

## **3. Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Tiere**

#### **3.1.1 Untersuchungsabschnitt 1: Klinisch gesunde Kälber**

Als klinisch gesunde Kälber wurden 12 Tiere der Rassen Holstein Schwarzbunt sowie Milchrind x Milchrind ausgewählt. Die ausschließlich weiblichen Tiere stammten aus der Agrargenossenschaft Pfiffelbach (Thüringen). Zum Zeitpunkt der Einstellung waren die Kälber zwischen 42,0 und 57,2 kg schwer und zwischen 14 und 25 Tage alt. Nach der Aufstallung im Tierhaus des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI), Standort Jena, wurden die Kälber einem routinemäßigen Einstellungsmonitoring unterzogen, dessen Ergebnisse in Tab. A 5 zusammengefasst sind. Hierzu gehörte - neben der Bestimmung der Rektaltemperatur und der Körpermasse (Tierwaage Sartorius, Göttingen) - die Gewinnung von Blutproben für serologische Untersuchungen sowie die Entnahme von Kot- und Nasentupfern zur Diagnostik bzw. zum Ausschluss möglicher Infektionen mit Salmonellen, Chlamydien, Mykoplasmen und Pasteurellen bzw. Mannheimien sowie die Anfertigung von Kotausstrichen zum Nachweis von enteralen Parasiten bzw. Cryptosporidien. Bei allen 12 Tieren wurde dabei ein schwacher bis starker Cryptosporidienbefall diagnostiziert. *M. bovirhinis* konnte bei 6/12, *M. bovis* bei 5/12, sowie eine Mischkultur aus *M. bovirhinis* und *M. bovis* bei einem Kalb isoliert werden. Chlamydien, Salmonellen oder Pasteurellen waren in keiner der entnommenen Proben nachweisbar. Nach einer Quarantänisierungszeit von 15 – 22 Tagen, während der die Tiere täglich untersucht wurden (Kap. 3.3), konnten alle 12 Kälber als klinisch gesund befunden und in die Studie eingeschlossen werden.

Der Untersuchungsabschnitt 1 dauerte insgesamt 7 Monate. Während dieses Zeitraums wurden die Tiere im monatlichen Abstand gewogen. Tab. A 5 widerspiegelt die Entwicklung von Lebensalter und Körpermassen vom Zeitpunkt der Einstellung bis zum letzten Lebenstag. Die Ergebnisse weiterer während des Untersuchungszeitraums durchgeführter diagnostischer Maßnahmen, die zur Überwachung des mikrobiologischen Status der Einzeltiere dienten (Verlaufskontrollen), sind in der Tab. A 9 zusammengefasst.

#### **3.1.2 Untersuchungsabschnitt 2: Kälber mit natürlich erworbener *Chlamydia-psittaci*-Infektion**

Für den 2. Untersuchungsabschnitt wurden gezielt Kälber aus Beständen angekauft, in denen der zuständige Hoftierarzt Chlamydien-assoziierte tiergesundheitliche Probleme vermutete. Insgesamt wurde diese Versuchsgruppe aus 7 weiblichen und 6 männlichen Kälbern (Rassen Holstein Schwarzbunt und Rotbunte) verschiedener Bestände aus Nordrhein-Westfalen zusammengestellt. Zum Zeitpunkt der Einstellung waren die Tiere zwischen 8 und 25 Tagen alt und wogen zwischen 32,4 und 48,6 kg.

In Ergänzung zu dem bereits unter 3.1.1 beschriebenen Einstellungsmonitoring wurde jedem Tier dieses Abschnittes eine Gewebeprobe aus der Ohrmuschel entnommen, um eine Untersuchung auf BVD/MD (Bovine Virus-Diarrhoe/Mucosal disease) Virusantigen durchzuführen. Im Ergebnis der Einstellungsuntersuchungen (Tab. A 7) waren *Chlamydia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Mycoplasma bovirhinis* und eine schwache bis starke Besiedelung mit Cryptosporidien, nicht aber Salmonellen oder BVD/MD nachweisbar. Die häufige Nachweisrate von Chlamydien bestätigte die Anamnese des Hoftierarztes. An den Quarantänisierungszeitraum, der für die Tiere dieser Gruppe zwischen 9 und 23 Tagen

variierte, schloss sich der Untersuchungsabschnitt 2 an, dessen Dauer - in Parallelität zum Untersuchungsabschnitt 1 - ebenfalls 7 Monate betrug. Die während dieser Zeit registrierten Veränderungen bezüglich Alter und Körpermasse der Kälber widerspiegelt Tab. A 5. Tab. A 10 gibt einen Überblick über die Befunde, welche während des gesamten Untersuchungszeitraums zur Überwachung des mikrobiologischen Status der Einzeltiere dienten.

#### **3.1.3 Untersuchungsabschnitt 3: Kälber mit experimentell induzierter *Mycoplasma bovis*-Infektion**

Für den Untersuchungsabschnitt 3 wurden 18 männliche Kälber der Rasse Holstein Schwarzbunt aus der Agrargenossenschaft Niederpöllnitz (Thüringen) ausgewählt. Bei Einstellung in das Tierhaus des FLI am Standort Jena waren die Tiere zwischen 15 und 35 Tagen alt und wogen zwischen 46,2 und 77,2 kg (Tab. A 6).

Auch bei diesen Tieren wurde neben der Bestimmung der Rektaltemperatur und der Körpermassen das unter 3.1.2 erwähnte Einstellungsmonitoring durchgeführt, dessen Ergebnisse in Tab. A 8 zusammengefasst sind. In Ergänzung wurden von jedem Tier Serumproben auf Antikörper gegen *Mycoplasma bovis* untersucht. Entsprechend der Befunde des Einstellungsmonitorings waren alle Tiere frei von *M.-bovis*-Infektionen und wiesen auch im Serum keine maternalen Antikörper gegen *M. bovis* auf. Des Weiteren war in keiner der untersuchten Gewebeproben (Biopstat aus dem Ohrknorpel) BVD/MD Antigen nachweisbar. Salmonellen, Mykoplasmen und *Pasteurella/Mannheimia* spp. konnten aus keinem der entnommenen Tupfer kultiviert werden. Sporadisch wurden Cryptosporidien und Chlamydien nachgewiesen.

Nach einem Quarantänisierungszeitraum von 21 – 22 Tagen wurden alle Tiere als klinisch gesund eingestuft und randomisiert in eine experimentell mit *M. bovis* zu infizierende Gruppe (n = 12) und eine Kontrollgruppe (n = 6) unterteilt.

#### **3.1.4 Haltung und Fütterung**

Die Kälber aller Untersuchungsabschnitte wurden zu je 6 Tieren in klimatisierten Laufställen des Tierhauses am Standort Jena des Friedrich-Loeffler-Instituts untergebracht, wobei jedem Kalb eine Mindestgrundfläche von 1,5 m<sup>2</sup> zur Verfügung stand. Der Bereich der Liegeflächen wurden 2-mal täglich mit frischem Stroh eingestreut. Nur während der Tränkzeit fand eine Fixation der Tiere über Halsbänder statt.

Heu und frisches Trinkwasser (Selbsttränken) standen jedem Tier von Einstellung bis Ende eines jeden Untersuchungsabschnittes *ad libitum* zur Verfügung. Die Milchtränke bestand aus anfangs 3 Mahlzeiten Milchaustauscher (Kälbersegen 50 16-F, Fa. Basu-Mineralfutter GmbH) täglich und wurde ab etwa dem 2. Lebensmonat auf 2 Mahlzeiten pro Tag reduziert. In den Untersuchungsabschnitten 1 und 2 wurde ab dem 2. Lebensmonat zusätzlich Schrot zugefüttert. Etwa im 4. Lebensmonat der Kälber wurde die Milchtränke dann vollständig eingestellt.

Zeigte eines der Tiere Durchfall, wurde der Milchaustauscher abgesetzt und über mindestens zwei Tagen zu zwei Drittel bis vollständig (in Abhängigkeit vom Schweregrad der Diarrhoe) durch die Diättränke Bio-Floracid® (Albrecht, Aulendorf) ersetzt. Zusätzlich wurde die Elektrolyttränke Glycostar, (WDT, Garbsen) angeboten. Im weiteren Verlauf wurde zunächst ein fettreduzierter Milchaustauscher (Kälbersegen diät 12-F, Basu-Mineralfutter GmbH) und - bei kontinuierlicher Besserung des klinischen Bildes - der gewohnte Milchaustauscher getränkt. Im zeitlichen Zusammenhang mit jeder Tränkzeit wurde der

Gesundheitszustand eines jeden Tieres mehrmals täglich erfasst und dokumentiert (Kap. 3.3).

## 3.2 Versuchsanordnungen

Der Untersuchungsabschnitt 3 entsprach einem nach Tierschutzgesetz genehmigungspflichtigen Versuchsvorhaben. Die Zustimmung zur Durchführung wurde, entsprechend dem Tierschutzgesetz in der Fassung vom 25.05.98 vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz mit der Registriernummer 04-02/03 am 11.11.03 erteilt.

### 3.2.1 Untersuchungsabschnitt 1

Ziele dieses Untersuchungsabschnittes waren zum Einen die Beurteilung methodischer Einflussfaktoren auf die AKO-Gewinnung beim Kalb und zum Anderen die für diese Tierart geltenden physiologischen Zusammenhänge bezüglich der ausgewählten AKO-Inhaltsstoffe. Alle 12 für den Untersuchungsabschnitt 1 angekauften und als klinisch gesund eingestuft Kälber wurden einbezogen (Kap. 3.1.1). Der prinzipielle zeitliche Ablauf dieses Untersuchungsabschnittes ist in Abb. 8 schematisch dargestellt.

Beginnend in der 5. – 7. Lebenswoche wurde in monatlichem Abstand an jedem Tier eine Atemkondensatprobe gewonnen. Dies erfolgte vom 2. bis zum 7. Lebensmonat der AKO-Gewinnung prinzipiell etwa 2 - 4 Stunden nach der morgendlichen Fütterung. Parallel zur AKO-Gewinnung im 7. Lebensmonat der Kälber wurde unmittelbar nach Ende der AKO-Sammelzeit zusätzlich eine venöse Blutprobe gewonnen.

Nach Abschluss der 6 AKO-Probenahmen wurde ein zeitnahe Sektionszeitpunkt für jedes Tier festgelegt. An diesem Tag erhielt das betreffende Tier keine morgendliche Schrotfütterung mehr, so dass sowohl die Gewinnung von AKO als auch von Serum am ‚nüchternen‘, d. h. ungefütterten Tier erfolgte. Nach Sicherstellung dieser *in-vivo*-Proben wurde das Tier der Sektion zugeführt. Die Gewinnung von BALF erfolgte *ex vivo* an der frisch exenterierten Lunge (Kap. 3.7).

Nach Beendigung des gesamten Versuchsvorhabens wurden die konservierten AKO, Serum- und BALF-Proben zur Analyse von 8-Isoprostan, Nitrit, Harnstoff, Ammonium und Gesamtprotein an das Untersuchungslabor verschickt (Kap. 3.8.2)

### 3.2.2 Untersuchungsabschnitt 2

Ziel dieser Versuchsanordnung sollte ein Vergleich von Kälbern mit einer natürlich erworbenen *Chlamydia-psittaci*-Infektion und einer von chlamydialen Infektionen freien Kälbergruppe sein. Hierzu wurden retrospektiv aus den Tiergruppen, die für die Untersuchungsabschnitte 1 und 2 angekauft wurden, folgende Einzeltiere ausgewählt und in Subgruppen zusammengefasst:

Gruppe Chl.- (n = 6): Klinisch gesunde Kälber des Untersuchungsabschnittes 1, bei denen in der pathologisch-anatomischen-Untersuchung der Lunge und der Tonsillen *Chlamydia psittaci* oder *Mycoplasma bovis* nicht nachgewiesen werden konnten (Tab. A 11). In der Verlaufsuntersuchung konnte bei diesen Tieren ebenfalls keine Veränderung des Chlamydien-Antikörper-Titers nachgewiesen werden. Auch die Ergebnisse der Augentupfer-Untersuchungen war stets negativ (Tab. A 9).

Dazu gehörten die Tiere mit den Nummern: 2, 6, 7, 8, 9, 12

Gruppe Chl.+ (n = 10): Klinisch gesunde Kälber des Untersuchungsabschnittes 2, bei denen in der Verlaufskontrolle Titeranstiege auf eine Chlamydien-Infektion hindeuteten (Tab. A 10) oder in der pathologisch-anatomischen-Untersuchung des Lungengewebes *Chlamydia psittaci* nachweisbar war (Tab. A 18).

Dazu gehörten die Tiere mit den Nummern: 466, 468, 469, 470, 471, 473, 474, 475, 476, 477

Abb. 8 fasst den Verlauf dieses 7 monatigen Untersuchungsvorhabens schematisch zusammen. Prinzipiell folgte dieser dem unter 3.2.1, für die 12 Kälber des Untersuchungsabschnitts 1 beschriebenen, methodischen Ablauf.

<b>Klinische Untersuchung</b> (täglich)						
Entnahme von Nasen- und Kottupfern (UA: 1 + 2) sowie Augentupfern (UA: 2)						
monatlich, parallel zu AKO - Gewinnung						
Probennahme 2 - 4 h nach der Morgentranke						nüchtern
1. Monat*	2. Monat*	3. Monat*	4. Monat*	5. Monat*	6. Monat*	Sektion
UA 1: 5. - 7. **	UA 1: 9. - 11. **	UA 1: 13. - 16. **	UA 1: 17. - 19. **	UA 1: 21. - 23. **	UA 1: 25. - 27. **	UA 1: 27. - 30. **
UA 2: 5. - 6. **	UA 2: 8. - 10. **	UA 2: 13. - 14. **	UA 2: 16. - 18. **	UA 2: 21. - 22. **	UA 2: 24. - 26. **	UA 2: 27. - 29. **
AKO	AKO	AKO	AKO	AKO	AKO	AKO
					Serum	Serum
						BALF

Abb. 8: Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Untersuchungsabschnitte 1 und 2

Erläuterungen zu Abb. 8 und 9:

\* = Versuchsmonat

\*\* = Lebenswoche

\*\*\* = Versuchswoche

AKO = Atemkondensat

BALF = broncho-alveoläre

Lavageflüssigkeit

d a.i. = Tag *ante infectionem*

d p.i. = Tag *post infectionem*

LeWo = Lebenswoche

n = Anzahl der zu diesem Zeitpunkt lebenden Tiere

nüchtern = keine morgendliche

Fütterung (Heu + Wasser *ad libitum*)

UA = Untersuchungsabschnitt

**3.2.3 Untersuchungsabschnitt 3**

Ziel dieses Abschnittes der Untersuchungen war es, Atemkondensat- und BALF-Proben von Kälbern im Zusammenhang mit einer experimentellen Infizierung mit *Mycoplasma bovis* zu untersuchen.

Das Schema dieses 7-wöchigen Versuches ist in Abb. 9 zusammengefasst. Dieser unterschied sich im Hinblick auf die Versuchsgruppengestaltung und die Methodik der

Probenahme von den Untersuchungsabschnitten 1 und 2. Die experimentelle Infizierung trennte die 7 Versuchswochen in einen 2-wöchigen Abschnitt *ante infectionem* (-11, -5. d a.i.) und einen 5-wöchigen Abschnitt, während dem 7 Probennahmen (3., 7., 10., 14., 17., 21., 35. d p.i.) *post infectionem* durchgeführt wurden.

Im Unterschied zu den Untersuchungsabschnitten 1 und 2 wurde den Kälbern parallel zu jeder AKO-Gewinnung eine venöse Blutprobe entnommen. Bereits ab dem 3. Tag *post infectionem* wurden Kälber der Versuchs- und der Kontrollgruppe ausgewählt, von denen im nüchternen Zustand vor dem jeweiligen Sektionszeitpunkt AKO, Serum und postmortal die BALF gewonnen wurden. Wie unter 3.3 beschrieben, wurde mit dem Beginn der Gruppeneinteilung eine tägliche klinische Allgemeinuntersuchung durchgeführt.

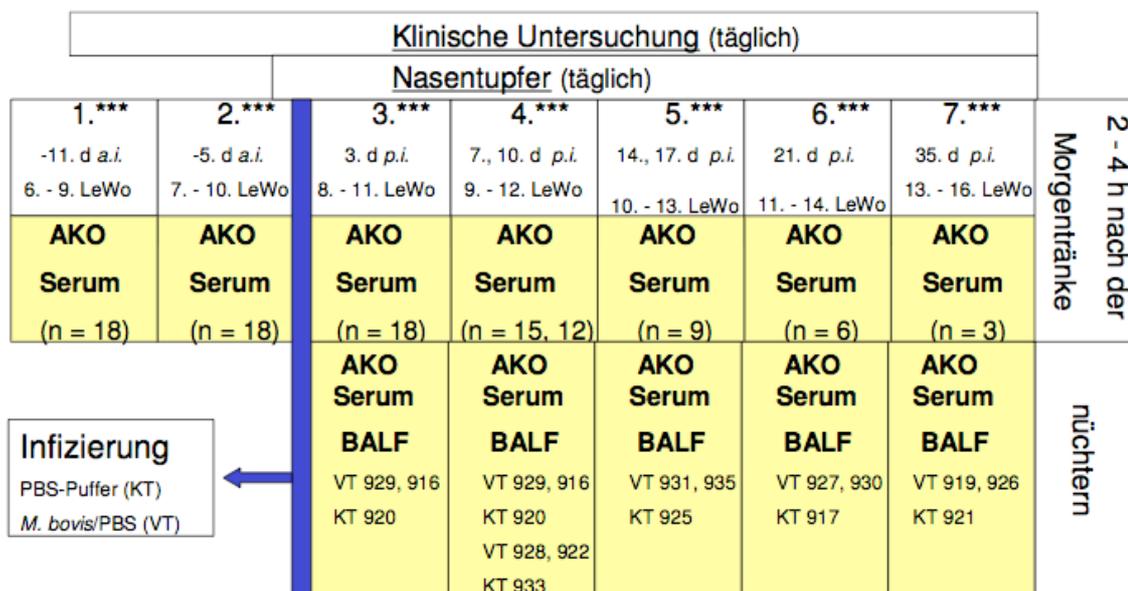


Abb. 9: Darstellung des zeitlichen Ablaufes des Untersuchungsabschnittes 3

### 3.3 Klinische Untersuchung/Klinischer Score (Untersuchungsabschnitte 1 - 3)

Während der Untersuchungsabschnitte 1 - 3 fand, beginnend mit dem Tag der Einstallung, eine tägliche klinische Allgemeinuntersuchung eines jeden Tieres statt. Durch den jeweilig betreuenden Tierpfleger wurde zu jeder Tränkzeit der Allgemeinzustand der Kälber kontrolliert und im Krankenblatt dokumentiert. Dazu gehörte die Kontrolle des Allgemeinbefindens und der Futteraufnahme sowie die Erhebung klinischer Parameter wie der Ruheatemfrequenz, der Rektaltemperatur, Husten, Kotbeschaffenheit, Augen- und Nasenausfluss. Auch die durchgeführten Probennahmen (KoT, NaT, KoA, AKO, Serum, BALF), Lungenfunktionsmessungen, Behandlungen, Umstellungen, Fütterungsänderungen und die Kontrolle der Körpermassezunahmen (monatlich im UA 1, 2 und wöchentlich im UA 3) wurden somit während der Untersuchungsabschnitte 1 - 3 schriftlich im Krankenblatt festgehalten.

Eine weitergehende Befunderhebung wurde während des 3. Versuchsabschnittes mittels eines Bewertungssystems für klinische Parameter [modifiziert nach Behrmann 1995 (Tab. A 13)] erhoben, nach dem für jedes Kalb die Vergabe eines klinischen Gesamtscores des

jeweiligen Versuchstags, unter besonderer Berücksichtigung des respiratorischen Systems, möglich wurde.

### 3.4 Infizierung (Untersuchungsabschnitt 3)

Infektionsstamm: Das Studiendesign des 3. Untersuchungsabschnittes sah eine experimentelle Infizierung der 12 Versuchskälber mit *Mycoplasma bovis* vor. Der verwendete *M.-bovis*-Stamm BX 89/97 wurde in Irland von einer an Mastitis erkrankten Kuh isoliert und 1997 am FLI, Jena aufgenommen. Für das Waschen, die Resuspendierung und die Applikation des Erregers wurde PBS-Puffer verwendet. Die Keimzahl der Infektionskultur lag zwischen  $4 \times 10^8$  und  $1 \times 10^9$  kbE/ml.

Applikation der Infektionskultur: Die Infizierungen wurden mit Hilfe zweier Düsenvernebler (Pari-Provokation Test II, Dr. Beckman GmbH, Seefeld) durchgeführt. Dazu wurden ca. 11 - 12,5 ml des *Mycoplasma-bovis*-haltigen PBS für jedes Kalb in einen Aerosolbeutel (Pari-Provokation Test II – Aerosolbeutel, Dr. Beckman GmbH, Seefeld) vernebelt und anschließend unter Verwendung einer individuellen Atemmaske (Narkosemaske groß, Plexiglas, Heiland) aus dem Beutel abgeatmet. Da das Fassungsvermögen des Reservoirbeutels 10 Liter betrug, musste dieser Vorgang insgesamt jeweils 30 mal wiederholt werden, sodass ein Volumen von 300 Litern Aerosol pro Kalb erreicht werden konnte. Im Anschluss an die inhalative Infektion erfolgte eine intranasale Applikation von jeweils 5 ml je Nasenöffnung des verwendeten Erreger-haltigen Mediums mittels einer Dralldüse (Bezirksinstitut für Veterinärwesen, Stendal). Zu den allgemeinen Infektionsschutzmaßnahmen gehörte dabei für das Personal ein Tragen von Handschuhen und Mundschutz, sowie die Filterung der expirierten Atemluft des Kalbes (Pall, Pro-Tec, Pall Medical GmbH, Dreieich).

Keimzahlbestimmung nach Abschluss der Infizierung: Im nicht vernebelten Überstand wurde im Anschluss an die Infizierung eine Keimzahl von  $2,5 \times 10^6 - 1 \times 10^8$  vermehrungsfähigen Bakterien bestimmt. Die Reduktion der Erregerkonzentration um 1 – 2 log-Stufen durch während des Vernebelungsprozesses auftretende mechanische Scherkräfte oder die Abscheidung innerhalb der Versuchsanlage wurden nicht genauer untersucht.

Parallel zur Infizierung der Versuchstiere wurde bei den 6 Kontrolltieren eine nach gleicher Methodik durchgeführte Applikation erregerefreien PBS-Puffers vorgenommen.

### 3.5 Sektion (Untersuchungsabschnitte 1 - 3)

Zur schmerz- und exzitationsarmen tiefen Narkose wurde jedem Tier eine Überdosis des Barbiturates Trapanal (Atlanta Pharma Dt. GmbH, Konstanz, Wirkstoff: 2,5 g Thiopental), in die *Vena jugularis* injiziert. Nach Eintritt der Bewusstlosigkeit und der damit verbundenen Empfindungslosigkeit, wurde der Hals ventral eröffnet, die Trachea freipräpariert und mit Klemmen vor Aspiration des Panseninhaltes geschützt. Die Jugularvenen beider Seiten wurden sofort eröffnet und das Tier kopfüber an den Hinterläufen aufgehängt, um ein Ausbluten bei noch erhaltenem Kreislaufsystem zu erreichen. Dadurch erfolgte der Eintritt des Todes am narkotisierten Tier.

Die pathologisch-anatomische Untersuchung der Tiere wurde von der zuständigen Pathologin am Friedrich-Loeffler-Institut, Jena durchgeführt. Zu den entnommenen Organen

zählten das Geschlinge (Zunge, Rachenorgane, Trachea, Lunge, Lungenlymphknoten, Herz), Milz, Popliteallymphknoten, sowie veränderte Organe und Gewebe. Die verbliebenen Körperteile wurden der Tierkörperbeseitigung zugeführt.

Nach Absetzen der Trachea etwa 1 cm vor der Bifurkation wurde umgehend die bronchoalveoläre Lavage durchgeführt (Abschnitt 3.7). In allen Untersuchungsabschnitten wurde eine genaue Dokumentation der Lavagierungslokalisationen sowie makroskopisch sichtbarer äußerlicher Veränderungen der Lungenoberfläche auf ein gestempeltes Schema der bovinen Lunge vorgenommen. Zum direkten Erregernachweis (Tab. A 11 und A 12) wurden Gewebeproben aus den Lungenlappen, Lungenlymphknoten, der Tonsillen, der Trachea, sowie verändert erscheinender Organe entnommen. Abschnitte der *A. pulmonalis* und des Rectum wurden nur während der Untersuchungsabschnitte 1 und 2 beprobt.

### **3.6 In vivo gewonnenes Probenmaterial (Untersuchungsabschnitte 1 - 3)**

Nasentupfer: Vor der Anfertigung eines Abstriches der Nasenhöhlenwände mittels steriler Wattestäbchen wurden die Tiere am Kopf fixiert und die Nasenöffnungen mit einem trockenen Tuch grob gereinigt. Je nach Untersuchungsziel wurden ein bzw. zwei Tupfer entnommen und bis zur weiteren Erregeranzucht in sterilen, bzw. mit Penicillin-haltigem Medium (nur für Mycoplasmenanzucht) angereicherten Glasröhrchen (Heiland, Hamburg) aufbewahrt.

Augentupfer: Probennahmen durch Augentupfer wurden in monatlichen Abständen von den Kälbern des Untersuchungsabschnittes 2 im Zuge der Verlaufsuntersuchung vorgenommen. Dazu wurde mit einem sterilen Wattestäbchen Sekret aus den Bindehäuten der Kälber abgestrichen und zur sofortigen Untersuchung in einem sterilen Glasröhrchen (Heiland, Hamburg) an die untersuchenden Laboratorien weitergeleitet.

Kotausstriche, Kottupfer: Während des Einstellungsmonitoring und der wöchentlich (Untersuchungsabschnitt 3) bzw. monatlich (Untersuchungsabschnitte 1, 2) durchgeführten Verlaufsuntersuchung wurde bei den Kälbern mit Hilfe eines Wattestäbchens rektal eingegangen um frische Proben zu gewinnen. Die auf diese Weise gewonnenen Kottupfer wurden direkt oder nach Ausstrich auf einem Objektträger an die Untersuchungslaboratorien weitergeleitet.

Ohrknorpel: Im Rahmen des Einstellungsmonitoring wurde mit Hilfe einer Biopsiezange jeweils eine Gewebeprobe des äußeren Randes der Ohrmuschel bei den Kälbern der Untersuchungsabschnitte 2 und 3 zur Untersuchung auf BVD/MD-Antigen entnommen.

Blutproben: Venöse Blutproben wurden aus den Jugularvenen entnommen (Monovetten, Sarstedt). Dazu wurde der Bereich der Punktionsstelle rasiert, mit Isopropanol und einem sterilen Tupfer gereinigt und angestaut. Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben 15 Minuten lang bei einer Temperatur von 15 °C und bei 4000 Umdrehungen pro Minute (3939 g) zentrifugiert (Labofuge 400R, Kendro, Hanau) und zu je 1,4 ml in Eppendorfgefäßen portioniert (Eppendorf-Safe lock Reaktionsgefäß, Hamburg) und bei -20 °C gelagert. Transporte ins Untersuchungslabor (FILT) erfolgten auf Trockeneis. Die Be-

stimmung der Mediator-Konzentrationen, beginnend mit den lagerungsinstabilen Substanzen, erfolgte dort innerhalb von 4 - 8 Wochen.

#### Atemkondensat:

*Verwendetes Gerät zur AKO-Gewinnung:* Die Atemkondensate wurden in allen Untersuchungsabschnitten mit Hilfe des für die Anwendung am Menschen kommerziell verfügbaren Gerätes „EcoScreen“ (Viasys Healthcare, Höchberg) durchgeführt (Abb. 7). Während der gesamten Gewinnungsdauer fand eine gleich bleibende elektrische Kühlung des Kondensers statt. Das Exhalat wurde in einer Sammelkappe (Viasys Healthcare, Höchberg), die am unteren Ende des teflonbeschichteten Kondenserröhrchens befestigt wurde, aufgefangen. Eine Filterung (Pall Pro-Tec Filter, Pall Medical GmbH Dreieich) der Inspirationsluft wurde zu jedem Untersuchungszeitpunkt, die der expirierten Luft nur *post infectionem* vorgenommen.

*Adaptation an die Tierart Kalb und Durchführung der AKO-Gewinnung am Einzeltier:* Da die ventilatorischen Kenngrößen der Kälber etwa denen des Menschen entsprechen, konnte die Gewinnung des AKO ohne zusätzliche technische Veränderungen durchgeführt werden. Eine Sedation oder mechanische Fixation der Tiere war nicht nötig, da sich die Kälber in der ruhigen Umgebung und in der Nähe der bekannten Pfleger sehr schnell an den schmerzlosen Untersuchungsvorgang gewöhnten. Eine leichte manuelle Ausrichtung des Kopfes schienen die Tiere dabei sogar als angenehm zu empfinden, was sich in einem physiologischen Atmungsmuster widerspiegelte. Durch die schwenkbare Verbindung des Kondensers mit der feststehenden Kühleinheit des Gerätes konnte den Kopfbewegungen dabei geringgradig gefolgt werden. Für jedes Kalb stand eine individuelle Maske (Narkosemaske groß, Plexiglas, Heiland) zur Verfügung, die Nase und Flotzmaul dicht abschloss und auf diese Weise weder die Atmung noch den Wiederkauvorgang beeinflusste. Die AKO-Gewinnung fand immer in derselben Reihenfolge der Tiere und damit im festen Abstand nach der morgendlichen Tränke statt. Dies erschien wichtig, um die unbekannteren Auswirkungen zirkadianer Rhythmen der Inhaltsstoff-Abscheidung zu minimieren. Auf die Vermeidung unnötigen Stresses innerhalb der Kälbergruppe wurde dabei während der Vorbereitung und der Durchführung der Probennahme stets geachtet.

*Ermittlung ventilatorischer Kenngrößen während der AKO-Gewinnung:* Ein verwendetes Zusatzgerät des EcoScreen ist das EcoVent (Viasys Healthcare, Höchberg). An diesem können die Atmungsparameter: maximale expiratorische Atmungsstromstärke [l/s], expiratorisches Atemzugvolumen [l], expiratorisches Minutenvolumen [l] und auch die Atmungsfrequenz [je min] abgelesen werden (Abb. 7). Parallel dazu konnte stets die genaue Sammlungszeit [min] und das Exhalatvolumen [l] dokumentiert werden. Diese Werte wurden nach 5, 10 und 20 Minuten, nach 300 l exhalierendem Volumen sowie zum Abschluss der AKO-Gewinnung notiert, als Mittelwert zusammengefasst und konnten somit jeder individuellen AKO-Probe zugeordnet werden.

*Aufarbeitung und Lagerung der AKO-Proben:* Im Anschluss an die AKO-Gewinnung und die sofortige pH-Wert Messung (Kap. 3.9.1) wurde die Kondensatmenge auf 0,1 ml genau bestimmt und zu jeweils 1,4-ml-Eppendorfgefäßen abgefüllt. Die Probennahme wurde nur bei einer Sammlungsmenge von weniger als 4,5 ml Atemkondensat/400 l Exhalat für weitere 10 Minuten direkt fortgesetzt. Die Lagerung dieser Proben erfolgte bis zum Zeitpunkt ihrer

Versendung [direkt nach Abschluss jeden Untersuchungsabschnittes] bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nach Versuchsende wurden die in Trockeneis verpackten Proben an das Untersuchungslabor (FILT) gesandt und dort bei einer Temperatur von  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bis zur Konzentrationsbestimmung der Mediatoren, aufbewahrt. Die Reihenfolge orientierte sich dabei an der Halbwertszeit der zu untersuchenden Marker.

### **3.7 Ex vivo gewonnenes Probenmaterial (Untersuchungsabschnitte 1 - 3)**

Die broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit wurde ausschließlich *ex vivo*, d.h. an der frisch exenterierten Lunge eines jeden Tieres gewonnen.

Die Lungen der Kälber der Versuchsabschnitte 1 und 2 wurden an einer Lokalisation je Tier (Basislappen) 5 mal mit jeweils 10 ml Aqua bidest. gespült. Anschließend wurde die Probe für 20 min. bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 4500 Umdrehungen zentrifugiert und der Überstand in 1,4-ml-Eppendorfgefäßen portioniert zu je 5 Proben bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bzw. bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Im Untersuchungsabschnitt 3 wurden jeweils 20 ml eines Zellpuffers (pH: 7,4; PBS) in den rechten und linken Basislappen, sowie den rechten Mittellappen der Tiere appliziert und die zurückgewonnene Flüssigkeit auf Eis gelagert (NUNC-Röhrchen, Heiland, Hamburg). Nach der Bestimmung des Gesamtvolumens der BALF wurden die Proben halbiert, mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes (ABL+Elektrolytanalysator (ABL 500) Radiometer Kopenhagen) auf deren Protonenkonzentration sowie Kohlendioxid-Partialdruck untersucht und den verschiedenen Untersuchungslabors zugeteilt. Dazu gehörte die Isolierung der *Mycoplasma-bovis*-mRNA, sowie die getrennte Aufarbeitung des im Anschluß an die Zentrifugation (20 min bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 4500 U/min) erhaltenen Sediments (Mycoplasmen-Anzucht) und des Überstandes (Mycoplasmen-Serologie). Bis zur biochemischen Untersuchung (FILT) wurde der abzentrifugierte BALF-Überstand in Eppendorfgefäßen portioniert (je 1,4 ml) und etwa 4 - 8 Wochen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **3.8 Biochemische Untersuchungsmethoden**

#### **3.8.1 pH-Wert**

Der pH-Wert und der Kohlendioxidpartialdruck des nativen Atemkondensates wurde mit Hilfe der in dem Blutgasanalysator (ABL 500, Radiometer Kopenhagen) installierten Glaselektrode (G707 pH-Elektrode) bestimmt. Zusätzlich wurden im Untersuchungsabschnitt 3 auch die Protonenkonzentration der BALF unmittelbar nach deren Gewinnung untersucht. Die zwischen der enthaltenen Pufferlösung und der Probe entstandene Spannungsdifferenz (Potential) ist der pH-Differenz beider Medien proportional und somit messbar. Anschließend erfolgte eine rechnerische Korrektur auf die unmittelbar vor der AKO-Gewinnung ermittelte Rektaltemperatur der Tiere. Die statistische Auswertung bezog sich ausschließlich auf diese Temperatur-korrigierten pH und  $\text{PCO}_2$ -Werte.

#### **3.8.2 Konzentrationsbestimmungen der AKO-Inhaltsstoffe**

Die Konzentrationsbestimmung der Entzündungsmediatoren in Atemkondensat-, Serum- und BALF-Proben wurde in der FILT Lungen- und Thoraxdiagnostik GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, Haus 79, 13125 Berlin durchgeführt. Für alle Medien (AKO, Serum, BALF) wurden die nachfolgend beschriebenen Methoden angewendet.

Bestimmung von 8-Isoprostan mittels ACE (Acetylcholinesterase)- Competitive Enzyme Immunoassay: Das Prinzip der 8-Isoprostan-Bestimmung beruht auf dem Nachweis einer enzymatischen Reaktion, deren Stärke eine Aussage über die in der Probe enthaltene 8-Isoprostankonzentration zulässt. Es wird hierzu das Verfahren der Spektrophotometrie verwendet. Nachweisplatten wurden am Boden mit 8-Isoprostan-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern ausgestattet. Nun fand nach Zugabe eines Tracers (an 8-Isoprostan gebundene Acetylcholinesterase) und der zu untersuchenden Probe ein Wettstreit um die Bindungsstellen am Boden der Platte statt. Nach Entfernung der ungebundenen Anteile wurde Ellman's Reagenz dazugegeben, in dem das Substrat für die Acetylcholinesterase enthalten ist und mit dem der Tracer reagiert. Die Adsorption dieses nun gebildeten gelben Farbstoffes, der bei 412 nm am UV/VIS Spektrometer UNICAM UV2 gemessen wurde, ist umgekehrt proportional zu der in der Probe enthaltenen 8-Isoprostankonzentration. Über eine mit Standardlösung erstellte Kalibrierkurve wurden dann die 8-Isoprostan-Konzentrationen berechnet.

Photometrische Nitritbestimmung nach Griess: Hier wurde über die Bestimmung der optischen Dichte eines Farbstoffes bei 540 nm die Nitrit-Konzentration berechnet. Nach Zugabe der Griess Reagenz (Sulfanilamid und N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin) wurde das in der zu untersuchenden Probe enthaltene Nitrit in einen violetten Azofarbstoff umgewandelt. Die optische Dichte wurde am UV/VIS Spektrometer UNICAM UV2 bei 540 nm bestimmt und über eine mit Standardlösung erstellte Kalibrierkurve die Nitrit-Konzentration berechnet.

Photometrische Bestimmung des Ammonium in Anlehnung an die Methode zur Harnstoffbestimmung nach Berthelot: Die Bestimmung des Ammonium erfolgte nach der Anweisung der Harnstoff-Bestimmung, ohne die Zugabe der Urease, da nur das in der Probe enthaltene freie Ammonium bestimmt werden sollte. Die Konzentration des Ammonium wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 578 nm, mittels einer durch Ammoniumchloridlösung erstellten Eichkurve berechnet. Hier wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Kolorimetrische Bestimmung von Harnstoff nach Berthelot: Die Methode beruht auf der enzymatischen Spaltung des Harnstoff, sowie Reaktion zu einem blauen Farbstoff, dessen optische Dichte der Harnstoff-Konzentration proportional ist. Durch Urease wurde Harnstoff in Ammoniumcarbonat umgewandelt, der mit Phenol zu einem blauen Indophenolfarbstoff reagiert. Bei dieser Reaktion wurde Nitroprussid-Natrium als Katalysator verwendet. Die optische Dichte des gebildeten Farbstoffes wurde bei 578 nm über das UV/VIS Spektrometer bestimmt. Nach Erstellung einer Kalibrierkurve mit einer Standardlösung wurde die Harnstoff-Konzentration berechnet. Das Ergebnis musste mit dem Wert der Ammonium-Bestimmung subtrahiert werden.

Kolorimetrische Bestimmung des Gesamtprotein: Auch hier fand eine Farbstoffbildung statt, durch deren optische Dichte die Protein-Konzentration in der Probe bestimmt werden konnte. Hier wurden in einer Arbeitsreagenz enthaltene Kupferionen durch das in der zu untersuchenden Probe enthaltene Protein reduziert. Zu dieser Reaktion ist ein alkalisches Medium nötig. Anschliessend wurde Bicichoninsäure hinzugegeben, das mit den Kupferionen einen violett gefärbten Komplex bildet, dessen optische Dichte bei 562 nm

photometrisch bestimmt wurde. Mit Hilfe einer Albumin-Standardlösung wurde eine Kalibrierkurve erstellt, mit der die Protein-Konzentration der Probe berechnet wurde.

Bestimmung des Leukotrien B<sub>4</sub>: Die Bestimmung der Leukotrien B<sub>4</sub>-Konzentration erfolgte mittels Enzym-Immunoassay (Cayman Chemical) unter Verwendung einer Standard-Kalibratorlösung. Zusätzlich wurde zur Verifizierung der Ergebnisse eine massenspektroskopische Untersuchung (LC/MS) angeschlossen.

### 3.8.3 Berechnung der Entzündungsmediator-Konzentration je 100 Liter Exhalat

Um eine Vergleichbarkeit der untersuchten Entzündungsmediatoren Gesamtprotein, 8-Isoprostan, Leukotrien B<sub>4</sub>, Nitrit, Harnstoff und Ammonium unabhängig vom AKO-Volumen zu erreichen, wurde eine Berechnung der auf 100 Liter Exhalat bezogenen Abgabe des Inhaltsstoffes vorgenommen. Dies schien notwendig, um die mögliche Einflussnahme des Atmungsmusters zu reduzieren. Dazu wurde mit Hilfe der Konzentration [je Milliliter Kondensat] die entsprechende Menge innerhalb des Lösungsvolumens [ml oder l AKO] bestimmt, die im gesamten Exhalatvolumen (meist 400 Liter) abgeschieden wurde. Die Mediator-Menge [Menge/100 l Exhalat] konnte dabei nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Mediator-Menge [Menge/100 l Exhalat]} = \frac{\text{Mediator-Konzentration [Menge/ml AKO]} \times \text{AKO [ml]} \times 100 [\text{l}]}{\text{gesamtes Exhalatvolumen [l]}}$$

Da es sich bei der Angabe der je 100 l Exhalatvolumen abgeschiedenen Mediator-Menge chemisch auch um eine Konzentrationsangabe handelt, soll diese in nachfolgenden Abschnitten als Konzentration, bezogen auf 100 l Exhalat, bezeichnet werden.

## 3.9 Erregernachweis und Differentialdiagnostik

Während des Einstellungsmonitorings, der Verlaufsuntersuchung und der Sektion wurden folgende differentialdiagnostische Untersuchungen ausschließlich am Friedrich-Loeffler-Institut, Jena vorgenommen:

Indirekte Erregernachweise: Eine serologische Untersuchung des Serums auf Antikörper gegen Chlamydien erfolgte mittels Komplementbindungsreaktion. Zusätzlich wurden mit ELISA-Verfahren differentialdiagnostisch bedeutsame virale Atemwegserreger (Serum) sowie *Mycoplasma-bovis* (Serum, BALF) diagnostiziert (Tab. 9).

Direkte Erregernachweise: Entsprechend den in der Tab. 9 aufgeführten Laboranweisungen wurden Kot-, Augen- und Nasentupfer, *post mortem* entnommene Gewebeproben sowie das broncho-alveoläre Sediment der bakteriellen Untersuchung zugeführt. Grundsätzlich erfolgte eine genusspezifische Chlamydien-Diagnostik mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die nur bei positivem Befund durch speziesspezifischen DNA-Nachweis ergänzt wurde. Parallel dazu wurde im Rahmen der Einstellungsuntersuchung (UA 2, 3) eine Untersuchung auf BVD/MD-Antigen aus Biopтатаen der Ohrmuschel durchgeführt.

Tab. 9: Indirekte und direkte Erregernachweise für die Tiere der Untersuchungsabschnitte 1 - 3

Parameter	Medium	Methodik	
<b>Indirekte Erregernachweise</b>			
BHV-1, BVD/MD, BRSV, PI 3, Adeno 3	Serum	FLI, Jena (Agr. Atemwegserkrankungen)	Bio-X-ELISA, Belgien
<i>M. bovis</i>	Serum	FLI, Jena (Agr. Mycoplasmen)	LA: 416-25 (ELISA)
	BALF		
Chlamydien	Serum	FLI, Jena (Agr. Chlamydien)	LA: 416-14 (KBR)
<b>Direkte Erregernachweise</b>			
Parsiten (Giardien), Cryptosporidien	KoA	FLI, Jena (Agr. Pathologie)	LA: 22.61_3
Salmonellen	KoT	FLI, Jena (Agr. Salmonellen)	LA: 422-22 422-26
Chlamydien*	KoT	FLI, Jena (NRL für Psittacose)	LA:42501
	NaT		
	AT		
	Gewebeprobe		
Pasteurellen/ <i>M. haemolytica</i>	NaT	FLI, Jena (Agr. Atemwegserkrankungen)	LA: 16 P01- 16 P04
	Gewebeprobe		
BVD/MD	Biopstat	FLI, Jena (Agr. Pathologie)	LA: 22.62_1
Mycoplasmen	NaT	FLI, Jena (Agr. Mycoplasmen)	LA: 416-01
	Gewebeprobe		
	BALF		
	BALF-Sediment		

Erläuterungen zu Tab. 9:

\* = ausschließlich PCR

Adeno 3 = Adenovirus 3

Agr. = Arbeitsgruppe

AT = Augentupfer

BALF = broncho-alveoläre Lavage

BHV-1 = Bovines Herpes Virus 1

BRSV = Bovines Respiratorisches

Syncytialvirus

BVD/MD = Bovine Virus Diarrhoe/

Mucosal Disease

FLI = Friedrich-Loeffler-Institut

KBR = Komplement-Bindungsreaktion

KoA = Kotausstrich

KoT = Kottupfer

LA = Laboranweisung

*M. bovis* = *Mycoplasma bovis*

*M. haemolytica* = *Mannheimia haemolytica*

NaT = Nasentupfer

NRL = Nationales Referenzlabor

PI-3 = Para-Influenza 3

UA = Untersuchungsabschnitt

### 3.10 Datenverarbeitung und mathematisch-statistische Auswertung

Die über den Versuchszeitraum der UA 1 - 3 erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationssystems Excel - 97 (Microsoft) erfasst und unter Verwendung des Statgraphics Plus (Version 4.0, Statistical Graphics Corp.) statistisch ausgewertet. Dazu gehörten alle je Milliliter AKO, Serum und BALF bestimmten Konzentrationen der untersuchten Entzündungsparameter. Auch die Atmungskenngrößen wurden zu 5 Zeitpunkten je AKO-Gewinnung dokumentiert und als Mittelwert der Probe des jeweiligen Tieres zugeordnet. Die Rektaltemperaturen und die Körpermassen der Kälber wurden parallel dazu bestimmt. Mit Hilfe dieser Daten konnte zusätzlich die auf 100 Liter Exhalat bezogene

Konzentration der Entzündungsmarker im AKO, die Gesamtmenge des AKO [ml/min, ml/100 l] sowie das Atemzugvolumen in Bezug auf die Körpermasse berechnet werden. Mediator-Konzentrationen, die bedingt durch die methodische Nachweisgrenze nicht bestimmt werden konnten und auch ventilatorische Kenngrößen, die keinem physiologischen Atmungsmuster unterlagen wurden erfasst und von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Da die Normalverteilung nicht für alle geprüften Parameter vorausgesetzt werden konnte, erfolgt die Darstellung numerischer Ergebnisse prinzipiell als Median, Minimum und Maximum. Die graphische Wiedergabe der inter- und intra-individuellen Verteilung der Mediator-Konzentrationen je ml AKO und je 100 l Exhalat je Tier erfolgte, wie auch die Darstellungen der Ergebnisse der BALF im UA 2, als Box - and - Whisker Plot.

Zur Überprüfung des Einflusses physiologischer Faktoren, wie der Fütterung oder des Alters, wurde innerhalb der Versuchsgruppe des UA 1 auf die Rektaltemperatur, die ventilatorischen Kenngrößen, die Sammelzeit, die AKO-Menge (je Minute, je 100 l Exhalat) sowie die Mediator-Konzentrationen (incl. pH) im AKO, je 100 l Exhalat und im Serum wurde in Abhängigkeit von der Verteilung der Vorzeichen-Rang-Test (nicht normalverteilt) oder die multifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) (normalverteilt) angewendet.

Als Weiteres sollte für die Mediator-Konzentrationen (je ml AKO, je 100 l Exhalat) auch die Bedeutung der Atmung, der Rektaltemperatur und der Bezug zur AKO-Menge (ml/min, ml/100 l) überprüft werden. Dazu wurden Zusammenhänge mit Hilfe der auf Normalverteilung beruhenden linearen Regressionsanalyse ermittelt und in Form des linearen Korrelationskoeffizienten ( $r$ ), des Bestimmtheitsmaßes ( $R^2$ ) und der Regressionsgeraden ( $y = a + b \cdot x$ ) dargestellt. Zusätzlich erfolgte die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman, die nicht lineare Zusammenhänge zwischen den nach Rangzahlen geordneten Wertepaaren überprüft. Dieser Test bedingt keine Normalverteilung der Daten. Der Rangkorrelationskoeffizient wird hier als ( $r_{sp}$ ) dargestellt. In den Untersuchungsabschnitten 2 und 3 wurde der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (W - Test) für unabhängige Stichproben und parameterfreie Verteilungen angewendet, um die Kenngrößen der AKO-Gewinnung und die Mediator-Konzentrationen miteinander zu vergleichen. Für alle genutzten statistischen Verfahren wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt, d.h. die Signifikanzgrenze ( $p$ ) entsprach  $p \leq 0,05$ .