfolgter inhalativer und intranasaler Exposition (jedes zu infizierende Kalb inhalierte 300 l des *M. bovis* haltigen Aerosols und erhielt im Anschluss 5 ml der Infektionskultur intranasal; Kontrolltieren wurde nach identischer Vorgehensweise PBS appliziert) erfolgte zu folgenden Zeitpunkten die Sektion von je zwei Versuchs- und einem Kontrolltier: Tag 3, 7, 10, 14, 17, 21 und 35 *post infectionem*. Demzufolge variierte die Anzahl der nach der Infizierung im wöchentlichen Abstand zu gewinnenden AKO-Proben zwischen einem und sieben Atemkondensaten je Tier. Im Anschluss einer jeden Atemkondensatgewinnung erfolgte die Gewinnung einer venösen Blutprobe. BALF wurde im Anschluss an die Euthanasie eines jeden Tieres an der frisch exenterierten Lunge gewonnen.

*Gewinnung und Analyse von Atemkondensat:* Die Gewinnung von AKO-Proben erfolgte ausnahmslos an stehenden unsedierten Kälbern, deren expiratorischer Atemstrom mit Hilfe einer Maske in eine Kühlfalle in Form des kommerziell verfügbaren Atemkondensat-Sammelgerätes „ECoScreen“ (Viasys Healthcare, Höchberg) geleitet wurde. Parallel zu jeder AKO-Gewinnung wurden mittels eines im Gerätesystem integrierten elektronischen Spirometers („ECoVent“) folgende Kenngrößen der Spontanatmung erfasst: die maximale expiratorische Atmungsstromstärke [l/s], das expiratorische Atemzugvolumen [l], das expiratorische Atemminutenvolumen [l], die Atmungsfrequenz [Atemzüge/min]. Des Weiteren erfolgte die Registrierung des gesamten exhalierten Volumens [l] und der Sammlungsdauer [min]. Die Gewinnung einer AKO-Probe je Tier basierte auf 400 Liter exhaliertem Volumen und hatte eine zeitliche Dauer zwischen 9 und 29 Minuten. Nach Abschluss einer jeden Kondensatsammlung wurde das gewonnene AKO portioniert und dessen Volumen (ml) mittels Pipette erfasst. Rechnerisch wurde anschließend die je Minute [ml/min] und je 100 l Exhalat [ml/100 l] gewonnene Kondensatmenge ermittelt.

Die Messung des pH-Wertes einer AKO-Probe erfolgte im unmittelbaren Abschluss an die AKO-Gewinnung (Blutgasautomat ABL 500, Radiometer, Kopenhagen). Alle weiteren Analysen (Gesamtproteingehalt, 8-Isoprostan, Leukotrien B<sub>4</sub>, Nitrit, Harnstoff, Ammonium) fanden nach Lagerung der AKO-Proben bei -80°C und dem Versand in Trockeneis statt. Hierbei wurde zunächst die Konzentration des jeweiligen Inhaltsstoffs (pro ml AKO) analysiert; im Anschluss daran erfolgte die Umrechnung der pro 100 l Exhalat abgeschiedenen Menge.

### Ergebnisse

*AKO-Gewinnung:* Das zu gewinnende AKO-Volumen erwies sich sowohl mit Bezug auf die Sammelzeit [ml AKO/min] als auch mit Bezug auf das exhalierter Volumen [ml AKO/100 l Exhalat] als vom Atemmuster der Kälber abhängig.

*Physiologische Einflussfaktoren auf die AKO-Inhaltsstoffe:* Ein statistisch gesicherter Einfluss des Alters und der Fütterung wurde für die Ammonium-Konzentration nachgewiesen. Auch für den pH-Wert im Atemkondensat bestand eine signifikante Fütterungsabhängigkeit. Als

vom Atmungsmuster abhängig erwiesen sich folgende Inhaltsstoffe: Gesamtprotein, 8-Isoprostan, Nitrit, Harnstoff, Ammonium, Protonen-Konzentration.

*Biologische Zusammenhänge zwischen Blut, BALF und Atemkondensat:* Für keinen der untersuchten AKO-Inhaltsstoffe bestand eine statistisch gesicherte Korrelation zwischen der Konzentration im Blutserum und der im AKO. Im Gegensatz dazu waren für Ammonium und Harnstoff Korrelationen zwischen der BALF und dem Blut zu sichern. Zwischen den Untersuchungsmedien BALF und AKO war für keinen der untersuchten Marker eine statistische Abhängigkeit zu sichern.

*Entzündungs-spezifische Veränderungen der AKO-Inhaltsstoffe:* Innerhalb des UA 2 waren in der BALF von Kälbern mit *Chlamydia-psittaci*-Infektion signifikant höhere Konzentrationen an Gesamtprotein, 8-Isoprostan und Harnstoff sowie eine niedrigere Nitrit-Konzentration nachweisbar. Diese Befunde sprechen für entzündlich bedingte Veränderungen im epithelialen Oberflächenfilm der Atemwege. Im AKO konnten weder für die Konzentrationen noch für die pro 100 l exhalieren Mengen der identischen Inhaltsstoffe signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen nachgewiesen werden. Das exhalierete Ammonium hingegen war im AKO der Chlamydia-positiven Kälber signifikant geringer als im AKO der Chlamydia-negativen Tiere. Im Untersuchungsabschnitt 3 lieferten die *post infectionem* erhöhte Abscheidung des Leukotrien B<sub>4</sub> je 100 Liter Exhalat und der verminderte pH-Wert bei den experimentell mit *Mycoplasma bovis* infizierten Tieren Hinweise auf einen akuten Entzündungsvorgang innerhalb der Atemwege.

### Schlussfolgerungen

1. Die im AKO untersuchten Inhaltsstoffe unterliegen sowohl methodischen als auch biologischen Einflussfaktoren. Eine Standardisierung des Atmungsmusters ist an spontan atmenden Tieren jedoch nicht durchführbar. Demzufolge sollten die aus dem Prozess der AKO-Gewinnung resultierenden Variabilitätsursachen reduziert werden, indem sowohl das AKO-Volumen als auch die AKO-Inhaltsstoffe auf das exhalierete Volumen bezogen werden. Biologische Einflüsse, wie Abhängigkeiten der AKO-Inhaltsstoffe von der Fütterung oder dem Alter der Tiere, sind in zukünftigen Studienprotokollen zu berücksichtigen.
2. Atemkondensat, BALF und Blut unterscheiden sich bezüglich ihres biologischen und diagnostischen Informationsgehaltes. Entzündungsvorgängen innerhalb der Lunge wurden durch die BALF sensitiver wiedergespiegelt als durch AKO. Mögliche Ursachen hierfür könnten sowohl Einflüsse des Atmungsmusters als auch bisher nicht zu standardisierende Verdünnungseffekte auf die Zusammensetzung des AKO sein.
3. Von den untersuchten AKO-Inhaltsstoffen erwiesen sich insbesondere Leukotrien B<sub>4</sub> und der pH-Wert als geeignet, die Folgen einer experimentell induzierten *Mycoplasma-bovis*-Infektion zu reflektieren.
4. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um die Gewinnung des Atemkondensates zu standardisieren und die Eignung der Inhaltsstoffe zu prüfen, entzündliche Vorgänge auf den Atemwegen darzustellen.

## 6. Summary

### **Evaluation of different components of the exhaled breath condensate and their potential to reflect pulmonary inflammations in calves**

#### Aim

The present study aimed to examine the following exhaled breath condensate (EBC) components in calves: total protein, 8-isoprostane, leukotriene B<sub>4</sub>, nitrite, urea, ammonia, concentration of protons (pH). In order to evaluate their potential to reflect inflammatory pulmonary processes, three consecutive steps were defined:

1. To standardise EBC-collection, biological factors influencing the collection process significantly (and consequently the EBC volume obtained) had to be defined. Furthermore, the concentration of each EBC-component was recalculated taking the exhaled volume into account in order to compare both (concentration per ml EBC and per 100 litres of exhaled breath) for their biological and diagnostic information.
2. To evaluate the physiological variability of all potential markers measured in EBC, it was necessary to determine the influences of food intake, age, and ventilatory parameters in healthy calves. Furthermore, the relationship between bronchoalveolar lavage fluid (BALF), EBC, and blood should be explored.
3. After the knowledge of methodological and biological background of EBC collection, two infection models were used to clarify which components of EBC might be able to indicate pulmonary inflammation. Thus, calves naturally infected with *Chlamydiaceae* as well as calves experimentally infected with *Mycoplasma bovis* were compared to healthy controls.

#### Methods

*Animals:* A total number of 43 calves were included. All animals were reared at the Federal Research Institute for Animal Health (Jena) under standardised conditions and in accordance with guidelines for animal welfare. Nutrition contained commercial milk replacement and coarse meal. Water and hay were supplied *ad libitum*. Calves were grouped according to their clinical and microbiological status and were examined in different parts of study.

Part 1: One group of clinically healthy calves without signs of respiratory diseases (n = 12)

Part 2: Six calves with a naturally acquired respiratory infection with *Chlamydia psittaci* were compared to 10 calves without any chlamydial infection (n = 16)

Part 3: Twelve calves experimentally infected with *Mycoplasma (M.) bovis* were compared to 6 non-infected controls (n = 18)

*Parts of the study:* For all calves included in Parts 1 and 2, the observation period lasted between their 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> month of life. During this period, EBC was collected once per month in each calf (6 EBC samples per animal, each 2 – 4 hours after morning feeding). At the end of the study, a final (7<sup>th</sup>) EBC collection was performed in non-fed calves before euthanasia. Venous blood samples were taken in parallel to EBC collections no. 6 (after feeding) and 7 (non-fed). At necropsy, broncho-alveolar lavage was performed after removing the lung from the body.

Calves included in Part 3 aged 8 - 25 days and resulted from a breeding farm proved to be free of *M. bovis*. The duration of this part of the study was 7 weeks. *Before infection*, 2 EBC samples were collected per calf. For experimental exposure, each calf inhaled 300 litres of

an aerosol containing either PBS only (controls) or *M. bovis*. In addition, 5 ml were applied intranasally per animal. After challenge, two infected calves and one control were necropsied at following time points: 3, 7, 10, 14, 21, and 35 days after infection, respectively. Consequently, the number of weekly collected EBC samples per calf varied between 1 and 7. After EBC collection, venous blood samples were collected at each time point. Again, BAL was performed in all exenterated lungs.

*Collection and analysis of exhaled breath condensate:* EBC samples were collected in conscious animals during spontaneous breathing using a face mask and the commercially available EBC collection system “ECoScreen” (Viasys Healthcare, Hoechberg, Germany). During each EBC collection, an integrated electronic spirometer (“ECoVent”) was explored to measure the following parameters of the spontaneous ventilation: maximal expiratory peakflow [l/s], expiratory tidal volume [l], expiratory minute volume [l], and respiratory rate [breath/min]. Additionally, the total exhaled volume [l] and the sampling time [min] were documented. The collection of one EBC sample was based upon 400 litres exhaled breath, and the time necessary to collect one EBC varied between 9 and 29 minutes. Immediately after finishing the collection process, EBC samples were subdivided and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Taking the sampling duration (collection time in minutes) and the total expired volume for each EBC collection into account, the volume of EBC condensed per 100 litres exhaled breath was calculated for each animal.

While the pH of EBC was measured immediately after finishing the collection process (ABL 500, Radiometer, Copenhagen), the concentrations of total protein, 8-isoprostane, leukotriene B<sub>4</sub>, nitrite, urea, and ammonia were analysed at the end of the study after storage. In addition to the concentration per ml EBC, the concentration exhaled per 100 litres exhaled breath was calculated for each component.

## Results

*EBC collection:* The condensed volume of EBC was proved to be dependent on the pattern of ventilation for both sampling time (ml EBC/min) and exhaled volume (ml EBC/100 l).

*Physiologic influences on the EBC mediators:* The ammonia concentration in EBC was found to be significantly influenced by age and food intake. Furthermore, EBC pH was dependent on feeding. For the following EBC components, a significant influence of ventilation was observed: total protein, 8-isoprostane, nitrite, urea, ammonia, pH.

*Biological relationships between blood, BALF and EBC:* None of the investigated EBC components showed a statistically proven correlation between EBC and blood serum. On the contrary, the concentration of ammonia and urea in BALF correlated to serum concentration. Finally, no significant correlation was found for any component between EBC and BALF.

*Influence of pulmonary inflammation on EBC components:* In the group of *Chlamydia-psittaci*-positive calves (Part 2 of the study), significantly higher concentrations of total protein, 8-isoprostane and urea but a lower concentration of nitrite was measured in BALF samples in comparison to control calves without chlamydial infection. These results may indicate changes in the airway epithelial lining fluid caused by inflammatory processes. With respect to EBC, only the exhaled ammonia was significantly lower in EBC samples of *Chlamydia*-positive calves. For all other EBC components, neither concentrations expressed per ml EBC nor those related to 100 l exhaled breath differed significantly between the two

animal groups. The experimentally induced *M. bovis* infection led to elevated concentrations of leukotriene B<sub>4</sub> per 100 litres exhaled breath and to lower pH-values indicating inflammatory processes in the lung that were not detectable by clinical symptoms.

### Conclusions

1. All examined components of EBC were influenced by methodical and biological variables. Because no standardised pattern of ventilation can be performed in spontaneously breathing animals, it is recommended to refer both the collected EBC volume and the concentration of EBC components to the volume of exhaled breath in order to reduce variability given by ventilatory influences during the process of EBC collection. Furthermore, biological sources of variability as determined in this study (for example the dependence of EBC components on food intake or age) should be taken into account in further studies.
2. The diagnostic samples EBC, BALF and blood serum differ with respect to their diagnostic information. BALF was found to be more reliable in reflecting inflammatory processes within the lung. For EBC, one can assume that unsolved questions of ventilatory influences or dilution effects on the composition of EBC interfere with diagnostic information.
3. Leukotriene B<sub>4</sub> and the proton concentration were found to be most suitable in order to represent patho-physiological changes induced by experimental *Mycoplasma* infection.
4. Further studies are required to standardise the process of EBC collection and to clarify the potential of EBC components for their potential use as markers of pulmonary inflammatory processes.