

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Tiere und Versuchsanordnung

3.1.1 Tiere

Die in das Versuchsvorhaben einbezogenen 24 Kälber stammten aus der Agrargenossenschaft Pfiffelbach (Thüringen). Sie wurden 4 Tage vor Versuchsbeginn angekauft und in das Tierhaus des FLI (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit), Standort Jena transportiert.

Es wurden nur Tiere einbezogen, deren vorherige Untersuchung auf Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal disease (BVD/MD) keinen Hinweis auf eine Viruspersistenz bzw. eine vorhandene Infektion ergab.

Jedes Kalb unterzogen wir beim Ankauf einem Einstellungsmonitoring, welches folgende Untersuchungen umfasste:

- Messung der Rektaltemperatur mit Digitalthermometer
- Ermittlung der Körpermasse
- Blutentnahme durch Punktion der *Vena jugularis* zwecks (1) Antikörperbestimmung gegen *Mannheimia-haem.-A1*-Kapselantigen mittels ELISA und (2) Erstellung eines kompletten Blutbildes (Erythrogramm, Thrombozytenzahl und Leukogramm)

Zur Blutentnahme wurden Monovetten der Firma SAARSTEDT mit einem Volumen von 10 ml verwendet. Von jedem Tier entnahmen wir zwei Proben zur Gewinnung von Serum und Heparinplasma.

Nach Einstellung erfolgten bakteriologische und parasitologische Untersuchungen zur Charakterisierung der Einzeltiere:

- Kottupfer (KT) an 2–3 aufeinanderfolgenden Tagen zur Untersuchung auf Salmonellen
- Kotasstriche (KA) an 2–3 aufeinanderfolgenden Tagen zur Untersuchung auf Kryptosporidien
- Nasentupfer (NT) (je Tier zwei) an 2–3 aufeinanderfolgenden Tagen zum Nachweis von Pasteurellen (inklusive *Mannheimia*) und/oder Mykoplasmen

Die Ergebnisse des Einstellungsmonitorings und der zum Versuchsbeginn erfolgten randomisierten Zuordnung der Tiere fasst Tabelle 6 zusammen.

Tabelle 6: Angaben über die in das Versuchsvorhaben einbezogenen Kälber

Ild Nr.	Tier Nr.	Geschlecht	Zum Zeitpunkt der Einstellung			Ergebnisse des Einstellungsmonitorings vor Versuchsbeginn					Randomisierung
			Alter in d	KM in kg	RT in °C	AK <i>Mannheimia</i> <i>haem.</i> A1 CPS	NT Pasteurellen 1./2./3.	NT Mykoplasmen 1./2./3.	KT Salmo- nellen 1./2./3.	KA Kryptospori- dien 1./2.	
1	895	m	13	46,4	39,0	<25	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+	Versuchstier
2	896	m	13	40,2	39,1	<25	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+	Kontrolltier
3	897	m	9	35,8	39,2	<25	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+	Versuchstier
4	898	m	15	42,4	39,3	<25	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-	Kontrolltier
5	900	m	14	35,6	39,0	<25	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+	Kontrolltier
6	901	m	10	38,6	39,5	<25	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+	Versuchstier
7	902	m	8	39,2	39,5	<25	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+	Versuchstier
8	903	m	5	37,8	39,3	<25	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+	Versuchstier
9	904	m	3	37,2	39,2	50	-/-	-/-	-/-/-	-/-	Versuchstier
10	905	m	5	42,6	38,3	<25	-/-	-/-	-/-/-	+/+	Kontrolltier
11	906	m	5	45,6	38,8	<25	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-	Kontrolltier
12	907	w	6	34,6	39,2	<25	-/-/-	-/-/-	-/+/-	-/+	Versuchstier
13	908	w	5	39,6	39,3	<25	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+	Versuchstier
14	909	w	11	37,4	39,3	100	<i>P.mult./ P.mult./ P.mult.</i>	-/-/-	-/-/-	+/+	Kontrolltier
15	910	w	12	45,2	39,2	200	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+	Versuchstier
16	911	w	5	41,4	39,1	<25	-/-/ <i>P.mult.</i>	-/-/-	+/-/-	+/-	Kontrolltier
17	912	w	6	41,4	39,6	400	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/+	Kontrolltier
18	913	w	6	41,2	38,8	<25	-/-/ <i>P.mult.</i>	-/-/-	-/-/-	+/+	Kontrolltier
19	914	w	5	46,6	39,3	400	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+	Versuchstier
20	915	w	14	31,0	38,9	<25	-/-/ <i>P.mult.</i>	-/-/-	-/-/-	+/+	Versuchstier
21	916	w	5	45,8	39,0	100	-/-	-/-	-/-/-	-/-	Versuchstier
22	917	w	5	42,6	39,4	50	-/-	-/-	-/-/-	-/-	Kontrolltier
23	918	w	4	41,2	38,5	50	-/-	-/-	-/-/-	-/-	Kontrolltier
24	919	w	5	47,2	39,2	<25	-/-	-/-	-/-/-	-/-	Kontrolltier

Erläuterungen zu Tabelle 6:

m = männlich; w = weiblich; KM = Körpermasse; RT = Rektaltemperatur; AK *Mannheimia haem.* A1 CPS = Antikörper gegen *Mannheimia haem.* A1 Kapselantigen; NT = Nasentupfer; KT = Kottupfer zur Untersuchung auf Salmonellen; KA Kryptosporidien = Kottausstrich zur Untersuchung auf Kryptosporidien; Versuchstier = vor experimenteller Infizierung immunisiert; Kontrolltier = vor experimenteller Infizierung nicht immunisiert; *P. mult.* = *Pasteurella multocida*

3.1.2 Haltung und Fütterung der Kontroll- und Versuchstiere

Haltung und Fütterung der Kälber erfolgten entsprechend den Maßgaben der Verordnung zum Schutz von Kälbern bei der Haltung (Kälberhaltungsverordnung) in der Fassung vom 30. Dezember 1997 (Bundesgesetzblatt Jahrgang 1997 Teil 1 Nr. 88, ausgegeben zu Bonn). Die Unterbringung der Gruppen erfolgte in separaten Laufställen mit einer Mindestgrundfläche von 1,5 m² je Tier. Zu den Mahlzeiten wurden die Kälber mit Halsbändern fixiert. Jedes Tier hatte dabei seinen eigenen Fressplatz. Die Liegeflächen wurden mit Stroh eingestreut und zwei mal täglich gereinigt.

Die Fütterung erfolgte zwei mal täglich (morgens zwischen 06:00 und 07:00 und mittags zwischen 12:00 und 13:00). Anfangs erhielten die Tiere je Mahlzeit 2,5 l Milch. Die Milchmenge wurde je Woche um 0,5 Liter bis auf ein Maximum von 5-6 l pro Mahlzeit, abhängig von der Lebendmasse, erhöht. Tieren, die an Durchfall erkrankten, wurde anstelle Milch teilweise oder vollständig eine Diättränke (Bio-Floracid, ALBRECHT) angeboten. Heu und Wasser erhielten die Tiere *ad libitum*.

3.1.3 Versuchsanordnung

Das Tierversuchsvorhaben wurde von der zuständigen Tierschutzkommission am 11.03.1999 entsprechend dem Tierschutzgesetz in der Fassung vom 29.05.1998 genehmigt (Genehmigungsnummer: 23 – 51/99, Thüringer Landesverwaltungsamt Abt. VII Gesundheits- und Veterinärwesen).

Nach Ankauf der Kälber erfolgte am Tag 1 (d1) des Versuches eine Randomisierung in vier Gruppen (zwei Versuchsgruppen und zwei Kontrollgruppen mit je 6 Tieren). Ein Tierpfleger betreute je eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe. Die Versuchsgruppen wurden an den Tagen 1 und 22 (d1 und d22) vakziniert. Die Kontrollkälber erhielten als Placebo isotone Natriumchloridlösung (NaCl-Lösung). Am Tag 40 (d40) erfolgte für alle Tiere eine experimentelle Infizierung mit *Mannheimia haem. A1*. Sie wurde nach 30 Stunden wiederholt. Fünf Tage *post infectionem (p.i.)* (entspricht d45) wurden alle Tiere euthanasiert und der Sektion zugeführt.

Alle Kälber wurden während des Versuches unter vergleichbaren Lebens- und Fütterungsbedingungen gehalten und täglich klinisch untersucht. Während des Versuches entnahmen wir je Tier für bakteriologische Untersuchung auf Pasteurellen und Mykoplasmen zu 12 Zeitpunkten Nasentupferproben. Lungenfunktionsdiagnostische Untersuchungen erfolgten bei allen Tieren sowohl *ante* als auch *post infectionem* mittels Impulsoszilloresistometrie (IOS). Außerdem wurden von allen Tieren regelmäßig Blutproben zur serologischen und hämatologischen Untersuchung gewonnen. Zwecks Blutgasanalyse und Ermittlung des Säure-Basen-Status im arteriellen Blut wurden bei 6 Tieren der Versuchsgruppen und bei 6 Tieren der Kontrollgruppen am Tag 39 (d39) Katheter in die *Aorta abdominalis* verbracht, so dass bei 12 Tieren bis zum Versuchsende arterielle Blutproben gewonnen werden konnten.

Die Untersuchungen erstreckten sich von Mai bis Juli 1999. Eine schematische Übersicht des gesamten Versuchsablaufes widerspiegelt Abbildung 1.

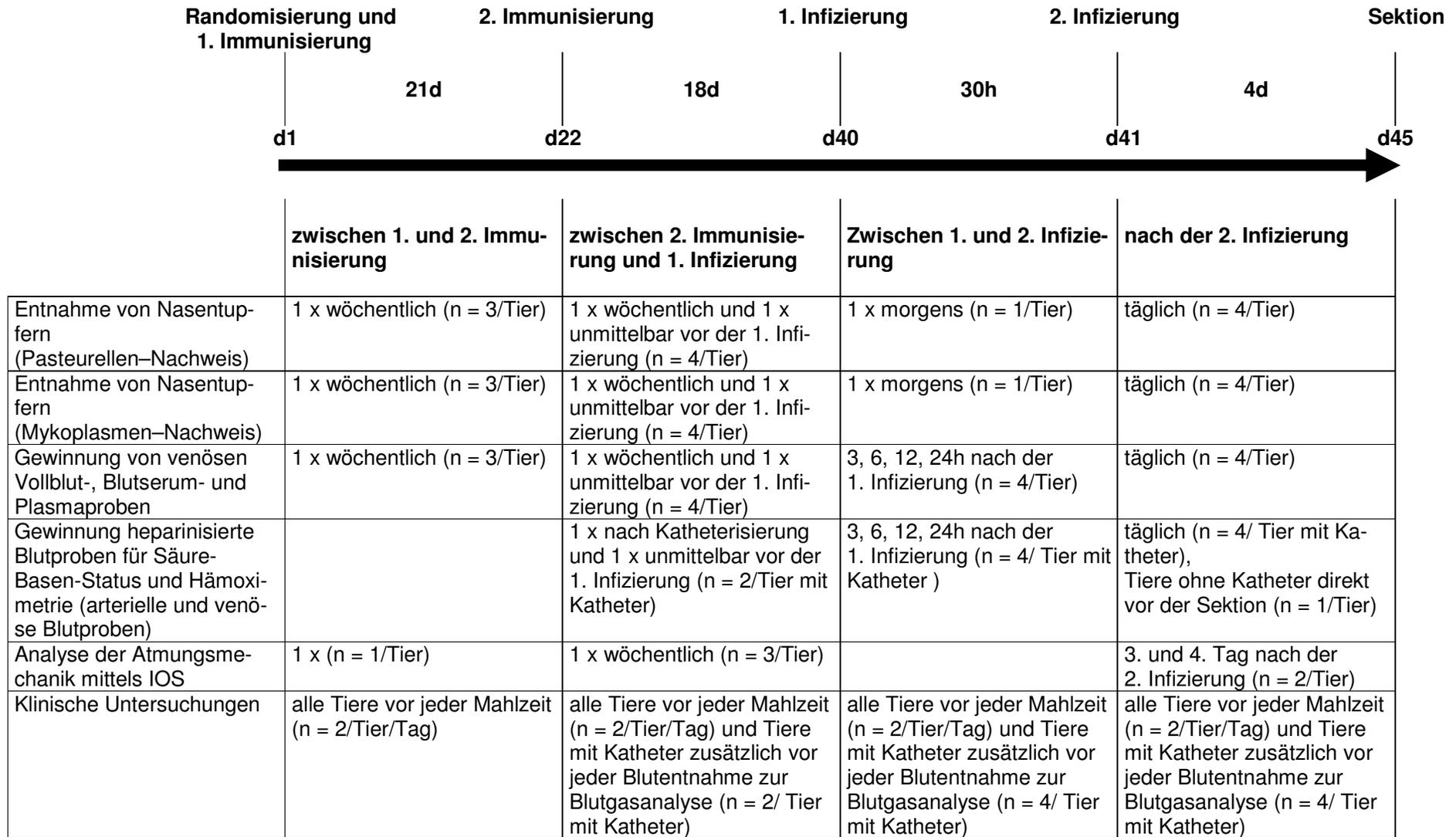


Abbildung 1: Versuchsanordnung sowie Probenentnahmeplan

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Immunisierung

Der verabreichte Impfstoff enthielt inaktiviertes Leukotoxin und inaktiviertes Kapselantigen von *Mannheimia haem. A1* als Antigene. Mit dem Ziel einer Immunisierung der Versuchsgruppe wurden jedem Tier 2 ml des resuspendierten lyophilisierten Impfstoffes intramuskulär (*i. m.*) am Tag 1 (d1) auf der linken und am Tag 22 (d22) auf der rechten Halsseite verabreicht. Gleichzeitig verabreichten wir jedem Tier der Kontrollgruppen ein Placebo (2 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung) *i. m.* ebenfalls am Tag 1 (d1) auf der linken und am Tag 22 (d22) auf der rechten Halsseite.

3.2.2 Experimentelle Infizierung

Der in dieser Studie verwendete Infektionsstamm wurde innerhalb des FLI, Standort Jena nach der von SCHIMMEL (1987) beschriebenen Methode hergestellt. Dieser Stamm trägt die Bezeichnung 2353 und wurde 1983 in Dresden aus Läsionen von Kälberlungen isoliert. 1988 wurde dieser Stamm in die Sammlung des ehemaligen Instituts für bakterielle Tierseuchenforschung Jena aufgenommen und unter der Bezeichnung P588 weiter geführt.

Die Infizierung aller Tiere mit dem Infektionsstamm führten wir an den Tagen 40 und 41 (d40, d41) des Versuches im Abstand von 30 h durch. Die Inokulation des Infektionsstammes erfolgte am stehenden Tier intratracheal (*i. tr.*). Hierzu wurde mit einer Injektionskanüle (Sterican 1,20 x 40 mm, B. BRAUN MELSUNGEN AG) zwischen zwei Trachealringen eingegangen. Der richtige Sitz der Kanüle wurde durch Einspritzen von 1-2 ml isotoner NaCl-Lösung und der damit verbundenen Auslösung des Hustenreflexes überprüft. Anschließend applizierten wir 10 ml einer flüssigen Kultur von *Mannheimia haem. A1* (d40 $1,7 - 2,0 \times 10^9$ Keime/ml, d41 $1,5 - 2,0 \times 10^9$ Keime/ml) und spülten mit 1-2 ml isotoner NaCl-Lösung nach.

3.2.3 In vivo erfasste Parameter

3.2.3.1 Erfassung der klinischen Daten

Die Ermittlung der klinischen Daten erfolgte durch die zuständigen Tierpfleger zu den Mahlzeiten (2 x täglich).

Die Tierpfleger beurteilten Augen- und Nasenausfluss sowie Husten und Durchfall mittels eines numerischen Bewertungssystems (0 = normal, 1 = gering, 2 = mäßig, 3 = schwer). Den Allgemeinzustand der Tiere stufen wir in 4 Kategorien (normal, ruhig, apathisch und deprimiert) ein. Dessen Einschätzung wurde ebenfalls durch die Tierpfleger vorgenommen.

Weiterhin ermittelten die Tierpfleger die Rektaltemperatur und die Ruheatemfrequenz. Zur Feststellung der Rektaltemperatur wurden Digitalthermometer verwendet. Die Messung der Rektaltemperatur erfolgte direkt vor jeder Mahlzeit (und bei den Tieren mit einem Katheter zusätzlich direkt vor jeder Blutentnahme zur Blutgasanalyse). Die Ermittlung der Ruheatemfrequenz wurde nach der Tränkeaufnahme vorgenommen. Dabei achteten wir darauf, dass sich die Tiere möglichst niedergelegt hatten.

Die je Kalb und Mahlzeit aufgenommene Tränkemenge ermittelte wir, indem die im Tränkeimer verbliebene Milchmenge gemessen und von der angebotenen Milchmenge abgezogen

wurde. Auf Grund der Fixierung der Kälber bei der Tränkeaufnahme war es nicht möglich, dass ein Nachbarkalb aus einem anderen Eimer trank.
Alle Daten wurden individuell je Kalb geführte Krankenblätter eingetragen.

3.2.3.2 Entnahme der Kottupfer und Kotabstriche

Die Kottupfer/Kotabstriche wurden im Rahmen des Einstellungsmonitorings entnommen (siehe 3.1.1 Tabelle 6). Ziel war es, den Gesundheitsstatus der Tiere zum Zeitpunkt der Einstallung vor Versuchsbeginn zu ermitteln.

Kottupfer entnahmen wir bei allen Tieren an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Die Kottupferentnahme bei jedem Tier zur Untersuchung auf Salmonellen führten wir morgens vor dem Tränken mit einem sterilen Wattetupfer durch, der anschließend in ein flüssiges Anreicherungsmedium verbracht wurde.

Den zweiten Kottupfer entnahmen wir ebenfalls morgens vor dem Tränken mit derselben Tupferart. Mit diesem Tupfer fertigten wir vor Ort einen Ausstrich auf einem Objektträger zur Kryptosporidienuntersuchung an. Diese Untersuchung wurde bei jedem Tier an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Die Auswertung der entnommenen Kottupferproben bzw. der gewonnenen Ausstriche erfolgte in den jeweiligen Laboratorien des FLI, Standort Jena (vgl. Abschnitt 3.2.3.8). Die Ergebnisse sind im Abschnitt 3.1.1 dargestellt.

3.2.3.3 Entnahme von Nasentupfern

Im Rahmen des Einstellungsmonitorings wurden Nasentupfer (NT) bei 18 Tieren an drei aufeinander folgenden und bei 6 Tieren (905, 906, 916, 917, 918, 919) an zwei aufeinander folgenden Tagen entnommen, da diese 6 Tiere erst später angeliefert wurden (vgl. 3.1.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Während des Versuches entnahmen wir Nasentupfer entsprechend der unter 3.1.3 dargestellten Versuchsanordnung.

Die Entnahme der Proben wurde morgens nüchtern durchgeführt nachdem die Tiere an ihrem Tränkplatz fixiert worden waren. Mit sterilen trockenen Wattetupfern gingen wir in die Nasenöffnung ein und gewannen das Nasensekret. Im Anschluss wurden diese Tupfer in sterile Reagenzgläser verbracht und letztere steril verschlossen. Wir entnahmen je Tier und Entnahmezeitpunkt zwei Nasentupfer, da Untersuchungen auf Pasteurellen (inklusive *Mannheimia haem. A1*) und Mykoplasmen erfolgten. Die Untersuchungen wurden in den zuständigen Laboratorien des FLI, Standort Jena, durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.3.8). Die Ergebnisse der Untersuchungen im Verlauf des Versuches sind im Abschnitt 4.6.3 dargestellt.

3.2.3.4 Entnahme und Aufarbeitung von venösen Blutproben während des gesamten Versuchszeitraumes (d1 bis d45)

Blutentnahme

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes erfolgte die Gewinnung des venösen Blutes durch Punktion der *Vena jugularis*. Dazu rasierten wir an den Halsseiten der Tiere einen etwa 8 cm langen Streifen im Bereich der Punktionsstellen beider *Vv. jugulares*. Vor der Punktion wurde der Bereich desinfiziert. Nach dem Anlegen eines Staustrickes erfolgte die Punktion der Vene mit einer Kanüle (B.BRAUN, MELSUNGEN 0,9 x 40). Zunächst wurde ein 5 ml EDTA-Röhrchen (KABE) gefüllt, verschlossen und vorsichtig geschwenkt. Im Anschluss daran wurde die erforderliche Anzahl an Monovetten der Firma SAARSTEDT (Se-

rum- und EDTA-Plasma) gefüllt, verschlossen und vorsichtig geschwenkt. Nach Lösen des Staustrickes erfolgte die Entfernung der Kanüle und eine Komprimierung der Punktionsstelle für etwa 5 Sekunden.

Bearbeitung der gewonnenen Blutproben

Vom Blut in den 5 ml Röhrchen fertigten wir zunächst zwei Blutausstriche auf Objektträgern an. Die Ausstriche sowie das Restblut in diesen Röhrchen wurden dann in einer Kühltasche verpackt und noch am selben Tag mittels Kurier an das Untersuchungslabor (Tiermedizinisches Labor GbR) nach Berlin Lankwitz versandt.

Die in Monovetten gewonnenen Blutproben zentrifugierten wir 20 min bei 1500 G. Jeweils 1 ml des Überstandes (Serum bzw. Plasma) wurde anschließend in die erforderlichen Anzahlen von Eppendorfgefäßen pipettiert. Dazu wurde eine 1000 µl Pipette (Firma EPPENDORF) verwendet. Die markierten und beschrifteten Eppendorfgefäße verpackten wir in Styropor[®]-Behälter und froren sie bei -20 °C ein. Nach Abschluss des Versuches stellten wir die Proben zusammen und verschickten sie an die entsprechenden Laboratorien (Tabelle 7). Dieses geschah in mit Kühlakkus bzw Trockeneis gefüllten Styropor[®]-Kisten per Kurier.

Im venösen Blut nachweisbare Parameter einer akuten Entzündung

Die im venösen Blut ermittelten Parameter sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Erfasste Parameter im venösen Blut

Zeitpunkte der Untersuchungen	Ausgangsmaterial	Bestimmte Parameter	Abkürzung	Labor
d12, d19, d26, d33, d40 (a.i.; 3, 6, 12 h p.i.), d41, d42, d43, d44, d45	EDTA – Blut	Rotes Blutbild: - Erythrozytenzahl [10^{12} /l] - Hämoglobingehalt [mmol/l] - Hämatokrit [l/l] - Mittleres korpuskuläres Volumen [fl] - Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt [fmol] - Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration [mmol/l]	RBC Hb Hct MCV MCH MCHC	Tiermedizinisches Labor GbR, Berlin – Lankwitz
d12, d19, d26, d33, d40 (a.i.; 3, 6, 12 h p.i.), d41, d42, d43, d44, d45	EDTA – Blut	Thrombozytenzahl [10^9 /l]	PLT	Tiermedizinisches Labor GbR, Berlin – Lankwitz
d12, d19, d26, d33, d40 (a.i.; 3, 6, 12 h p.i.), d41, d42, d43, d44, d45	EDTA – Blut	Weißes Blutbild: - Gesamtzahl der weißen Blutzellen [10^9 /l] - Differenzialblutbild: - Stabkernige neutrophile Granulozyten [10^9 /l] - Segmentkernige neutrophile Granulozyten [10^9 /l] - Eosinophile Granulozyten [10^9 /l] - Basophile Granulozyten [10^9 /l] - Monozyten [10^9 /l] - Lymphozyten [10^9 /l] - Sonstiges (lymphatische Reizformen, Anisozytose) [10^9 /l]	WBC STAB SEG EOS BASO MONO LYM	Tiermedizinisches Labor GbR, Berlin – Lankwitz
d12, d19, d26, d33, d40 (a.i.; 3, 6, 12 h p.i.), d41, d42, d43, d44, d45	Blutserum	Haptoglobin [mg/ml]		Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedi- zischen Fakultät der Univer- sität Leipzig
d12, d19, d26, d33, d40 (a.i.; 3, 6, 12 h p.i.), d41, d42, d43, d44, d45	EDTA – Plasma	Fibrinogen [g/l]		Tiermedizinisches Labor GbR, Berlin – Lankwitz

3.2.3.5 Methode zur Untersuchung von Ventilation und Atmungsmechanik (Impuls-Oszilloresistometrie)

Verwendete Geräteanordnung

Zur Analyse von Ventilation und Atmungsmechanik verwendeten wir das Impuls-Oszilloresistometrie-System „IOS–Master Screen“ (JAEGER, Würzburg). Die gemessenen Werte wurden mittels der Software Master LAB Vers. 4.34 des Geräteherstellers auf einen angeschlossenen Computer übertragen. Die Weiterbearbeitung der Daten erfolgte mit dem Kalkulationsprogramm EXCEL 97.

Methodische Durchführung

Das in dieser Studie angewandte Verfahren der IOS–Messung, die verwendete Atmungs-
maske sowie der Geräteaufbau wurden von REINHOLD (1997 a, b) und REINHOLD und Mitar-
beiter (1998 a, b, c) beschrieben.

Je Untersuchungszeitpunkt erfolgten pro Kalb 3 bis 5 Einzelmessungen, jeweils mit einer
Zeitdauer von je 30 bis 60 Sekunden. Hierbei wurden der Spontanatmung der Kälber 2 bis 3
Impulse je Sekunde bei einer maximalen zeitlichen Dauer von 45 ms je Impuls aufgeprägt. In
die Auswertung einer Messung wurden jeweils 32 Stützstellen je Minute mit einbezogen. Die
Tiere waren dabei fixiert und die Kopfhaltung (im Winkel von 45 Grad zur Nackenlinie) stan-
dardisiert. Die Messungen wurden bei Ruheatmung vorgenommen.

In die Auswertung wurden vier Messzeitpunkte (14 d *a.i.*, 7 d *a.i.*, 3 d *p.i.* und 4 d *p.i.*) einbe-
zogen. Die vor diesem Zeitraum durchgeführten Messungen dienten der Adaptation der Tie-
re an das Messsystem. Eine 2 Tage *a.i.* durchgeführte Messung konnte nicht in die Aus-
wertung einbezogen werden, da klimatische Bedingungen (Umgebungstemperatur >30 °C)
zur Verfälschung der Messergebnisse geführt hatten.

Erfasste Parameter

IOS – Parameter (als Mittelwerte über die 3-5 Einzelmessungen je Zeitpunkt)

- Atmungsfrequenz (AF) [min^{-1}]
- Atemzugvolumen ($V_T = \text{tidal volume}$) [ml]
- spektrale Resistance bei 3, 5, 10, 15, 20 Hz ($R_{3 \text{ Hz}} \dots R_{20 \text{ Hz}}$) [$\text{kPa l}^{-1} \text{ s}$]
- spektrale Reactance bei 3, 5, 10, 15, 20 Hz ($X_{3 \text{ Hz}} \dots X_{20 \text{ Hz}}$) [$\text{kPa l}^{-1} \text{ s}$]
- Kohärenz bei 3, 5, 10, 15, 20 Hz ($Ko_{3 \text{ Hz}} \dots Ko_{20 \text{ Hz}}$)

Zur Beschreibung der Frequenzabhängigkeit der spektralen Resistance ermittelten wir rech-
nerisch aus den IOS–Originaldaten folgende Kenngrößen:

- Differenz zwischen $R_{3 \text{ Hz}}$ und $R_{5 \text{ Hz}}$ ($R_{3 \text{ Hz}} - R_{5 \text{ Hz}}$) [$\text{kPa l}^{-1} \text{ s}$]
- Differenz zwischen $R_{3 \text{ Hz}}$ und $R_{10 \text{ Hz}}$ ($R_{3 \text{ Hz}} - R_{10 \text{ Hz}}$) [$\text{kPa l}^{-1} \text{ s}$]
- Differenz zwischen $R_{5 \text{ Hz}}$ und $R_{10 \text{ Hz}}$ ($R_{5 \text{ Hz}} - R_{10 \text{ Hz}}$) [$\text{kPa l}^{-1} \text{ s}$]
- Differenz zwischen $R_{3 \text{ Hz}}$ und $R_{15 \text{ Hz}}$ ($R_{3 \text{ Hz}} - R_{15 \text{ Hz}}$) [$\text{kPa l}^{-1} \text{ s}$]
- Differenz zwischen $R_{5 \text{ Hz}}$ und $R_{15 \text{ Hz}}$ ($R_{5 \text{ Hz}} - R_{15 \text{ Hz}}$) [$\text{kPa l}^{-1} \text{ s}$]

Auf der Basis eines in die IOS–Software implementierten Lungenmodells erfolgte die Ablei-
tung nachstehender Modellparameter (als Mittelwerte über die 3-5 Einzelmessungen je Zeit-
punkt):

- zentrale Resistance (R_z) [$\text{kPa l}^{-1} \text{ s}$]
- periphere Resistance (R_p) [$\text{kPa l}^{-1} \text{ s}$]
- Compliance der Lunge (C_L) [l kPa^{-1}]

Rechnerisch wurden zur Beschreibung der intra-individuellen Variabilität aus den IOS-Originaldaten folgende Kenngrößen abgeleitet:

- Maximale Differenz zwischen den 3-5 Einzelmessungen für R bei 3, 5, 10, 15, 20 Hz (Diff_{max} R_{3 Hz}, Diff_{max} R_{5 Hz}, Diff_{max} R_{10 Hz}, Diff_{max} R_{15 Hz}, Diff_{max} R_{20 Hz}) [kPa l⁻¹ s]
- Maximale Differenz zwischen den 3-5 Einzelmessungen für X bei 3, 5, 10, 15, 20 Hz (Diff_{max} X_{3 Hz}, Diff_{max} X_{5 Hz}, Diff_{max} X_{10 Hz}, Diff_{max} X_{15 Hz}, Diff_{max} X_{20 Hz}) [kPa l⁻¹ s]

Weiterhin wurde das Atemminutenvolumen ($V_{\min} = V_T \times AF$) berechnet. Da die Kälber während des Versuches an Gewicht zunahmten und die Volumina der Ventilation (V_T und V_{\min}) Körpermasse abhängige Größen sind, erfolgte die Berechnung von V_T/kg und V_{\min}/kg .

3.2.3.6 Blutgasanalyse und Hämoxymetrie (d39 bis d45)

Blutentnahmen

Arterielle Blutentnahmen wurden über Verweilkatheter Cavafix Certo (B.BRAUN, MELSUNGEN) mit aufgesetztem Dreiwegehahn (B.BRAUN, MELSUNGEN), welche in der *Aorta abdominalis* der jeweiligen Tiere plaziert waren, durchgeführt. Die Katheter legten wir am Tag 39 des Versuches bei jeweils 6 Tieren der Versuchs- und der Kontrollgruppe. Die Punktion der *Aorta abdominalis* erfolgte nach einer Methode, die ursprünglich von LOGVINOV (1971) beschrieben und von uns leicht modifiziert wurde. Dazu wurde ein etwa 10 cm breiter und 25 cm langer Streifen beiderseits der Lendenwirbelsäule rasiert. Nach durchgeführter Desinfektion erfolgte die Punktion mit einer sterilen 20 cm langen Hohlneedle mit Mandrain. Nach Erreichen und Punktieren der *Aorta abdominalis* wurde der Mandrain entfernt, durch die Hohlneedle der Katheter plaziert und auf seine Funktionsfähigkeit überprüft. Nach Entfernung der Hohlneedle wurde eine Kanüle in das Katheterlumen eingeführt, und auf die Kanüle ein Dreiwegehahn (B.BRAUN, MELSUNGEN) aufgesetzt. Das sich extrakorporal befindende Katheterstück mit Kanüle und Dreiwegehahn fixierten wir durch Verkleben auf dem Rücken des Tieres.

Vor der Entnahme des arteriellen Blutes wurde der Katheter zunächst mit isotoner NaCl-Lösung gespült. Nach erfolgter Blutentnahme spülten wir den Katheter mit isotoner NaCl-Lösung und fluteten dann sein Lumen mit einer Heparinlösung (500 IE/ml), um eine Blutgerinnung im Katheter zu verhindern. Am letzten Tag unserer Untersuchungen wurde von Tieren, welche keinen Katheter erhalten hatten, Proben durch Punktion der *Aorta abdominalis* direkt vor der schmerzlosen Tötung der betreffenden Kälber gewonnen.

Zur Blutgasanalyse entnahmen wir den Tieren zeitgleich je zwei venöse und zwei arterielle Blutproben parallel. Dazu wurden Spritzen (Pico P50, RADIOMETER, Kopenhagen) benutzt. Das Blut wurde luftblasenfrei aufgezogen, sofort danach verschlossen wir die Spritzen und schwenkten sie vorsichtig. Die nachfolgende Analytik führten wir entweder sofort oder nach Lagerung (max. 0,5 h) im Kühlschrank (0-4 °C) durch.

Verwendete Analysengeräte und erfasste Parameter

Zur Analyse der Blutgaspartialdrücke und des Säuren-Basen-Haushalts verwendeten wir das Gerät ABL 500 (RADIOMETER, Kopenhagen). Die bei 37 °C (Gerätetemperatur) ermittelten Messwerte korrigierte das Gerät nach manueller Eingabe der aktuellen Probandentemperatur automatisch.

Die Hämoxymetriedaten wurden mit dem Gerät OSM 3 derselben Firma im Tierblutmodus „Rind“ ermittelt.

Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der analysierten Blutgas- und Hämoximetriedaten

Parameter	Abkürzung	Einheit	Messgerät	manuell berechnet
Sauerstoffpartialdruck im arteriellen und venösen Blut	P_aO_{2T}, P_vO_{2T}	kPa	ABL 500	
Kohlendioxidpartialdruck im arteriellen und venösen Blut	P_aCO_{2T}, P_vCO_{2T}	kPa	ABL 500	
Sauerstoffsättigung des Hämoglobins arteriell und venös	S_aO_2, S_vO_2	%	ABL 500	
Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut bei Halbsättigung	P_a50T	kPa	ABL 500	
alveolo - arterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz	$A-aDO_2$	kPa	ABL 500	siehe Text
arterio - venöse Sauerstoffdifferenz	$a-vDO_2$	Vol %		siehe Text
Anteil des Shunt - Volumens im arteriellen Blut	$Shunt_T$	%	ABL 500	
pH - Wert im arteriellen und venösen Blut	pH_{aT}, pH_{vT}		ABL 500	
Standard – Basenüberschuss im arteriellen und venösen Blut	SBE_a, SBE_v	mmol/l	ABL 500	
aktueller Basenüberschuss im arteriellen und venösen Blut	ABE_a, ABE_v	mmol/l	ABL 500	
Bikarbonationenkonzentration bei Standardbedingungen im arteriellen und venösen Blut	SBC_a, SBC_v	mmol/l	ABL 500	
Bikarbonationenkonzentration bei aktuellem pH und PCO_2 im arteriellen und venösen Blut	HCO_{3a}^-, HCO_{3v}^-	mmol/l	ABL 500	
Gesamthämoglobin	tHb_a	mmol/l	OSM 3	
Oxyhämoglobin	O_2Hb_a	%	OSM 3	
Carboxyhämoglobin	$COHb_a$	%	OSM 3	
Methämoglobin	$MetHb_a$	%	OSM 3	
Reduziertes Hämoglobin	RHb_a	%	OSM 3	

Erläuterungen zu Tabelle 8:

Indizes: a = arteriell, v = venös, T = auf aktuelle Körpertemperatur korrigiert

Mit Hilfe des Computerprogramms EXCEL 97 wurden nachstehende Werte berechnet:

a-vDO₂ = arterio-venöse Sauerstoffdifferenz

$$(1) \quad a - vDO_2 = \frac{S_a O_2 \times 1,39 \times (tHb - (MetHb + COHb))}{100} - \frac{S_v O_2 \times 1,39 \times (tHb - (MetHb + COHb))}{100}$$

P_AO₂ = alveolärer Sauerstoffpartialdruck

$$(2) \quad P_A O_2 = ((P_B - P_{H_2O}) \times F_I O_2) - \frac{P_a CO_2}{RQ}$$

wobei gilt:

P_B = aktueller Barometerdruck

P_{H₂O} = Wasserdampfdruck bei Körpertemperatur

F_IO₂ = inspiratorische Sauerstofffraktion (= 0,209)

RQ = respiratorischer Quotient des Kalbes (= 0,91), nach REINHOLD und FÖDISCH (1993)

A-aDO₂ = Alveolo-arterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz

$$(3) \quad A - aDO_2 = P_A O_2 - P_a O_2 \quad (\text{UYSTERPRUYST et al., 2000})$$

3.2.3.7 Sektion der Tiere, Erfassung und Auswertung pathologisch-anatomischer Befunde

Euthanasie und Sektion

Die Sektion der Kälber erfolgte am Tag 45 (d45) des Versuches in der Sektionshalle des FLI, Standort Jena durch den Pathologen des Institutes. Jedes Tier wurde unmittelbar vor der Sektion mit 2,5 g/20 ml Surital (PHARMACIA & UPJOHN) *i. v.* euthanasiert. Anschließend wurde die Trachea freipräpariert und mit Arterienklemmen verschlossen, um ein Eindringen von Blut in die Lunge beim Entbluten des Tieres zu verhindern.

Bei Tieren, die vor Abschluss des Versuches verendeten, erfolgte ≤ 10 h *post mortem* die Sektion. Bis zur Sektion wurden die verendeten Tiere im Kühlraum der Sektionshalle aufbewahrt.

Untersuchung und Dokumentation der pathologisch anatomischen Veränderungen an den Organen der äußeren Atmung

Zunächst erfolgte eine makroskopische Beurteilung der sichtbaren pathomorphologischen Veränderungen des respiratorischen Systems. Die Befunde wurden je Tier schriftlich fixiert. Im Anschluss erfolgte die Dokumentation der Quantität der Veränderungen der Lungenoberflächen. Hierzu wurden die veränderten Bereiche auf ein dorsales und ein ventrales Raster-schema der Lunge übertragen. Die Raster zählten wir nach Abschluss der Sektion aus. Damit konnte semiquantitativ eine prozentuale Auswertung der veränderten Lungenbereiche vorgenommen werden.

Zusätzlich erfolgt eine Fotodokumentation der Lungen.

Die Hauptbronchien und die Trachea wurden eröffnet beurteilt und auf eventuell enthaltenes Sekret untersucht.

Die Mediastinallymphknoten und die Tonsillen wurden freipräpariert und auf Veränderungen untersucht.

Probenentnahme zur bakteriologischen Untersuchung

Bei jedem Tier erfolgten im Verlauf der Sektion Probenentnahmen für die mikrobiologischen Untersuchungen bezüglich Pasteurellen (einschließlich *Mannheimia haem. A1*) und Mykoplasmen. Mit in Alkohol desinfizierten und abgeflammt Scheren und Pinzetten entnahmen wir Proben von veränderten Lungenbezirken, Hauptbronchien, Trachea, Tonsillen und Mediastinallymphknoten. Die Proben wurden einzeln in sterile und beschriftete Petrischalen verbracht. Dreißig bis sechzig Minuten nach ihrer Entnahme wurden die Proben den auf dem Gelände des FLI, Standort Jena, befindlichen Laboratorien übergeben, dort weiter bearbeitet und bakteriologisch untersucht.

3.2.3.8 Differenzialdiagnostik durch direkten und serologischen Erregernachweis

Die Untersuchungen der gewonnenen Tupferproben sowie der Blutproben erfolgte in den zuständigen Laboratorien nach den laboreigenen Methoden. Eine Zusammenfassung der Laboratorien und der angewandten Methoden ist in den Tabellen 9 und 10 dargestellt.

Tabelle 9: Methoden des indirekten Erregernachweises im venösen Blut (Serologie)

Untersuchter Parameter	Labor (Ort)	Methodik
AK Mycoplasmen	FLI, Standort Jena, Arbeitsgruppe Mykoplasmen	ELISA
AK Salmonellen	FLI, Standort Jena, Arbeitsgruppe Salmonellen	LAA 422-03
AK <i>Mannheimia haem. A1</i> CPS	Clinical Development Pfizer, Belgien	ELISA
<i>Mannheimia haem. A1</i> Leukot- xin Serumneutralisation	Clinical Development Pfizer, Belgien	ELISA
LPS von <i>Mannheimia haem. A1</i>	Fa. BioCheck Labor für Veterinärdiagnostik und Umwelthygiene GmbH, Leipzig	Limulus-Amöbozyten- Lysat-Test

Erläuterungen zu Tabelle 9:

LAA: Laborarbeitsanweisung; AK: Antikörper

Tabelle 10: Methoden zum direkten Erregernachweis

Untersuchter Parameter	Labor (Ort)	Methodik
Nachweis Pasteurellen (einschließlich <i>Mannheimia haem. A1</i>) aus NT	FLI, Standort Jena, Arbeitsgruppe Atemwegserkrankungen	LAA: 412.3i02.doc; 412.4d01; 412.3i03.doc; 412.4d02; 412.4i01.doc; 412.4n01.doc; 412.4k01.doc; 412.4n07
Nachweis Mykoplasmen aus NT	FLI, Standort Jena, Arbeitsgruppe Mykoplasmen	LAA: 416.01; 416.03; 416.05; 416.06
Nachweis Salmonellen aus KT	FLI, Standort Jena, Arbeitsgruppe Salmonellen	LAA: 422.22
Nachweis Kryptosporidien aus KA	FLI, Standort Jena, Arbeitsgruppe Pathologie	LAA: 423.61

Erläuterungen zu Tabelle 10:

LAA: Laborarbeitsanweisung; KT: Kottupfer; NT: Nasentupfer; KA: Kotasstrich

Zum Nachweis der Antikörper gegen BVDV, BHV-1, BRSV, Adenovirus 3 und PIV-3 wurde der Respiratorische Penta-ELISA-Kit der Firma Bio-X-Diagnostics angewandt. Der Nachweis der Antikörper gegen Coronavirus und PIV-3 erfolgte mit dem Hämagglutinationshemmungstest. Diese Untersuchungen nahm die Arbeitsgruppe (Agr.) "Virologie" des FLI, Standort Jena, vor.

3.3 Angewandte statistische Verfahren, mathematische Auswertungen und Darstellung der Ergebnisse

Die mathematische Aufarbeitung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Software-Paket Microsoft EXCEL 97. Die statistische Analyse der Werte wurde unter Zuhilfenahme des Computerprogramms STATGRAPHICS Plus 4.0 (Manugistics, Inc.) durchgeführt.

Daten, welche einer Normalverteilung unterlagen, sind im Abschnitt 4 (Ergebnisse) als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt. Zusätzlich sind in den Tabellen 28 - 30 die Medianwerte, Minima und Maxima aufgeführt.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den *ante* und *post infectionem* ermittelten Werten wurden mit Hilfe der multifaktoriellen Varianzanalyse ANOVA (Multiple-Range-Test, least significant difference [LSD]) bestimmt. Hierbei wurden in Abhängigkeit vom Untersuchungsparameter bei Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p \leq 0,05$ Werte als statistisch signifikant verändert beurteilt. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests bzw. des W-Tests nach Mann-Whitney-Wilcoxon (beide basierten auf dem Vergleich der Medianwerte) mit einer Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$ untersucht.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten zur spektralen Resistance, spektralen Reactance und der zu den jeweiligen Frequenzen gehörenden Kohärenzen erfolgt mittels Mann-Whitney (Wilcoxon) W Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$.