

Aus dem
Institut für molekulare Pathogenese des Friedrich-Loeffler-Instituts,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Jena

eingereicht über

das Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Evaluierung der Pathogenität von *Parachlamydia acanthamoebae* durch eine
experimentell induzierte, respiratorische Infektion im bovinen Wirt**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Markus Lohr
Tierarzt
aus Leipzig

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3957

Gedruckt mit der Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Petra Reinhold, PhD
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christa Thöne-Reinecke
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Stefan Schwarz

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): Holstein-Friesian, calves, animal models, experimental
infection, Parachlamydia acanthamoebae, respiratory diseases

Tag der Promotion: 10.07.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	III
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung	2
1.3 <i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	2
1.3.1 Erstbeschreibung und taxonomische Einordnung	2
1.3.2 Morphologie und Lebenszyklus	5
1.3.3 Virulenzfaktoren	5
1.3.4 Wirtsspezifität	6
1.3.5 Infektionsquellen und Übertragungswege	6
1.3.6 Klinische Manifestation einer Atemwegsinfektion mit <i>P. acanthamoebae</i>	8
1.3.7 Diagnostik	8
1.3.7.1 Direkter Erregernachweis	8
1.3.7.2 Indirekter Erregernachweis	9
1.3.8 Therapiemöglichkeiten	9
1.4 Großtiermodell Kalb	9
1.4.1 Anatomische und funktionelle Besonderheiten der Rinderlunge	9
1.4.2 Atemwegserkrankungen beim Kalb	11
1.4.2.1 Vorkommen und Bedeutung	11
1.4.2.2 Erreger	11
1.4.2.3 Klinische Symptome und Diagnostik	12
1.4.3 Charakterisierung der Lungenfunktion beim Kalb	13
1.4.3.1 Blutgasanalyse	13
1.4.3.2 Differenzierende Lungenfunktionsdiagnostik	14
1.4.4 Einfluss von Atemwegserkrankungen auf die Lungenfunktion beim Kalb	15
1.5 Eigene Untersuchungen	18
1.5.1 Arbeitshypothesen	18
1.5.2 Allgemeiner Versuchsaufbau	18
1.5.3 Studiendesign	19
1.5.3.1 Teilversuch 1: Modelletablierung und Dosistitration	19
1.5.3.2 Teilversuch 2: Pathophysiologische Charakterisierung des Modells durch differenzierende Lungenfunktionsdiagnostik	19

2	Veröffentlichungen	22
2.1	Teilversuch 1: A bovine model of a respiratory <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> infection	23
2.2	Teilversuch 2: Effect of <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> on pulmonary function parameters in a bovine respiratory model	39
3	Diskussion.....	51
3.1	Validität des Großtiermodells	51
3.1.1	Modelltierart und Erreger.....	51
3.1.2	Experimentelle Infektion	52
3.1.3	Erregerdosis.....	53
3.1.4	Studiendesign und Umsetzung.....	54
3.1.5	Nachweis des Kausalzusammenhangs zwischen Erreger und Krankheit	55
3.2	Erreger-Wirt-Interaktionen und ihre funktionellen Auswirkungen	57
3.2.1	Klinische Manifestation.....	57
3.2.2	Pathologische Befunde und Erregernachweis	59
3.2.3	Labordiagnostische Parameter zur Charakterisierung der unspezifischen Immunantwort	60
3.2.4	Parameter der arteriellen Blutgase und Hämoxymetrie	62
3.2.5	Differenzierende Lungenfunktionsdiagnostik	64
3.3	Biologische Relevanz.....	65
3.4	Prädisponierende Faktoren	67
4	Schlussfolgerung und Perspektiven	67
5	Zusammenfassung.....	69
6	Summary.....	72
7	Literaturverzeichnis	75
8	Abbildungsverzeichnis.....	85
9	Tabellenverzeichnis.....	86
10	Publikationsliste	87
11	Danksagung	91
12	Selbstständigkeitserklärung.....	92

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

15-HETE	15-Hydroxyeicosatetraenonsäure
A.	<i>Acanthamoeba</i>
AaDO ₂	alveoloarterielle Sauerstoffdruckdifferenz
AF	Atmungsfrequenz
a. i.	<i>ante inoculationem</i>
APP	Akute-Phase-Protein
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BALT	bronchusassoziiertes lymphatisches Gewebe
BW	Körpermasse (engl. body weight)
C.	<i>Chlamydia</i>
CLO	chlamydienähnlicher Organismus (engl. <i>Chlamydia</i> -like organism)
CO	Kohlenstoffmonoxid
CPAF	engl. <i>Chlamydia</i> protease-like activity factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dpi	Tag <i>post inoculationem</i>
EB	Elementarkörperchen (engl. elementary body)
EBP	enzootische Bronchopneumonie
EBE	einschlusskörperchenbildende Einheiten
ETCO ₂	endtidale Kohlenstoffdioxidkonzentration
IHC	Immunohistochemie
Inc	Einschlussmembran (engl. inclusion membrane)
IOS	Impuls-Oszilloresistometrie-System
He	Helium
KBE	koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
kPa	Kilopascal
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
Lf	Lactoferrin
LPS	Lipopolysaccharid
MBW	metabolische Körpermasse (engl. metabolic body weight)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
MOMP	(engl. major outer membrane porin)
NaCl	Natriumchlorid

OmpA	engl. Outer membrane protein A
<i>P.</i>	<i>Parachlamydia</i>
$p_a\text{CO}_2$	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
$p_a\text{O}_2$	arterieller Sauerstoffpartialdruck
$p_A\text{O}_2$	alveolärer Sauerstoffpartialdruck
p. i.	<i>post inoculationem</i>
<i>Pr.</i>	<i>Protochlamydia</i>
qPCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (engl. quantitative real-time polymerase chain reaction)
<i>R.</i>	<i>Rhabdochlamydia</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
R_{rs}	respiratorische Resistance
<i>S.</i>	<i>Simkania</i>
<i>Si.</i>	<i>Similichlamydia</i>
spp.	Spezies
T3SS	Typ 3 Sekretionssystem
TV	Teilversuch
V'	Volumenstrom (engl. flow)
V_A	Alveolarvolumen
V'_A	alveoläre Ventilation
$V'\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid-Volumenstrom (CO_2 -Abgabe)
V_d	Totraumvolumen
V'_{exp}	expiratorischer Flow
$V'\text{O}_2$	Sauerstoff-Volumenstrom (O_2 -Aufnahme)
V'_{spec}	spezifische Ventilation
V_{min}	Atemminutenvolumen
V_t	Atemzugvolumen (Tidalvolumen)
X_{rs}	respiratorische Reactance

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Spezies der Ordnung *Chlamydiales* sind unter Vertebraten weit verbreitete, obligat intrazelluläre Erreger, die eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen in ihren Wirten hervorrufen können. Abgesehen von den relativ gut bekannten Spezies der *Chlamydiaceae* wurden erst in den zurückliegenden 20 Jahren neue Chlamydien-verwandte Organismen erforscht, die unter dem Begriff *Chlamydia*-like organisms (CLO) zusammengefasst werden (Taylor-Brown *et al.*, 2015). Im Rahmen ihrer Charakterisierung wurde festgestellt, dass Diversität, Wirtsspektrum und ubiquitäres Vorkommen bisher weitgehend unterschätzt wurden (Horn, 2008). In der vergangenen Dekade erhielten dabei vor allem die *Parachlamydiaceae*, und im Speziellen ihr Familienvertreter *Parachlamydia (P.) acanthamoebae*, verstärkte Aufmerksamkeit. Dessen pathogenes Potential wird aktuell, neben abortiven Urogenitalinfektionen (Baud & Greub, 2011), vor allem im Zusammenhang mit Pneumonien diskutiert (Greub, 2009; Lamoth & Greub, 2010). Als besonders problematisch unter den respiratorischen Erkrankungen des Menschen stellen sich die ambulant erworbenen, atypischen Pneumonien dar, da nach wie vor weniger als die Hälfte dieser eine Ätiologie zu Grunde gelegt werden kann (Cilloniz *et al.*, 2011; Cilloniz *et al.*, 2012; Marrie *et al.*, 1996). Die Annahme der Pneumopathogenität von Parachlamydien stützt sich vor allem auf Studien zur Seroprävalenz in asymptomatischen (Baud *et al.*, 2009) und erkrankten humanen Populationen (Bousbia *et al.*, 2013). Zudem konnten Nachweise über *Parachlamydia*-spezifische DNA in respiratorischem Probenmaterial erkrankter Patienten erbracht werden (Haider *et al.*, 2008; Marrie *et al.*, 2001). Es bleibt jedoch zu klären, ob *Parachlamydia* als singulärer bzw. opportunistischer Pneumonieerreger in Erscheinung tritt. *In-vitro*-Studien gaben Anlass zur Spekulation und Infektionsversuche im Mausmodell verifizierten auf ihre Art das dritte und vierte Henle-Koch Postulat. Um in Ergänzung dazu die der Erreger-Wirt Interaktion zugrundeliegende Pathophysiologie nachzuvollziehen, bedarf es der Nutzung eines differenzierten Großtiermodells, das idealer Weise das relevante Ausmaß einer humanen Erkrankung simuliert.

Verschiedenen *Chlamydia* spp. wird eine Beteiligung am Komplex der enzootischen Bronchopneumonie im Sinne einer akuten Atemwegsinfektion beim Kalb zugeschrieben (Reinhold *et al.*, 2011). Ob die CLO neben den bekannten Mikroorganismen dabei eine Rolle spielen, ist bisher jedoch gänzlich ungeklärt. Lediglich Hinweise auf einen Zusammenhang konnten mit dem Nachweis von *P. acanthamoebae* in respiratorischem Probenmaterial von an Pneumonie erkrankten Rindern gewonnen werden (Wheelhouse *et al.*, 2013). Aufgrund dessen wird im Hinblick auf respiratorische Erkrankungen immunsupprimierter, humaner Patienten ein gesteigertes zoonotisches Potential von *Parachlamydia* postuliert (Borel *et al.*, 2010; Michel, 2011; Wheelhouse & Longbottom, 2012).

1.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, ein bovines Modell einer respiratorischen *P. acanthamoebae*-Infektion zu etablieren. Weitere Ziele bestanden darin, nach erfolgter Inokulation des Respirationstraktes von Kälbern mit *P. acanthamoebae* die folgenden Fragestellungen zu klären.

- (i) Zum einen sollte das pneumopathogene Potential des Erregers unter Berücksichtigung klinischer und labordiagnostischer Parameter sowie hinsichtlich pathologischer und histopathologischer Veränderungen evaluiert werden. In diesem Zusammenhang sollten außerdem ein direkter Erregernachweis und eine Rekultivierung der Parachlamydien erfolgen.
- (ii) Zum anderen sollten Pathogenesemechanismen der Erreger-Wirt-Interaktion mittels Kenngrößen der differenzierenden Lungenfunktionsdiagnostik und Atmungsmechanik sowie des pulmonalen Gasaustauschs untersucht werden.

Hierzu wurden die Folgen einer respiratorischen *P. acanthamoebae*-Monoinfektion beim Kalb unter den Bedingungen einer kontrollierten Studie mit Hilfe eines Inokulationsmodells, welches zuvor für die bovine Lunge entwickelt worden war, dargestellt (Ostermann, 2013; Reinhold *et al.*, 2012). Aus dem Modell wurden Ergebnisse erwartet, welche die lokale, pulmonale sowie gegebenenfalls systemische Schädigung des Wirts nach experimenteller Infektion widerspiegeln und somit eine Einschätzung des pathogenen Potentials von *P. acanthamoebae* für die Säugerylunge ermöglichen. Weiterhin sollten die pathophysiologischen Grundlagen der induzierten Atemwegserkrankung dahingehend charakterisiert werden, in welchem Schweregrad und zeitlichem Verlauf Lungenfunktionsstörungen auftreten. In diesem Zusammenhang blieb außerdem zu klären, ob nur eine manifeste oder schon eine subklinische Erkrankung mit pulmonalen Dysfunktionen einhergeht. In Anlehnung an vorausgegangene *In-vitro*-Versuche sollten die gewonnenen Erkenntnisse speziesübergreifend, reproduzierbar dargestellt und die Beteiligung bzw. der Einfluss des Erregers auf bekannte Krankheitsgeschehen – speziell im bovinen Wirt – untersucht werden. Darüber hinaus war zu eruieren, ob die funktionellen Störungen nach Abklingen der klinischen Symptome reversibel sind oder ob eine *Parachlamydia*-Infektion irreversible Organschäden nach sich zieht.

1.3 *Parachlamydia acanthamoebae*

1.3.1 Erstbeschreibung und taxonomische Einordnung

Die phylogenetisch gut isolierte Ordnung *Chlamydiales* bildet eine kohärente Gruppe von Familien hochspezialisierter, intrazellulärer Bakterien, deren Pangenom mehr als 500 konservierte Gene umfasst. Die enge Verwandtschaft von *Parachlamydiaceae* und *Chlamydiaceae* wird durch eine 80 – 90 prozentige Homologie ihrer 16S rRNA Gensequenzen

verdeutlicht, wohingegen das Gesamtgenom der *Parachlamydiaceae* ungefähr die dreifache Länge im Vergleich zu dem der *Chlamydiaceae* aufweist (Collingro *et al.*, 2011).

Bereits 1989 wurde erstmals die uns heute unter dem Namen *P. acanthamoebae* bekannte Spezies als intrazelluläres, gramnegatives, kokkoides Bakterium im Zusammenhang mit einem fiebrigen Krankheitsgeschehen unbekannter Genese beschrieben (Lewis *et al.*, 1990). Dieses konnten in Form von Einschlüssen in freilebenden Amöben der Art *Acanthamoeba* spp. aus dem Wassertank eines Luftbefeuchters identifiziert werden. Im Zuge einer vergleichenden Genomsequenzanalyse konnte eine Ähnlichkeit mit einem anderen, ebenfalls aus Akanthamöben isolierten Endoparasiten nachgewiesen werden (Birtles *et al.*, 1997). Dabei handelte es sich um den heutigen *P. acanthamoebae*-Stamm Bn9, der erstmals als Endozytobiont in *Acanthamoeba* spp. von der nasalen Mukosa gesunder Erwachsener isoliert werden konnte (Amann *et al.*, 1997). Auf Anregung von Everett *et al.* (1999) wurden innerhalb der Ordnung *Chlamydiales* über die Familie *Chlamydiaceae* hinaus drei neue Familien der bis dahin als CLO bezeichneten Organismen klassifiziert: *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* und *Waddliaceae*. Zur Familie *Parachlamydiaceae* zählen ferner die Gattungen *Protochlamydia* und *Neochlamydia*. Aktuell sind 8 Familien der CLO beschrieben (Tabelle 1–A).

Tabelle 1–A: Übersicht über die Familien und Spezies der potentiell pathogenen ‚Chlamydia-like organisms‘ in Bezug auf terrestrische und aquatische Wirte (modifiziert nach Taylor-Brown *et al.*, 2015)

Familie	Wirt	Assoziierte Erkrankung
Spezies		
Simkaniaceae		
<i>Simkania</i> (S.) <i>negevensis</i>	Mensch	Atemwegserkrankung
<i>S. venezia</i>	div. Fischarten	Epitheliocystis
<i>S. spp.</i>	div. Reptilien	granulomatöse Entzündung
Parachlamydiaceae		
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	Mensch, Rind, Ziege, Rotwild	Atemwegserkrankung, Plazentitis/Abort
<i>Protochlamydia</i> (Pr.) <i>naegleriophila</i> , Pr. spp.	Mensch	Atemwegserkrankung
<i>Neochlamydia</i> sp.	Katze Seesaibling	Konjunktivitis/Keratitis Epitheliocystis
Waddliaceae		
<i>Waddlia chondrophila</i>	Mensch, Rind	Plazentitis/Abort
Rhabdochlamydiaceae		
<i>Rhabdochlamydia</i> (R.) <i>crassiflans</i>	Kakerlake	Körperschwellung
<i>R. sp.</i>	Mensch	Atemwegserkrankung
<i>Renichlamydia lutjani</i>	Blaugestreifter Schnapper	Epitheliocystis
Cribchlamydiaceae		
<i>Cribchlamydia sequanensis</i>	Mensch	Atemwegserkrankung
<i>Estrella lausannensis</i>		
Clavichlamydiaceae		
<i>Clavichlamydia salmonicola</i>	Lachs, Forelle	Epitheliocystis
Piscichlamydiaceae		
<i>Piscichlamydia salmonis</i>	Lachs, Seesaibling	Epitheliocystis
Parilichlamydiaceae		
<i>Parilichlamydia carangidicola</i>	div. Fischarten	Epitheliocystis
<i>Similichlamydia</i> (Si.) <i>laticola</i>		
<i>Si. latridicola</i>		
<i>Actinochlamydia clariae</i>		

1.3.2 Morphologie und Lebenszyklus

Bei den Spezies der *Parachlamydiaceae* handelt es sich um gramlabile, obligat intrazelluläre Bakterien, die ihrem Entwicklungsstatus entsprechend in verschiedenen Formen vorliegen können. Die Zellwand entspricht weitestgehend der gramnegativer Bakterien, wobei das parachlamydiale Genom die meisten Proteine zur Synthese von Lipopolysacchariden (LPS) codiert. Da jedoch das Homolog für O-spezifische Polysaccharide fehlt, wird es als ‚beschnittenes‘ LPS bezeichnet (Horn *et al.*, 2004). *P. acanthamoebae* durchläuft den typischen Lebenszyklus der *Chlamydiales*. Dabei können zwei morphologisch unterschiedliche Entwicklungsstufen beobachtet werden. Die infektiöse Form, das Elementarkörperchen (EB), wird von eukariontischen Zellen durch Endozytose aufgenommen und verbleibt in zytoplasmatischen Einschlüssen, den sog. Einschlusskörperchen. Als vakuolisierter Endosymbiont in den Wirtszellen stellen die ca. 0,5 µm großen, grampositiven EB den überwiegend vorkommenden Entwicklungszustand dar und bilden sich in den Einschlusskörperchen zu metabolisch aktiven, dünnwandigen, gramnegativen Retikularkörperchen (RB) von ca. 0,6 µm Durchmesser heran. Zur Vermehrung durchlaufen letztere mehrere Zyklen binärer Teilung, was in einem exponentiellen Wachstum der intravakuolären Parachlamydien zu einer Mikrokolonie resultiert. Anschließend verwandeln sich die Parachlamydien wieder in die metabolisch inaktiven, infektiösen EB und werden durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt. Der Durchlauf eines vollständigen Zyklus nimmt in Abhängigkeit von der Wirtsspezies etwa 36 bis 96 Stunden in Anspruch. Die von Greub und Raoult (2002) beschriebenen kommaförmigen Entwicklungsstadien (Crescent bodies) konnten schlussendlich auf den Einfluss unterschiedlicher Fixierungstechniken zurückgeführt werden (Collingro *et al.*, 2005; Rusconi *et al.*, 2013).

1.3.3 Virulenzfaktoren

Das für *Chlamydiaceae* typische ‚Major outer membrane protein‘ (MOMP) wird von *P. acanthamoebae* nur spärlich oder gar nicht ausgebildet. Als vermeintliches Virulenzprodukt wurde ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) für *P. acanthamoebae* beschrieben, welches denen der *Chlamydiaceae* sehr stark ähnelt (Collingro *et al.*, 2011). Die temporär exprimierten Komponenten des T3SS konnten während der Replikation in einem ihrer natürlichen Wirte, *A. castellanii*, vollständig charakterisiert werden (Croxatto *et al.*, 2013). Hinsichtlich der Expression von T3SS Effektorproteinen unterscheiden sich Parachlamydien deutlich sowohl von anderen Familien der *Chlamydiales* als auch intrafamiliär. Nur insgesamt drei Einschlussmembranproteine sind allen *Chlamydiales* gemeinsam. Dieser Unterschied beruht vermutlich auf den verschiedenen Wirtszelltypen und spiegelt sich in der differentiellen Pathogenität wider (Collingro *et al.*, 2011). Der ‚*Chlamydia* protease-like activity factor‘ (CPAF) ist zudem den meisten *Chlamydiales* gemeinsam und stellt einen Hauptvirulenzfaktor der *Chlamydiaceae* dar. Dementsprechend besitzt auch das *Parachlamydia*-Genom ein CPAF Homolog, welches zur Intervention mit der Wirts-MHC Expression, Apoptose- sowie proinflammatorische Signal-

kaskade exprimiert wird. Des Weiteren kommt dem CPAF eine Rolle bei der Formation der intrazellulären Vakuole zu (Taylor-Brown *et al.*, 2015). Darüber hinaus konnte für *P. acanthamoebae* Katalase, ein wichtiger Faktor zum Überleben in Makrophagen und anderen phagozytotisch aktiven Zellen, sowohl genomisch (*katA*) als auch enzymatisch als aktive KatA der Klade 3 nachgewiesen werden (Rusconi & Greub, 2013). Hierbei stellte sich jedoch die enzymatische Aktivität der parachlamydialen KatA, verglichen mit der anderer CLO-Katalasen, als weniger ausgeprägt dar.

1.3.4 Wirtsspezifität

Zur Selektivität bzw. Adaptivität von *P. acanthamoebae* gegenüber Wirtsorganismen ist bisher nicht viel bekannt. Vom eukariotischen Einzeller bis zum hochspezialisierten Wirbeltier scheint sich eine Vielzahl von Organismen mit diesem Bakterium auseinandersetzen (Tabelle 1–A). Der jeweilige Nachweis von *P. acanthamoebae* erfolgte dabei genomspezifisch durch quantitative real-time PCR (qPCR). Weiterhin gelang in Zusammenhang mit Abortgeschehen mehrfach ein immunhistologischer (IHC) Nachweis in boviner Plazenta (Blumer *et al.*, 2011; Borel *et al.*, 2007). Hinzu kommt, dass Untersuchungen angestellt wurden, die darauf schließen lassen, dass *P. acanthamoebae* wohlmöglich als Aborterreger bei Rind (Barkallah *et al.*, 2014; Ruhl *et al.*, 2009), Schaf und Ziege (Ruhl *et al.*, 2008) sowie Mensch (Baud & Greub, 2011) in Frage kommt. Einzig in *Acanthamoeba* spp. konnte bisher ein natürliches Parasitieren von *P. acanthamoebae* durch isolierende Co-Kultivierung belegt werden. Durch weitere Untersuchungen zur Co-Kultivierung in verschiedenen *Acanthamoeba* spp. ließ sich keine Speziespezifität für den Stamm ‚Hall’s coccus‘ nachweisen (Coulon *et al.*, 2012).

1.3.5 Infektionsquellen und Übertragungswege

Acanthamoeba spp., die *P. acanthamoebae* als natürlicher Wirt dienen und denen somit eine Rolle als vitaler Vektor bei der Übertragung zugesprochen werden kann, bieten dem obligat intrazellulären Erreger die Möglichkeit zur Persistenz und Replikation (Horn, 2008). Selbst kommen sie ubiquitär und vor allem wasserassoziiert vor. Sie stellen ein Reservoir mit weiter und ständiger Verbreitung dar. Kultivierungsversuche von *P. acanthamoebae* in anderen Amöbenarten und diversen Säugerzelllinien verliefen bisher nicht erfolgreich (Hayashi *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu konnte in weiteren Untersuchungen jedoch die Besiedelung von sowie die Replikation in Pneumozyten, Lungenfibroblasten und Makrophagen durch *P. acanthamoebae* gezeigt werden (Casson *et al.*, 2006; Greub *et al.*, 2003d). Eine genaue Ursache für diesen Widerspruch konnte bisher nicht ermittelt werden, wird aber in den unterschiedlichen Kultivierungsprotokollen vermutet.

Untersuchungen zur Prävalenz *Acanthamoeba*-spezifischem Immunglobulin G bei gesunden Menschen ergaben Werte von 3,2 bis 100% (Chappell *et al.*, 2001) bzw. von über 85% für sekretorisches Immunglobulin A (Brindley *et al.*, 2009). Neben der weitreichenden natürlichen

Verbreitung sprechen die hohen Serokonversionsraten für eine intensive Interaktion zwischen Mensch und Acanthamoeben. Wenn man davon ausgeht, dass in ca. 5% aller *Acanthamoeba* spp. gramnegative, kokkoide Endozytobionten vorkommen (Fritsche *et al.*, 2000), ist jederzeit mit einer natürlichen Exposition gegenüber *P. acanthamoebae* zu rechnen. Darüber hinaus konnten bereits mit *P. acanthamoebae* infizierte *Acanthamoeba* spp. von nasaler Mukosa gesunder Probanden isoliert werden (Amann *et al.*, 1997), und am Beispiel des Stamms ‚Hall’s Coccus‘ konnte die zur Krankheit führende Kausalkette geschlossen werden (Birtles *et al.*, 1997).

Des Weiteren wurden auftretende Rinderaborte mit dem Nachweis von *Parachlamydiaceae* im Trinkwasser bzw. mit Kontamination der Tränken der betroffenen Tiere in Zusammenhang gebracht (Wheelhouse *et al.*, 2011). Am Beispiel von *Legionella pneumophila* konnte schon vorher gezeigt werden, dass sich pathogene Bakterien als Endoparasiten in wasserassoziierten Amöben vermehren und sich diese als Vektor zunutze machen (Rowbotham, 1980). Greub *et al.* (2003c) beobachteten eine Temperaturabhängigkeit der Persistenz und Replikation von *P. acanthamoebae* in *Acanthamoeba* spp. Der zytopathische Effekt erwies sich bei Temperaturen zwischen 32°C und 37°C am größten. Folglich wurde vermutet, dass der Kontakt mit körperwarmer, respiratorischer Mukosa eine Freisetzung von EB provoziert. Genauer wurde durch die Autoren postuliert, dass – entsprechend des steigenden Temperaturgradienten mit zunehmender Atemwegstiefe – in den oberen Atemwegen optimale Bedingungen für eine pararchlamydiale Persistenz, in den tiefen Atemwegen hingegen für eine lytische Externalisation des Erregers herrschen sollen.

Als weiterer Vektor werden außerdem seit kurzem Zecken ins Spiel gebracht. Eine Prävalenzstudie bei der Spezies *Ixodes ricinus* ergab eine geschätzte *Chlamydiales*-spezifische Prävalenz von 0,89%, wovon ein Drittel den *Parachlamydiaceae* zugeschrieben werden konnten (Pilloux *et al.*, 2015a).

P. acanthamoebae zeigt im Vergleich zu *C. trachomatis* und anderen CLO neben der Möglichkeit zur temporären Persistenz in Abwesenheit eines Wirts eine erhöhte Tenazität in Form von moderater Erhitzung (55°C über 10 min) und der Resistenz gegenüber Exposition von 7,5% Wasserstoffperoxidlösung (Coulon *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde in großem Umfang das Vorkommen von CLO in Trinkwasser dokumentiert, was eine Toleranz gegenüber niedrigen Biozidkonzentrationen, wie sie zur Trinkwasseraufbereitung genutzt werden, vermuten lässt (Thomas *et al.*, 2010).

1.3.6 Klinische Manifestation einer Atemwegsinfektion mit *P. acanthamoebae*

Die möglichen, klinischen Symptome einer respiratorischen *P. acanthamoebae*-Infektion beim Menschen sind vielfältig und spiegeln sich in den potentiellen Erscheinungsformen als Bronchitis, Bronchiolitis, atypische Pneumonie oder Aspirationspneumonie mit typisch

klinischen Bildern, die denen respiratorischer *Chlamydia* spp.-Infektionen ähneln, wider (Greub, 2009). Häufiger aber kommt es vermutlich zu subklinischen Erkrankungen, mit dennoch funktionell relevanten Folgen. Im Fall derENZootischen Bronchopneumonie (EBP) der Kälber treten nicht selten Mischinfektionen der typischen EBP-Erreger mit anderen *Chlamydia* spp. in ein und demselben Tier auf (Kaske *et al.*, 2012). Aufgrund fehlender Daten aus Tiermodellen oder klinischen Fallstudien war es von Bedeutung, die klinischen Symptome einer *Parachlamydia*-Monoinfektion in einem biologisch relevanten Modell zu untersuchen.

1.3.7 Diagnostik

1.3.7.1 Direkter Erregernachweis

Quantitative Echtzeit-PCR

Zum qualitativen Nachweis und zur Quantifizierung parachlamydialer DNA mittels Nukleinsäuren-Amplifikation und Detektion kommt eine *P. acanthamoebae*-spezifische qPCR zum Einsatz, wobei die Zielgene für das Transmembranprotein nicht-mitochondriale Adenosin-triphosphat/Adenosindiphosphat-Translokase (Greub *et al.*, 2003a) oder die 16S rRNA codieren (Casson *et al.*, 2008b). Darüber hinaus steht eine *Chlamydiales*-spezifische (pan-*Chlamydiales*) qPCR zum Nachweis der 16S rDNA Sequenz zur Verfügung, um in Probenmaterial *Chlamydiaceae* sowie gleichzeitig das breite Spektrum an CLO zu erfassen (Lienard *et al.*, 2011).

Co-Kultivierung

Abgesehen von der anspruchsvollen Natur des Erregers wird für eine Anzucht die Möglichkeit und Kompetenz zur amöbialen Co-Kultivierung und Anreicherung vorausgesetzt. Zur Isolierung von *P. acanthamoebae* aus Probenmaterial wird dieses als Homogenisat in einer *A. castellanii* Kultur inokuliert und die einsetzende *Parachlamydia*-Replikation induziert deren Lyse (Jacquier *et al.*, 2013). Bisher ist es nicht gelungen, *P. acanthamoebae* in Säugetierzelllinien anzuzüchten.

Immunhistologie

In Gewebeproben kann die Präsenz von *P. acanthamoebae* immunohistochemisch mit Hilfe von polyklonalen, polyspezifischen anti-*Parachlamydia*-Antikörpern, gewonnen aus gegen aufbereitete EBs immunisierte Kaninchen, belegt werden (Casson *et al.*, 2008a).

1.3.7.2 Indirekter Erregernachweis

Der serologische Antikörpernachweis durch Immunfluoreszenz basiert auf hitzeinaktivierten *P. acanthamoebae* in Form purifizierter EBs als Antigen und einem Fluoreszin-gekoppelten Anti-Immunoglobulin-Sekundärantikörper entsprechend der immunisierten Spezies. Kreuzreaktionen treten dabei gelegentlich auf und wurden vor allem unter nah verwandten Spezies (z. B. innerhalb der *Parachlamydiaceae*) aber auch vereinzelt interfamiliär beobachtet (Casson

et al., 2007). Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität der serologischen Nachweismethoden liegen bisher noch nicht vor.

1.3.8 Therapiemöglichkeiten

P. acanthamoebae zeigt sich *in vitro* gegenüber Makroliden, Tetracyclinen und Rifampicin sensibel, gegenüber β -Lactamen und Chinolonen jedoch resistent (Maurin *et al.*, 2002; Vouga *et al.*, 2015). Als Resistenzmechanismus gegen Chinolone konnten zwei Substitutionen auf der ‚Quinolones Resistance-Determining Region‘ des DNA Gyrase A-Gens identifiziert werden (Casson & Greub, 2006). Bisher fehlen Ergebnisse aus Tiermodellen. Klinischen Fallstudien lassen ebenfalls nur eine Orientierung an den beschriebenen *In-vitro*-Daten zu und machen somit eine gezielte Therapie gegen *P. acanthamoebae* von dessen Nachweis abhängig. Als antimikrobielle Chemotherapeutika der genannten Gruppen wären Azithromyzzin, Clarithromycin oder Doxycyclin denkbar. Eine Nutzung von Rifampicin wird nur in Kombination empfohlen, da eine Resistenzentwicklung unter Monotherapie, wie bei *Chlamydia* spp. vermutet wird (Vouga *et al.*, 2015).

1.4 Großtiermodell Kalb

1.4.1 Anatomische und funktionelle Besonderheiten der Rinderlunge

Die Hauptaufgabe der Lunge besteht darin den Transport und Austausch der Atemgase zwischen Organismus und Umgebungsluft zu gewährleisten, mit dem Ziel venöses Blut zu arterialisieren. Da die geringste Anzahl der Zellen in direktem Kontakt mit der Außenwelt stehen, bedarf es der Notwendigkeit von Transportsystemen zwischen der zellulären Ebene und der Umgebung. Im Fall der äußeren Atmung sind dies das respiratorische System und das Kreislaufsystem. Um eine ausreichende Versorgung des Gesamtorganismus mit Sauerstoff sicherzustellen bedarf es folglich eines komplexen Zusammenspiels der beiden Transportsysteme.

Zu dem respiratorischen System zählen unter anatomischen Gesichtspunkten die luftleitenden Atemwege, das Lungenparenchym, der knöcherner Thorax und die Atmungsmuskulatur. Die oberen (extrathorakalen) Atemwege bestehen aus den Nasenöffnungen, den Nasenhöhlen, dem Pharynx, dem Larynx und der Trachea. Deren Aufgabe ist hauptsächlich die Zu- und Abführung der Atemluft zum bzw. vom Ort des Gasaustausches, worin sie funktionell durch die Kontraktion des Zwerchfells und der Atmungsmuskulatur unterstützt werden. Die tiefen Atemwege setzen sich aus dem luftleitenden Bronchialsystem (Hauptbronchien, Segmentbronchien und Bronchioli) sowie dem gasaustauschenden Alveolarsystem zusammen und befinden sich intrathorakal (Waibl, 2004). Zum Zeitpunkt der Geburt sind die vorhandenen Alveolen bei Kälbern funktionell vollständig ausgebildet. In den ersten 30 Lebenstagen findet die Differenzierung des Bronchialepithels statt, woran sich das eigentliche Lungenwachstum

anschließt (Reinhold, 1997). Dabei nehmen mit zunehmendem Alter die Anzahl der Alveolen sowie der Durchmesser der Bronchien, und damit die Gesamtoberfläche sowie das Lungenvolumen kontinuierlich zu. Gleichzeitig vermindert sich der prozentuale Anteil der terminalen Bronchien (Castleman & Lay, 1990). Die vollständig ausgeprägte physiologische Lungenreife erlangen Rinder im Alter von ca. einem Jahr (Lekeux *et al.*, 1984) bzw. mit dem Erreichen eines Körpergewichts von ca. 300 kg (Gustin *et al.*, 1988).

Sowohl anatomisch als auch funktionell unterscheidet sich der bovine Atmungsapparat von denen anderer Tierarten. Vergleichend ist besonders hervorzuheben, dass die Rinderlunge durch eine ausgeprägte Lobulierung gekennzeichnet ist. Jedes durch bindegewebige Septen abgegrenzte Lungensegment wird über einen Segmentbronchus belüftet und weist ein funktionell zugehöriges Gefäßsystem auf. Die dadurch gebildeten Parenchymbezirke der Rinderlunge stellen im weitesten Sinne separate, bronchovaskuläre Einheiten dar, die sich deutlich voneinander abgrenzen. Darüber hinaus fehlen dem Rind jegliche akzessorischen Atemwege und somit die Möglichkeit einer kollateralen Ventilation (McLaughlin *et al.*, 1961). Eine weitere Besonderheit der Rinderlunge im Vergleich zu anderen Tierarten stellt die geringe Kapillardichte je Alveoleneinheit dar, die sich neben der Flussgeschwindigkeit des Blutes und dem pulmonalen Gefäßdruck direkt auf die Perfusion auswirkt. Demzufolge geht dieser Umstand unweigerlich mit einer geringen Gasaustauschkapazität pro Alveolenoberflächeneinheit einher. Darüber hinaus ermöglicht beim Rind ein hoher Gehalt glatter Muskelzellen in der Media der Pulmonalarteriolen deren verstärkte Vasokonstriktion im Sinne der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion. Hierbei sorgt die Erhöhung des lokalen Strömungswiderstands in den Pulmonalarterien aufgrund alveolärer Hypoxie, bedingt durch regionale Hypoventilation, für eine Umverteilung des zu arterialisierenden Blutes zugunsten besser ventilierter Lungensegmente (Reinhold & Höchel, 2005; Robinson, 2012). Dieser Mechanismus ist somit von übergeordneter Bedeutung für die Regulation des Ventilation-Perfusions-Verhältnisses bei Rindern, da diese nicht über die Möglichkeit einer kollateralen Ventilation verfügen. Jedoch birgt sie gleichzeitig die Gefahr der Induktion einer pulmonalen Hypertonie.

Die Luft-Blut-Schranke bildet die Barriere zwischen Alveolarraum und kapillärem Blut. Ihre geringe Schichtdicke (ca. 1-2 μm) bedingt eine kurze Diffusionsstrecke für die Atemgase, wodurch deren optimaler Transport zwischen dem Alveolargasgemisch (respiratorisches System) und Blut (Herzkreislaufsystem) sichergestellt wird.

1.4.2 Atemwegserkrankungen beim Kalb

1.4.2.1 Vorkommen und Bedeutung

Neben den intestinalen Infektionskrankheiten sind die Atemwegserkrankungen bei Kälbern sowohl tiergesundheitslich als auch agrarökonomisch von herausragender Bedeutung. Die bedeutendste Rolle bei Kälbern im Alter zwischen zwei bis vier Wochen fällt hierbei der

Enzootischen Bronchopneumonie (EBP) zu, welche zwar weltweit, aber dabei in unterschiedlicher Inzidenz bzw. Ausprägung auftritt. Entscheidend für das Vorkommen dieser klassischen Faktorenerkrankung sind, neben den Umweltbedingungen, der Infektionsdruck, die Virulenz und Tenazität der Erreger sowie der immunologische und genetische Status des Kalbes (Grissett *et al.*, 2015). Abgesehen von den direkten Tierverlusten spiegeln mangelhafte Entwicklung und dadurch verminderte Tageszunahmen chronisch kranker Kälber, Tierarzt-kosten sowie erhöhter personeller und zeitlicher Aufwand die ökonomische Relevanz dieser Erkrankung wider. Darüber hinaus werden die aus Atemwegserkrankungen resultierenden Lungenfunktionsstörungen und ihr negativer Einfluss auf die spätere Leistung von Tieren allgemein unterschätzt (Kaske *et al.*, 2012). Dementsprechend konnte ein direkter Zusammenhang zwischen einem erhöhten Risiko für den vorzeitigen Abgang von Milchkühen aus der Herde sowie einer reduzierten Milchleistung in der ersten Laktation mit einer früheren, respiratorischen Erkrankung derselben Tiere im Alter von bis zu 120 Tagen nachgewiesen werden (Schaffer *et al.*, 2016). Ebenso korrelierte die Präsenz von pathologischem Lungengewebe bzw. pleuralen Adhäsionen bei Masttieren signifikant mit verminderten Tageszunahmen (Thompson *et al.*, 2006).

1.4.2.2 Erreger

Das Krankheitsgeschehen der EBP beginnt in der Regel mit einer viralen Primärinfektion, die bei apparenter Ausprägung durch milde klinische Symptome bestimmt wird und in Folge einer Immunsuppression den Organismus für bakterielle Sekundärerreger empfänglich macht. Als virale Erreger kommen dafür das Bovine Herpesvirus Typ 1, das Parainfluenza 3-Virus, das Bovine Virusdiarrhoe-Virus sowie das Bovine Respiratorisches Syncytialvirus in Betracht (Grissett *et al.*, 2015). Unter dem Einfluss der anderen o. g., prädisponierenden Faktoren können auch sich daraus ergebende Stresssituationen die bakterielle Vermehrung begünstigen und durch Monoinfektion zu pneumonischen Zuständen führen. Bei den typischen bakteriellen Erregern handelt es sich um die gramnegativen Keime *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*. Hinzu kommen die sog. atypischen Bakterien, zu denen aktuell *Mycoplasma* spp. und *Chlamydia* spp. zählen (Angen *et al.*, 2009; Kaske *et al.*, 2012). Vor allem *Mycoplasma bovis* ist primär pneumopathogen und kann zu akut verlaufenden Atemwegsinfektionen führen. Allerdings tritt der Großteil der *Mycoplasma bovis*-Infektionen mit den typischen Pathogenen vergesellschaftet auf und ist durch die Tendenz zu einem chronischen, multimorbiden Krankheitsgehen charakterisiert. In diesem Zusammenhang wird darauf hingewiesen, dass den Mykoplasmen im Rahmen der EBP eine steigende Bedeutung beigemessen werden sollte (Caswell & Archambault, 2007).

Die möglichen chlamydialen Erreger respiratorischer Infektionen beim Kalb umfassen *Chlamydia (C.) pecorum*, *C. abortus* und *C. psittaci*. Diese können ebenfalls zu akuten Atemwegserkrankungen mit sowohl respiratorischer als auch systemischer Manifestation führen (Twomey *et al.*, 2006). Darüber hinaus spielen vor allem chronisch-rekurrierende, subklinische

Chlamydia-Infektionen eine Rolle, wobei nicht selten Mischinfektionen mit mehreren *Chlamydia* spp. in ein und demselben Tier auftreten. Durch das Zusammenspiel mit ungünstigen Umwelt- bzw. Haltungsfaktoren wird die Symptomatik verstärkt und die funktionellen Folgen beeinträchtigen die Entwicklung der infizierten Kälber nachhaltig (Reinhold *et al.*, 2011). So konnte gezeigt werden, dass Kälber nach Feldinfektion mit *C. pecorum* und/oder *C. abortus*, trotz Ausbleiben eindeutiger, klinischer Symptome über einen Zeitraum von sechs Monaten, neben einer konstant subfebril erhöhten Körpertemperatur signifikant geringere Zunahmen an Körpermasse (BW) im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren zu verzeichnen hatten (Reinhold *et al.*, 2008).

1.4.2.3 Klinische Symptome und Diagnostik

Der Krankheitsverlauf der EBP beginnt in der Regel unspezifisch. Erste Symptome stellen sich oft als mit Abgeschlagenheit einhergehende, reduzierte Tränkeaufnahme und Fieber ($> 40,0^{\circ}\text{C}$) dar. Es folgen respiratorische Symptome ausgehend von den oberen Atemwegen, die durch Augen- und Nasenausfluss, vergrößerte Unterkieferlymphknoten sowie Husten gekennzeichnet sind. Die Atmungsfrequenz von > 30 Atemzügen pro Minute und eine deutlich wahrnehmbare Atmungsintensität sind weitere, eindeutige Symptome. Der Atmungstyp zeigt sich vermehrt abdominal, wobei auskultatorisch verschärfte, inspiratorische Atemgeräusche vor allem im Bereich der Spitzenlappen nachweisbar sind. Beim chronischen Krankheitsverlauf, aufgrund inkonsequenter oder ausbleibender Behandlung, kommt es neben Apathie und häufigem Husten zu expiratorischer Dyspnoe, welche teilweise als Stridor wahrnehmbar ist.

Zum direkten Erregernachweis bzw. dessen Isolierung eignen sich sowohl Zellabstriche der nasalen Mukosa als auch Trachealtupfer oder Trachealspülproben von frisch erkrankten Tieren – möglichst vor Beginn einer antimikrobiellen Therapie.

Neben der Möglichkeit zur labordiagnostischen Blutuntersuchung hinsichtlich entzündungsspezifischer Verschiebungen in den einzelnen Leukozytenfraktionen sind hämoxymetrische Parameter für die Beurteilung der Sauerstoffversorgung des Blutes von Bedeutung. Darüber hinaus können Akute-Phase-Proteine (APP) als diagnostische Biomarker im Blut oder – lungenspezifisch – in bronchalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) herangezogen werden. Das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) erwies sich in mehreren Untersuchungen als schnell ansprechender Parameter nach respiratorischer Infektion mit gramnegativen Bakterien (Schroedl *et al.*, 2001).

1.4.3 Charakterisierung der Lungenfunktion beim Kalb

Die Effizienz der Lungenfunktion und des damit einhergehenden, adäquaten Gasaustauschs von Sauerstoff (O_2) und Kohlenstoffdioxid (CO_2) zwischen der Umgebungsluft und dem Blut wird vom Verhältnis ihrer drei funktionellen Komponenten (Ventilation, Diffusion und Perfusion) zueinander bzw. derer regionalen Verteilung (Distribution) bestimmt. Des Weiteren spielen

eine entsprechende Transportkapazität des Blutes für die Atemgase sowie eine dem O_2 -Bedarf des Gesamtorganismus gerechte Anpassung von Ventilation und Perfusion durch die Atmungsregulation eine entscheidende Rolle beim Gasaustausch (Robinson, 2012). Die zentrale Steuerung des Atmungsvorgangs unterliegt der Anpassung an die wechselnden Bedürfnisse des Stoffwechsels. Zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung der einzelnen funktionellen Komponenten des Atmungsvorgangs stehen verschiedene Messmethoden zur Verfügung (Tabelle 1–B).

1.4.3.1 Blutgasanalyse

Die Analyse der arteriellen Atemgaspartialdrücke stellt ein wichtiges Hilfsmittel zur Einschätzung einer pulmonalen Dysfunktion dar und gilt in der Human- wie auch in der Veterinärmedizin als der ‚Goldstandard‘ zur Erkennung respiratorischer Insuffizienzen. Durch Störungen der Teilfunktionen der äußeren Atmung können pathologische Veränderungen der Blutgasparameter hervorgerufen werden. Eine respiratorische Partialinsuffizienz ist durch einen verminderten arteriellen Sauerstoffpartialdruck (p_aO_2) (Hypoxämie) bei unverändertem arteriellen Kohlenstoffdioxidpartialdruck (p_aCO_2) (Normokapnie) gekennzeichnet. Der Organismus befindet sich im Zustand einer Globalinsuffizienz, wenn neben einer Hypoxämie gleichzeitig ein erhöhter p_aCO_2 (Hyperkapnie) vorliegt (Reinhold & Födisch, 1993; Scholz *et al.*, 1987). Um zwischen respiratorischen und metabolischen Störungen differenzieren zu können, werden u. a. pH-Wert, p_aCO_2 , Bicarbonatkonzentration, Base Excess sowie die Stewart-Variablen zur Beurteilung herangezogen. Der p_aO_2 ist der empfindlichste Parameter zur Einschätzung des Schweregrads einer vorliegenden Ventilationsstörung. In diesem Fall verringert sich der alveoläre O_2 -Partialdruck (p_AO_2) durch die Atemwegsobstruktion oder -restriktion und mit ihm der p_aO_2 . Die alveoloarterielle Sauerstoffdruckdifferenz ($_{Aa}DO_2$) ist hingegen geeignet um Diffusions- bzw. Perfusionsstörungen zu diagnostizieren. Denn trotz gleichbleibendem p_AO_2 kann bei diesen Zuständen nicht genügend O_2 über die Luft-Blut-schranke diffundieren bzw. wird zu wenig venöses Blut zur O_2 -Bindung zur Verfügung gestellt. Der p_aO_2 sinkt ab und der $_{Aa}DO_2$ nimmt zu. Der p_aCO_2 bleibt hingegen unverändert. Da das CO_2 aufgrund seiner besseren Diffusionseigenschaft nicht im Blut akkumuliert, kann es – außer bei Ventilationsstörungen – ungehindert abgeatmet werden.

Die physiologischen Werte der arteriellen Atemgaspartialdrücke von gesunden Holstein-Friesian-Kälbern im Alter von 2 bis 6 Wochen wurden bisher in mehreren Studien evaluiert. Die Angaben der Mittelwerte des p_aO_2 variieren zwischen 11,0 und 12,8 kPa und die des p_aCO_2 zwischen 5,4 und 6,6 kPa. Die mittlere, arterielle Sauerstoffsättigung wird im Bereich 94,1 – 97,4% angegeben. (Elmer, 1999; Höchel, 2004; Reinhold & Födisch, 1993; Schäfer *et al.*, 1992; Uhlig & Gorzny, 1993).

1.4.3.2 Differenzierende Lungenfunktionsdiagnostik

Die Belüftung der Alveolarbereiche wird maßgeblich durch das Atmungsmuster und die Atmungsmechanik bestimmt. Die erfassbaren Ventilationsgrößen und Atmungswiderstände ermöglichen sowohl die Darstellung von physiologischen Anpassungsvorgängen, wie sie z. B. unter physischer Belastung auftreten, als auch die Charakterisierung von pathophysiologischen Zuständen im Verlauf respiratorischer Erkrankungen. Das Atmungsmuster ist gekennzeichnet durch Atmungsfrequenz (AF), Atemzugvolumen (V_t) und dem daraus errechneten Minutenvolumen (V_{\min}). Das Verhältnis zwischen V_{\min} und dem O_2 -Verbrauch (V'_{O_2}) des Organismus ist ein Maß für die Effektivität der Ventilation (V'_{spec}). Es gibt an, wie viel Volumen an Umgebungsluft ventiliert werden muss, um einen ml O_2 im Körpergewebe zu verbrauchen. Die alveoläre Ventilation (V'_A) wird durch das Verhältnis zwischen Totraumvolumen (V_d) und V_t bestimmt.

Die Analyse der Atmungsmechanik befasst sich mit der physikalisch-mathematischen Beschreibung der periodischen Atemgasströmung und den zu überwindenden Widerständen. Der mittels Impuls-Oszilloresistometrie ermittelbare Gesamtatmungswiderstand (respiratorische Impedanz) setzt sich aus einem resistiven Anteil (respiratorische Resistance, R_{rs}) und einem kapazitiven Anteil (respiratorische Reactance, X_{rs}) zusammen. Während der Inhalation wird der Einstrom der sauerstoffreichen Luft durch die Tätigkeit der inspiratorischen Atmungsmuskulatur, der Dehnbarkeit des Lungengewebes und der Brustwand (Compliance) sowie durch den Strömungswiderstand der Atemwege (R_{rs}) bestimmt. Darüber hinaus hat die Trägheit der Luftsäule innerhalb der Atemwege und des Lungengewebes selbst (Inertance) einen, wenn auch – unter Ruheatmung – vernachlässigbar kleinen Einfluss auf die X_{rs} . Die Expiration wird, nach Relaxation des Diaphragmas, maßgeblich durch die elastischen Retraktionskräfte (Elastance) des Lungengewebes realisiert und kann dabei zusätzlich, aktiv durch die expiratorische Atmungs- bzw. die Atemhilfsmuskulatur unterstützt werden. Auch hierbei stellt sich die R_{rs} dem Atemgasvolumenstrom entgegen.

Zur differenzierten Analyse der Ursachen, die zu einer Dysfunktion der äußeren Atmung führen, kommen verschiedene Verfahren (Tabelle 1–B) zum Einsatz. Dadurch wird es ermöglicht jeweils eine bestimmte, funktionelle Komponente dieses komplexen Vorgangs genauer charakterisieren zu können.

Tabelle 1–B: Auswahl validierter Methoden zur Quantifizierung von Ventilationsgrößen und Atmungswiderständen beim Kalb unter Spontanatmung (modifiziert nach Ostermann, 2013)

Methoden	Parameter	Lungenfunktion	Referenz
Blutgasanalyse	p_aO_2 , p_aCO_2	Gasaustausch	Donawick & Baue (1968), Uhlig & Gorzny (1993), Nagy <i>et al.</i> (2002)
Spirometrie	AF, V_t , V_{min}	Atmungsmuster	Bureau <i>et al.</i> (2001)
Capnographie	$ETCO_2$, V_d , $V'CO_2$	Ventilation	Reinhold <i>et al.</i> (2007), Reissig (2008)
Rebreathing He/CO-Diffusion	$V'O_2$	Ventilation	Kneucker (2009)
Impuls-Oszilloresistometrie	R_{rs} , X_{rs}	Atmungsmechanik	Reinhold <i>et al.</i> (1998a), Reinhold <i>et al.</i> (1998b), Smith <i>et al.</i> (2005)

p_aO_2 : arterieller Sauerstoffpartialdruck, p_aCO_2 : arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck, AF: Atmungsfrequenz, V_t : Atemzugvolumen, V_{min} : Minutenvolumen, $ETCO_2$: endtidale Kohlenstoffdioxidkonzentration, V_d : Totraumvolumen, $V'CO_2$: Kohlenstoffdioxidabgabe, He: Helium, CO: Kohlenstoffmonoxid, $V'O_2$: Sauerstoffverbrauch, R_{rs} : respiratorische Resistance, X_{rs} : respiratorische Reactance

1.4.4 Einfluss von Atemwegserkrankungen auf die Lungenfunktion beim Kalb

Der, durch die Segmentanatomie der Rinderlunge bedingte, hohe Anteil an Bindegewebe in der Lunge, wirkt sich nachteilig auf die zu leistende Atemarbeit aus. Darüber hinaus muss bereits unter physiologischen Bedingungen die reduzierte Gasaustauschkapazität pro Einheit Alveolenoberfläche durch eine höhere Ventilationsleistung kompensiert werden. Besonders obstruktive Atemwegserkrankungen zeigen demnach negative Auswirkungen, da das gesamte, der Obstruktion eines Segmentbronchus nachgeordnete Lungenparenchym, nicht mehr ausreichend belüftet werden kann. Zudem trägt die fehlende kollaterale Ventilationsmöglichkeit entscheidend dazu bei, dass die nachfolgenden Alveolarbereiche vom Gasaustausch ausgeschlossen werden. Die dadurch fehlende Kompensationsmöglichkeit beim Auftreten von Ventilationsstörungen, bedingt durch respiratorische Erkrankungen, erklärt das gehäufte Vorkommen von Atelektasen in der Lunge des Rindes. Abgesehen davon kann die krankheitsbedingte Veränderung einer jeden lungenfunktionellen Komponente mehr oder weniger den Austausch der Atemgase beeinträchtigen. Demnach manifestieren sich Störungen von Ventilation, Perfusion, Diffusion oder Distribution in jedem Fall als eine Verminderung des p_aO_2 . Bei auftretenden Ventilationsstörungen oder ventilatorischen Verteilungsstörungen kommt es darüber hinaus zu einer verminderten CO_2 -Abatmung, was eine Hyperkapnie und konsekutiv eine respiratorische Azidose zur Folge hat (Reinhold, 1997). Die dafür in Frage kommenden Ursachen können vielfältig sein und sind in Tabelle 1–C zusammengefasst.

Bisher wurden umfassende Versuche zur Erprobung bzw. Validierung der verschiedenen Verfahren zur Charakterisierung der Lungenfunktion an respiratorisch gesunden und an sowohl experimentell infizierten als auch spontan erkrankten Kälbern durchgeführt (Tabelle 1–B). Unabhängig von Alter, Erreger und Infektionsweg konnten die respiratorischen Erkrankungen dabei mehr oder weniger sensitiv analysiert und entsprechend der Untersuchungsmethode differenziert werden.

Die das Atmungsmuster charakterisierenden, ventilatorischen Parameter zeigen bei Kälbern nach respiratorischer Infektion (unabhängig vom Pathogen und der Infektionsquelle) typische kompensatorische Veränderungen. In Folge pathologischer Veränderungen restriktiver oder obstruktiver Art sind AF, V'_{\min} , Flow (V') und V'_{spec} erhöht, wohingegen sich V_t und V'_A vermindern (Jäger, 2006; Kneucker, 2009; Ostermann *et al.*, 2014; Reissig, 2008; van Bömmel, 2000).

Die Impuls-Oszilloresistometrie ermöglicht sowohl die Darstellung der physiologischen bzw. altersabhängigen Entwicklungen der Lungenfunktion als auch die Evaluierung des Einflusses pathologischer Prozesse. Die Funktionszustände des respiratorischen Systems werden dabei so sensibel erfasst, dass sich Dysfunktionen bereits bei subklinisch ausgeprägter Symptomatik detektieren lassen. Krankhafte Veränderungen im Bereich des Atmungstraktes gehen mit charakteristischen impuls-oszillometrischen Befunden einher. Krankheitsbedingte Verengungen der oberen Atemwege bedingen einen signifikanten Anstieg der R_{rs} im höheren Frequenzspektrum (>5 Hz). Eine signifikant verminderte X_{rs} sowie eine negative Frequenzabhängigkeit von R_{rs} deuten auf eine Störung des peripheren respiratorischen Systems hin. Ebenso konnten signifikante Beziehungen zwischen impuls-oszillometrischen Daten und arteriellen Blutgaswerten bei klinisch lungenkranken Kälbern nachgewiesen werden (Strie *et al.*, 1997).

Die Analyse der Atmungsmechanik von an einer respiratorischen *Chlamydia* spp.-Infektion erkrankten Kälbern mit subklinischer Ausprägung zeigte eine signifikante Erhöhung der expiratorischen R_{rs} im Niederfrequenzbereich (<5 Hz) verglichen mit gesunden Kontrolltieren. Mit zunehmendem Alter stellte sich die vorliegende Obstruktion der peripheren Atemwege derselben Tiere sogar schwerwiegender dar. Zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Ventilation erfolgte die Kompensation durch eine intensivierete Atemarbeit (AF und $V_t/BW \uparrow$; Jaeger *et al.*, 2007). Eine ausgeprägte klinische Erkrankung von Kälbern nach experimenteller *C. psittacii*-Infektion wurde sowohl von obstruktiven als auch restriktiven Atemwegsveränderungen begleitet. Zudem wurde hierbei eine Verringerung, der am Gasaustausch beteiligten Lungenabschnitte und eine alveoläre Hypoventilation beobachtet ($V_d \uparrow$, Alveolarvolumen (V_A) \downarrow ; Ostermann *et al.*, 2014).

Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Capnometrie lieferte eine Untersuchung von latent mit *Chlamydia* spp. infizierten Kälbern, die eine reduzierte CO_2 -Abatmung zeigten, wofür wiederum eine Hypoventilation und die damit einhergehende alveolare Entlüftungsstörung verant-

wortlich gemacht wurden (V_d und $V_d/V_t \uparrow$; endtidale CO_2 -Konzentration (ETCO_2) und V'_{CO_2} bezogen auf die metabolische Körpermasse (MBW) \downarrow ; Reissig, 2008). Eine erhöhte O_2 -Aufnahme und die dafür notwendige, intensivierete Atemarbeit wurden darüber hinaus als Folge eines zur Deckung des krankheitsbedingt erhöhten Stoffwechselbedarfs bei Kälbern mit persistierender *Chlamydia* spp.-Infektion angesehen ($V'_{\text{O}_2}/\text{MBW}$ und $V'_{\text{spec}} \uparrow$; Kneucker, 2009).

Tabelle 1–C: Ursachen von Ventilationsstörungen (modifiziert nach Reinhold, 1997)

Obstruktion (Resistance \uparrow)	Restriktion (Compliance \downarrow)	Extrapulmonale Störungen
Organisch <ul style="list-style-type: none"> - Verlegung der Atemwege durch Bronchialsekret - BALT Hyperplasie - Neoplasie - Fremdkörper Funktionell <ul style="list-style-type: none"> - entzündlich bedingter Bronchospasmus 	Pleural <ul style="list-style-type: none"> - Pleuritis (Infiltrate, Exsudat und Adhäsion) - Pleuraemphysem - Pleurafibrosierung Pulmonal <ul style="list-style-type: none"> - Pneumonie - Hepatisation - Lungenfibrose Thorakal <ul style="list-style-type: none"> - Einschränkung der thorakalen Ausdehnungsfähigkeit 	Absinken der Kraft der Atmungsmuskulatur <ul style="list-style-type: none"> - Zentralnervöse Störungen - Periphere Innervationsstörungen - Muskelerkrankungen - Adipositas

BALT: Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe

1.5 Eigene Untersuchungen

Bisher wurden nur wenige pneumovirulente Erreger in tierexperimentellen Studien am Kalb bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Lungenfunktion untersucht. In der einschlägigen internationalen Literatur lagen für das Bakterium *P. acanthamoebae* in diesem Zusammenhang vor Beginn der hier beschriebenen Versuche noch keine Untersuchungen vor.

1.5.1 Arbeitshypothesen

Zur Durchführung der eigentlichen Untersuchungen war es zunächst notwendig ein Modell der respiratorischen *Parachlamydia*-Infektion beim Kalb zu etablieren und dieses pathophysiologisch zu charakterisieren. Auf der Basis dieses Modells waren folgende Hypothesen zu überprüfen:

Eine respiratorische Monoinfektion von Kälbern mit *P. acanthamoebae*

- (i) verursacht, in Abhängigkeit der Inokulationsdosis, eine fibropurulente, interstitielle Pneumonie mit entsprechender Entzündungsreaktion und klinisch apparentem Krankheitsverlauf und
- (ii) führt zu respiratorischen Dysfunktionen, die durch Parameter der differenzierenden Lungenfunktion widerspiegelt werden.

1.5.2 Allgemeiner Versuchsaufbau

Das Tierversuchsvorhaben ‚Evaluierung der pathogenetischen Relevanz von *P. acanthamoebae* als Erreger respiratorischer Infektionen beim Rind‘ war durch die zuständige Kommission des Thüringer Landesamtes für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz; Abteilung Gesundheitlicher Verbraucherschutz, Veterinärwesen, Pharmazie genehmigt (Reg.-Nr. 04-001/12).

Die vorliegende Studie wurde in zwei Teilversuche (TV) gegliedert, wobei insgesamt 42 Kälber im Alter von 3 bis 7 Wochen als Versuchstiere, aufgeteilt auf 4 Gruppen, involviert waren. Alle 4 Gruppen lieferten Daten für beide TV, wobei das zum Einsatz gekommenen Methodenspektrum eine komplexe Beurteilung bzw. Beprobung der Tiere zuließ (Tabelle 1-D). Hinsichtlich des Tierschutzaspektes konnte somit die Gesamtanzahl der genutzten Versuchstiere minimal gehalten werden. In TV 1 sollten die systemischen und lokalen Effekte von zwei verschiedenen Inokulationsdosen von *P. acanthamoebae* im Vergleich zum inaktivierten Erreger (unspezifische Effekte) über eine Dauer von 14 Tagen evaluiert werden. Im TV 2 wurden in zwei Abschnitten (Study 1 und Study 2) die pathogenetischen Interaktionen zwischen Erreger und Wirt auf funktioneller Ebene sowie im zeitlichen Verlauf über eine Gesamtdauer von 10 Tagen untersucht. Während der beiden TV wurden zum Ausschluss von Co-Infektionen Analysen zur mikrobiologischen Beurteilung des Atmungsapparates durchgeführt.

Alle Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, fanden unter Bedingungen der biologischen Schutzstufe 2 im Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit am Standort Jena statt. Die zuständige Tierschutzbeauftragte des Standortes konnte jederzeit uneingeschränkt tätig sein.

1.5.3 Studiendesign

1.5.3.1 Teilversuch 1: Modelletablierung und Dosistitration

Zur Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von *P. acanthamoebae* in der Kälberlunge wurden drei Tiergruppen nach Applikation unterschiedlich dosierter *Parachlamydia*-Inokula im interindividuellen Vergleich betrachtet:

- 10^8 einschlusskörperchenbildende Einheiten (EBE) hitzeinaktivierter *P. acanthamoebae*/Kalb
- 10^8 EBE vitaler *P. acanthamoebae*/Kalb
- 10^{10} EBE vitaler *P. acanthamoebae*/Kalb

Die Inokulation der Kälber mit der jeweiligen *Parachlamydia*-Dosis, suspendiert in 8 ml Medium, erfolgte intrabronchial (6 ml) entsprechend eines für diese Zwecke entwickelten Schemas (Abbildung 1–A). Zusätzlich wurden 2 ml des Inokulums intranasal verabreicht. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über insgesamt 14 Tage ab dem Inokulationszeitpunkt. Zur Erfassung des Krankheitsverlaufes erfolgten in regelmäßigen Abständen sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* Beprobungen (Tabelle 1–E). Eine Einschätzung bezüglich der Pathogenität der vitalen bzw. inaktivierten Parachlamydien erfolgte anhand des Schweregrades der klinischen Symptome der respiratorischen Erkrankung im Zusammenhang mit Veränderungen im Blutbild und der Serumkonzentrationen der APP sowie durch pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Veränderungen des Lungengewebes und der Atemwege (Tabelle 1–D). Nach Sektion der Tiere erfolgten Untersuchungen zum direkten Erregernachweis im Lungengewebe sowie in möglicherweise hämatogen besiedelten Organen. Die Kontrolle der *Parachlamydia*-Ausscheidung erfolgte durch die regelmäßige Gewinnung von Nasen- und Augentupfern zum Nachweis der Besiedlungen des oberen Respirationstraktes sowie durch Kottupfer (TV 1: Figure S1).

1.5.3.2 Teilversuch 2: Pathophysiologische Charakterisierung des Modells durch differenzierende Lungenfunktionsdiagnostik

Im ersten Abschnitt (Study 1) wurde die Effektivität des pulmonalen Gasaustauschs nach intrabronchialer *Parachlamydia*-Inokulation anhand der arteriellen Blutgasparameter untersucht. Dazu wurde bei Kälbern der o. g. drei Versuchsgruppen täglich arterielles Blut mithilfe eines Verweilkatheters aus der *Aorta abdominalis* gewonnen. Diese Untersuchung erstreckte sich von einem Tag *ante inoculationem* (a. i.) bis zum 7. Tag *post inoculationem* (p. i.).

Im zweiten Abschnitt (Study 2) wurden neun Kälber einer vierten Gruppe, die mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokuliert waren, über 10 Tage nichtinvasiven Lungenfunktionstests unterzogen, um funktionelle Störungen im respiratorischen System bzw. den Grad der Lungenschädigung durch die *Parachlamydia*-Infektion zu charakterisieren (Tabelle 1–D). Dieser Abschnitt wurde ohne Kontrolltiere konzipiert, da die vor Inokulation erhobenen Daten dieser Tiere (baseline) als individuelle Kontrollwerte betrachtet werden konnten und die spätere Auswertung im intraindividuellen Vergleich abhängiger Daten erfolgte.

Tabelle 1–D: Studiendesign und Anzahl verwendeter Tiere

	Challenge [EBE/Kalb]	Anzahl [Kälber]	davon involviert in					
			Teilversuch 1			Teilversuch 2		
			<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>		Study 1	Study 2	
			Patho	BALF/MiBi	art. BGA	Lufu	ven. BGA	
Gruppe 1	10^8 inaktiviert	n=9	n=9	n=9	n=9	n=8		
Gruppe 2	10^8 vital	n=12	n=12	n=12	n=12	n=8		
Gruppe 3	10^{10} vital	n=21	n=9	n=9	n=9	n=6		
Gruppe 4			n=9	n=12		n=9	n=9	
Summe		n=42	n=30	n=39	n=42	n=22	n=9	n=9

EBE: einschlusskörperchenbildende Einheiten, TV: Teilversuch

TV 1 *in vivo* Read-outs: klinische Symptomatik (klinischer Score), Hämatologie, Differentialblutbild, Akute-Phase-Proteine, Tupferproben

ex vivo Read-outs: Patho – pathomorphologische, pathohistologische und immunhistologische Untersuchung; BALF/MiBi – Gewinnung von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit und Gewebeproben zur zytologischen, biochemischen, molekularbiologischen und bakteriologischen Untersuchung

TV 2 Study 1 Read-outs: art. BGA – arterielle Blutgasanalyse und Hämoximetrie

Study 2 Read-outs: Lufu – nichtinvasive Lungenfunktionstests (Spirometrie, Impuls-Oszilloresistometrie, Capnometrie, Rebreathing CO/He Diffusion); ven. BGA – venöse Blutgasanalyse und Säuren-Basen-Status

Tabelle 1–E: Sektionszeitpunkte und Anzahl der *ex vivo* untersuchten Tiere

	Challenge [EBE/Kalb]	Anzahl [Kälber]		Zeitpunkt						
				2 dpi	3 dpi	4 dpi	7 dpi	10 dpi	14 dpi	17 dpi
Gruppe 1	10^8 inaktiviert	n=9	Sektion			n=3		n=3	n=3	
			Verbleib	n=9	n=9	n=6	n=6	n=3		
Gruppe 2	10^8 vital	n=12	Sektion	n=3		n=3		n=3	n=3	
			Verbleib	n=9	n=9	n=6	n=6	n=3		
Gruppen 3+4	10^{10} vital	n=21	Sektion	n=3	n=2	n=3	n=4	n=3	n=3	n=3*
			Verbleib	n=18	n=16	n=13	n=9	n=6	n=3	

EBE: einschlusskörperchenbildende Einheiten, dpi: Tage *post inoculationem*

* keine patho- und histologische Untersuchung, nur Gewinnung von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit und Gewebeproben *post mortem*

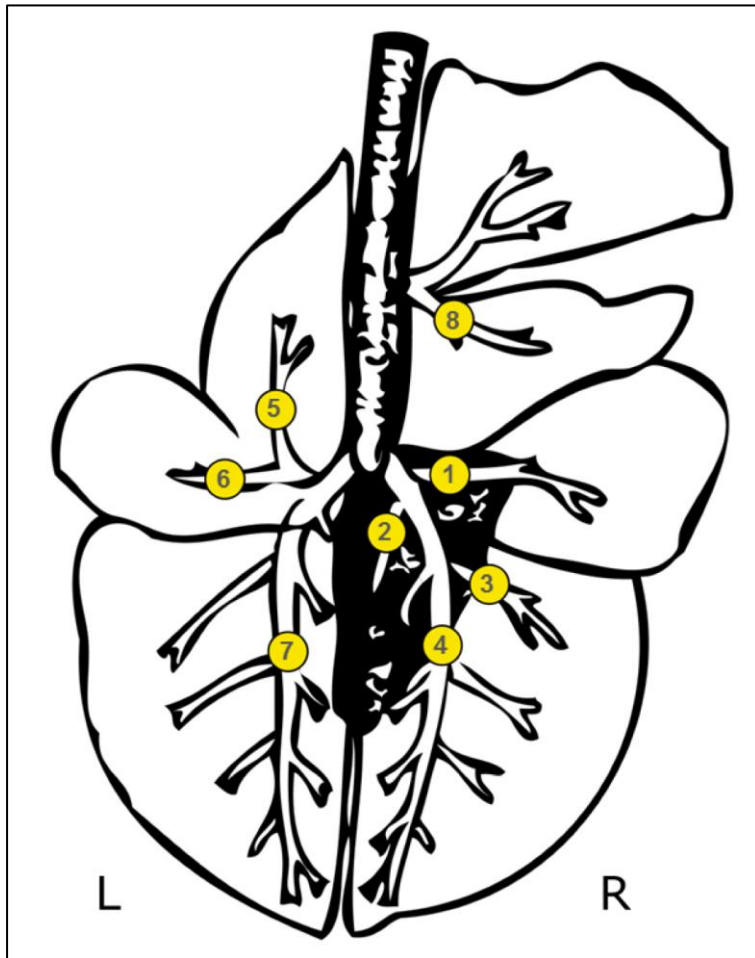


Abbildung 1-A: Intrabronchiales Inokulationsschema (modifiziert nach Prohl et al., 2014)

Die Markierungen zeigen die genauen Applikationsorte, die Nummerierung entspricht der Applikationsreihenfolge der jeweiligen Teilvolumina des Inokulums.

R: rechte Lunge

1 *Lobus medius*: 0,5 ml

2 *Lobus accessorius*: 0,5 ml

3 *Lobus caudalis*: 0,5 ml

4 *Lobus caudalis*: 1,0 ml

Lobus cranialis,

8 *Pars caudalis*: 1,0 ml

L: linke Lunge

Lobus cranialis,

5 *Pars cranialis*: 0,5 ml

6 *Pars caudalis*: 0,5 ml

7 *Lobus caudalis*: 1,5 ml

2 Veröffentlichungen

Teilversuch 1:

Lohr, M., Prohl, A., Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Schroedl, W., Aeby, S., Greub, G., Reinhold, P., 2015. A bovine model of a respiratory *Parachlamydia acanthamoebae* infection. *Pathogens and Disease* 73, 1-14.

<http://dx.doi.org/10.1111/2049-632x.12201>

You have to read this part online.

Teilversuch 2:

Lohr, M., Prohl, A., Ostermann, C., Diller, R., Greub, G., Reinhold, P., 2016. Effect of *Parachlamydia acanthamoebae* on pulmonary function parameters in a bovine respiratory model. *The Veterinary Journal* 213, 9-15.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.003>

You have to read or purchase this part online.

2.1 Teilversuch 1: A bovine model of a respiratory *Parachlamydia acanthamoebae* infection

Eigener Beitrag zur Umsetzung:

- Mitarbeit bei der Planung des Versuchsvorhabens
- Mitarbeit die der Beantragung des Tierversuchsvorhabens
- Durchführung der bronchoskopischen Inokulationen
- Durchführung der klinischen Untersuchungen/des klinischen Scorings
- Probenentnahmen *in vivo* (Blut, Tupfer, Gewebe)
- Durchführung der bronchoalveoläre Lavage *ex vivo*
- Durchführung der molekularbiologischen Untersuchung der gewonnenen Gewebeproben
- Koordination der Zuarbeit durch die Co-Autoren
- Mitarbeit bei der statistischen Auswertung der Daten
- Verfassen des Manuskriptentwurfs

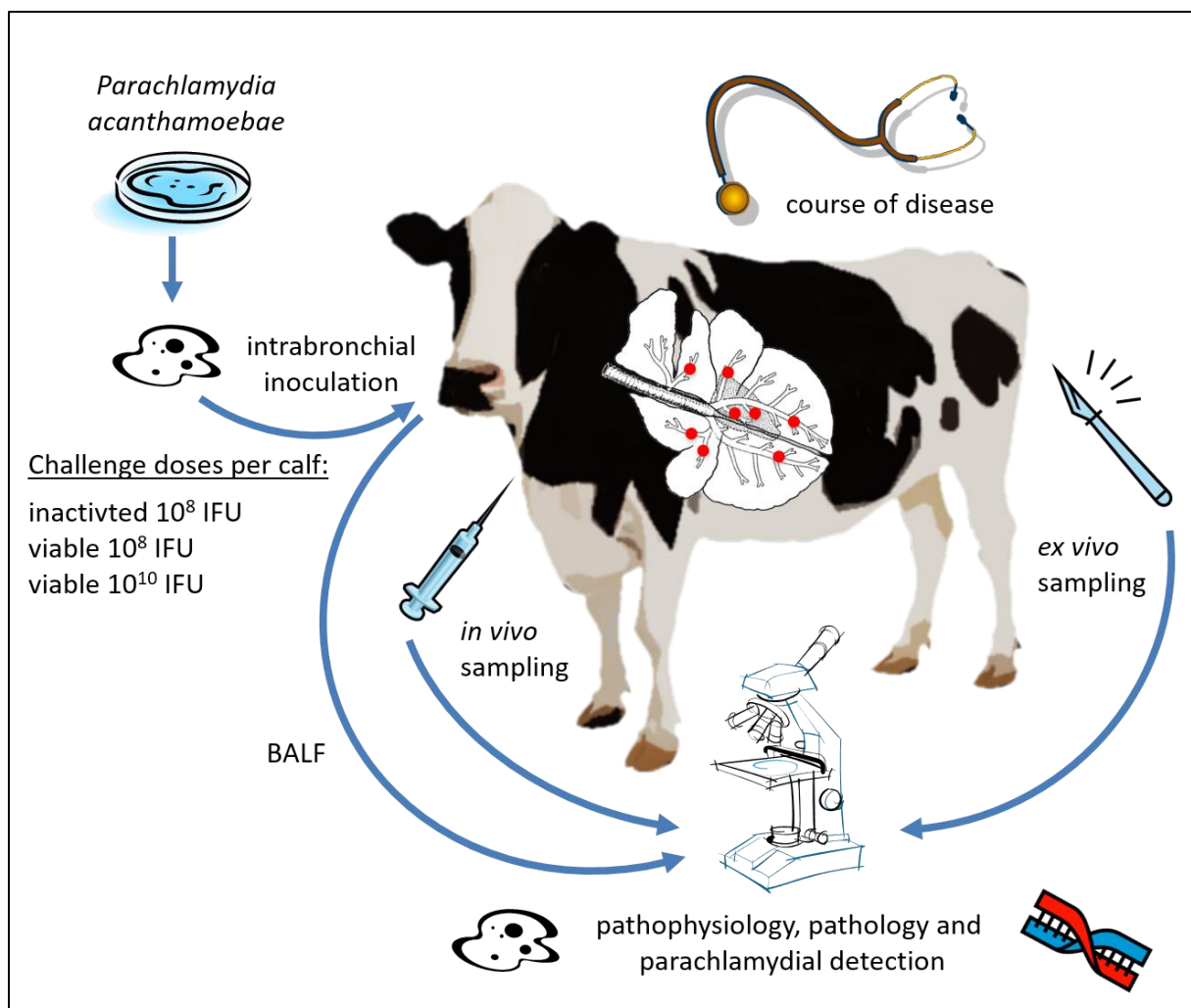


Figure S1. Graphical abstract TV 1. IFU: inclusion forming units, BALF: bronchoalveolar lavage fluid

2.2 Teilversuch 2: Effect of *Parachlamydia acanthamoebae* on pulmonary function parameters in a bovine respiratory model

Eigener Beitrag zur Umsetzung:

- Mitarbeit bei der Planung des Versuchsvorhabens
- Mitarbeit bei der Beantragung des Tierversuchsvorhabens
- Durchführung der bronchoskopischen Inokulationen
- Durchführung der klinischen Untersuchungen/des klinischen Scorings
- Blutprobenentnahmen (venös, arteriell)
- Mitarbeit bei der Durchführung der lungenfunktionsdiagnostischen Untersuchungen
- Mitarbeit bei der statistischen Auswertung der Daten
- Koordination der Zuarbeit durch die Co-Autoren
- Verfassen des Manuskriptentwurfs

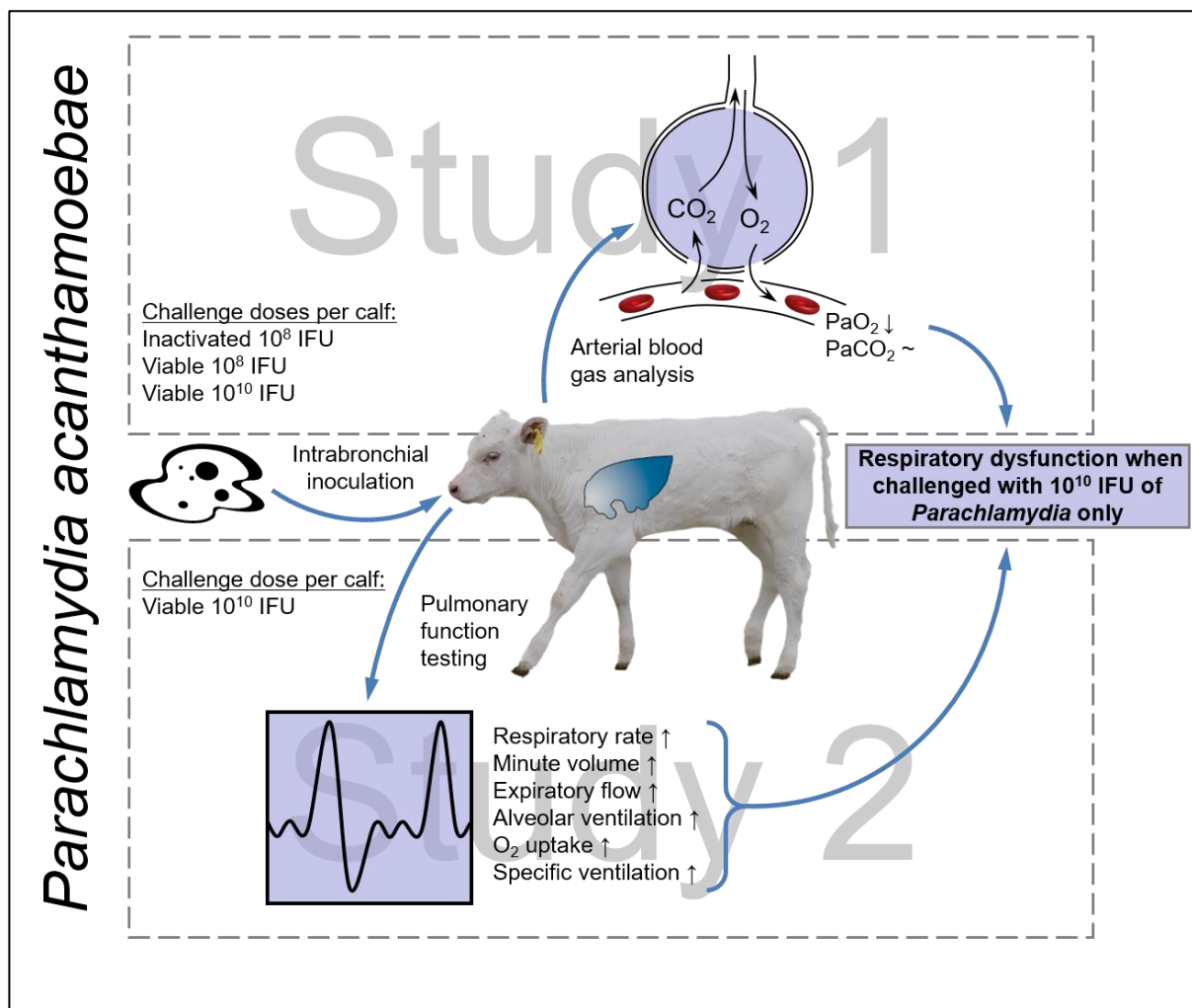


Figure S1. Graphical abstract TV 2. IFU: inclusion-forming units, PaO_2 : arterieller Sauerstoffpartialdruck, PaCO_2 : arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck

3 Diskussion

Dass dieser Arbeit zugrundeliegende Projekt zielte darauf ab, die Pathogenität von *P. acanthamoebae* nach experimenteller, respiratorischer Infektion im bovinen Wirt anhand klinischer, labormedizinischer, mikrobiologischer und pathologischer Parameter zu evaluieren (TV 1) sowie die mit der induzierten Infektion assoziierten pulmonalen Dysfunktionen mittels Lungenfunktionsdiagnostik zu charakterisieren (TV 2). Hierzu lagen zum Zeitpunkt der Durchführung keine Erkenntnisse im internationalen Schrifttum vor.

3.1 Validität des Großtiermodells

In der biomedizinischen Forschung stellen Virulenz- und Pathogenitätsstudien an etablierten Großtiermodellen im Vergleich zu Modellen an Nagetieren – vor allem auf Grund des personellen und apparativen Aufwands, der Tierhaltungskapazität sowie der experimentellen Durchführung – eine Ausnahme und gleichzeitig eine Herausforderung dar. Im translationalen Sinne besitzen diese ‚Alternativtierarten‘ einzigartige, anatomische und physiologische Voraussetzungen sowie experimentelle Vorteile, die eine multifunktionelle Nutzung der Modelle ermöglichen. So wird am Beispiel respiratorischer Erkrankungen auf ein besseres klinisch-translationales Potential, wegen der Möglichkeit zur Quantifizierung der Effizienz des Gasaustauschs, der systemischen und pulmonalen Hämodynamik sowie des Missverhältnisses von Ventilation und Perfusion hingewiesen (Ballard-Croft *et al.*, 2012). Hinsichtlich des für diese Arbeit zum Einsatz gekommenen, respiratorischen Infektionsmodells lieferten zudem frühere Studien zur Untersuchung eines anderen pneumopathogenen Erregers (*C. psittaci*) bereits reproduzierbare Ergebnisse (Ostermann, 2013).

3.1.1 Modelltierart und Erreger

Die Wahl zur Nutzung eines bovinen Modells lag darin begründet, dass Kälber mit einem Körpergewicht zwischen 50 und 100 kg ein Lungenvolumen, einen Luftvolumenstrom und Parameter der Atmungsmechanik aufweisen, die mit denen eines erwachsenen Menschen, sowohl quantitativ als auch qualitativ vergleichbar sind (Kirschvink & Reinhold, 2008). So konnten durch den Einsatz der nicht-invasiven lungenfunktionsdiagnostischen Verfahren mögliche respiratorische Störungen krankheitsbegleitend und intraindividuell mit nachweislich hoher Sensitivität evaluiert werden, was beispielsweise im Mausmodell nicht möglich gewesen wäre. Darüber hinaus zeigt sich die bovine Lunge im Hinblick auf die Simulation funktioneller Konsequenzen (wie z. B. Ventilationsstörungen) gegenüber der murinen Lunge, auf Grund ihrer ausgeprägten Segmentierung und dem Fehlen der Möglichkeit zur kollateralen Ventilation, im Vorteil. Die morphologische Grundstruktur der muren neonatalen Kälberlunge ist zwar mit der ausgewachsener Rinder vergleichbar, da die pränatale Lungenreifung bereits die Ausbildung alveolärer Strukturen beinhaltet, jedoch dauert die funktionelle postnatale

Lungenreifung bis zu einem Körpergewicht von 300 kg an. Hierbei korrelieren die Lungenfunktionsparameter generell enger mit der Körpermasseentwicklung als mit dem Alter (Reinhold, 2007). Dieser Umstand gab dazu Anlass in den eigenen Messungen die volumetrischen Lungenfunktionsparameter auf die Körpermasse und die mit dem O₂-Verbrauch des Organismus im Zusammenhang stehenden Parameter auf die metabolische Körpermasse zu beziehen.

Deutliche Grenzen werden der Modelltierart Rind durch die konventionelle Aufzucht in den Herkunftsbetrieben und die dementsprechende Heterogenität des Versuchstierkollektivs gesetzt. Von einer mehr oder weniger unkontrollierten Exposition gegenüber verschiedensten Mikroorganismen im Vergleich zur spezifisch pathogenfreien Aufzucht und Haltung von kleineren, etablierten Versuchstierspezies muss in diesem Zusammenhang ausgegangen werden. Demzufolge war es wichtig, die klinische Gesundheit der Kälber bei Einstallung und vor Versuchsbeginn zu überwachen und zu bestätigen. Ebenso wurden sowohl vor Inokulation als auch versuchsbegleitend relevante Vor- bzw. Begleitinfektionen durch umfangreiche mikrobiologische Untersuchung ausgeschlossen. Darüber hinaus trugen strenge Quarantänemaßnahmen und eine einmalige antimikrobielle Breitband-Prophylaxe drei Wochen vor Versuchsbeginn zu einer Reduzierung der potentiellen Belastung mit respiratorischen Co-Pathogenen bei.

In Bezug auf den zu untersuchenden Erreger *P. acanthamoebae* konnte das Rind bereits als Wirt für sowohl im Zusammenhang mit respiratorischen (Wheelhouse *et al.*, 2013) als auch urogenitalen Krankheitsgeschehen (Wheelhouse *et al.*, 2012; Wheelhouse *et al.*, 2015) identifiziert werden. Zudem kommen Parachlamydien nachweislich als Trinkwasserkontamination direkt in unmittelbarer Umgebung von Rindern vor (Wheelhouse *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang konnte bisher jedoch noch keine Kausalität zwischen Vorkommen bzw. Besiedlung und einem relevanten Krankheitsbild nachgewiesen werden. Ebenso wurde bisher noch kein Versuch unternommen *P. acanthamoebae* in bovinen Zellsystemen zu kultivieren um eine mögliche Aussage zur speziesspezifischen Zytopathogenität *in vitro* treffen zu können.

3.1.2 Experimentelle Infektion

Die lokal definierte, intrabronchiale Inokulation des zu überprüfenden Pathogens, wie sie im vorliegenden Fall bei den Kälbern vorgenommen wurde, birgt (im Gegensatz zur ausschließlich intratrachealen bzw. intranasalen Applikation bei der Maus) den Vorteil, erkranktes und gesundes Gewebe intraindividuell, krankheitsbegleitend, parallel und vergleichend zu untersuchen. Hinzu kommt, dass bei direkter Applikation in die Lunge die der Inhalationsroute entgegengesetzte Wirkung der mukoziliären Clearance zum größten Teil umgangen wird, da diese vor allem in den großen Bronchien und Bronchiolen als physische Barriere von Bedeutung ist. Über die potentielle Pneumopathogenität des Erregers lässt sich durch die

Umgehung dieses primären Abwehrmechanismus eine vermeintlich genauere Aussage treffen, da sich die klinische Manifestation der induzierten Erkrankung, verglichen mit der nach intranasaler Aerosol-Challenge, als weniger variabel erweist (Potgieter *et al.*, 1984). Durch die ausgeprägte Lobulierung der Rinderlunge kommt es nach Applikation des Inokulums zu einer lokal begrenzten Entzündungsreaktion im entsprechenden Segment, welches durch bindegewebige Septen vom umgebenden Lungengewebe abgegrenzt ist. Diese deutliche Demarkierung konnte im vorliegenden Versuch durch die Lokalisation und den Umfang der pathomorphologischen Befunde in den Kälberlungen nach *Parachlamydia*-Inokulation nachvollzogen werden. Zuvor konnte diese Tatsache mittels intrabronchialer Applikation von Tusche und ihrer anschließenden Ausbreitung im Lungengewebe bereits durch Ostermann (2013) etabliert werden. Eine weitere Erregerverbreitung kann anschließend retrograd und aerogen über den Segmentbronchus oder beim Überschreiten der alveolokapillären Barriere hämatogen über das funktionell zugehörige Gefäßsystem erfolgen. Im Gegensatz zur intrabronchialen Inokulation ist das Verteilungsmuster von pathologischem Lungengewebe nach natürlicher Atemwegsinfektion mit den EBP-typischen Erregern vor allem durch den Befall der cranioventralen Lungenbereichen (Spitzenlappen) geprägt (Caswell & Williams, 2015).

Die angesprochene, ausgeprägte Segmentierung des bovinen Lungengewebes und die Art und Weise der Inokulation limitiert die Aussagekraft der Studie bezüglich der Verteilung des Pathogens innerhalb der Atemwege bzw. innerhalb des Lungengewebes, wie sie nach natürlicher, aerogener Infektion oder Flüssigkeitsaspiration ablaufen würden. Ein Teilvolumen einer jeden Inokulationsdosis wurde daher zusätzlich intranasal appliziert um die lokale Reaktion der oberen Atemwege und dem damit assoziierten Lymphgewebe zu untersuchen. In wie weit die intranasal applizierten Parachlamydien durch Aspiration zum Geschehen in den tiefen Atemwegen beigetragen haben oder vorher durch Barrieremechanismen aus dem Wirtsorganismus eliminiert wurden, konnte in dem gewählten Modell nicht untersucht werden.

3.1.3 Erregerdosis

Die applizierten Inokulationsdosen von 10^8 EBE und 10^{10} EBE *P. acanthamoebae* je Kalb basierten quantitativ primär auf in zwei verschiedenen Mausmodellen ($2,5 \times 10^8$ EBE *P. acanthamoebae* je Maus intratracheal bzw. intranasal) untersuchten Erregerdosen (Casson *et al.*, 2008a; Pilloux *et al.*, 2015b). In beiden Versuchen konnten mit klinischen Krankheitssymptomen einhergehende, fulminante Lungenpathologien nachgewiesen werden, die von einer nicht unerheblichen Mortalitätsrate begleitet waren. Zudem orientierte sich die Dosisfindung an einem methodologisch ähnlichen Kälbermodell mit *C. psittaci*. Bei letzterem stellte sich heraus, dass eine Erregerdosis von 10^8 EBE *C. psittaci*/Kalb reproduzierbare, klinische Symptome einer respiratorischen Erkrankung hervorrief, die 72 h p. i. in einem klinischen Gesamtscore von bis zu 17,5 aus 49 Punkten kulminierten und über 7 Tage

anhielten. Mit Erhöhung der Inokulationsdosis (10^9 EBE *C. psittaci*/Kalb) verschlimmerten sich die beobachteten Symptome in ihrer Ausprägung deutlich, wohingegen eine geringere Dosis (10^6 EBE *C. psittaci*/Kalb) lediglich mit einer subklinischen Symptomatik einherging. Die zum Vergleich untersuchte, negative Kontrollgruppe erhielt reines Kulturmedium und zeigte keine Krankheitssymptome (Reinhold *et al.*, 2012).

In den eigenen Untersuchungen konnte ebenso – wenn auch in deutlich geringerem Maße – eine Dosis-Wirkungs-Beziehung von intrabronchial inokulierten Parachlamydien beobachtet werden. Im Vergleich zu den weitestgehend symptomlosen Verläufen der mit inaktivierten 10^8 EBE und vitalen 10^8 EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten Tieren, zeigten die Kälber nach Challenge mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb ein mildes klinisches Bild, das 24 h p. i. in einem Gesamtscore von bis zu 7 aus 49 Punkten kulminierte und über 4 Tage apparent war. Darüber hinaus entsprachen Erhöhung und Kinetik der systemischen (LBP) und lokalen, entzündungsspezifischen Parameter (BALF-Zytologie) sowie von Pathologie und der Befunde des direkten Erregernachweises dem Symptomverlauf der mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten Tiere. Innerhalb dieser Gruppe traten alle beobachteten Abweichungen der beschriebenen Parameter mit vertretbarer Variabilität und uniform auf, was die Reproduzierbarkeit der experimentellen Infektion belegt.

Die Aufteilung des jeweiligen Inokulationsvolumens (8 ml) auf zwei Teildosen zur intrabronchialen (6 ml) bzw. intranasalen (2 ml) Applikation sicherte die pulmonale Wirkung von mindestens $\frac{3}{4}$ der Gesamtmenge an Parachlamydien. Es ist davon auszugehen, dass die intranasal verabreichte Erregermenge, wenn überhaupt, nicht vollständig aspiriert oder vorher durch Barrieremechanismen des respiratorischen Epithels eliminiert wurden. Jedoch wurde dadurch eine natürliche Exposition simuliert und die Aussagekraft des Modells durch den Kontakt des Erregers mit der Schleimhaut der oberen Atemwege ergänzt.

In welchem Maße die eingesetzten Konzentrationen von *P. acanthamoebae*, die unter Laborbedingungen angereichert wurden, in natürlichen Habitaten vorkommen, bleibt zu spekulieren. Abgesehen davon ist weiterhin zu klären in welcher Art und Weise eine Interaktion von mit *Parachlamydia* infizierten *Acanthamoeba* spp. mit ihrem Wirt abläuft, da sicherlich die wenigsten Parachlamydien als freie, infektiöse EB in der Natur vorkommen. Die *in vitro* nachgewiesene Temperaturabhängigkeit der Endosymbiose und des zytopathischen Effekts in *A. polyphaga* und der in diesem Zusammenhang aufgestellten Hypothese, dass eine entsprechende Persistenz oder Liberation von *Parachlamydia* mit zunehmender Atemwegtiefe von der steigenden Temperatur im Körperkern abhängt (Greub *et al.*, 2003c), bedarf dahingehend einer Überprüfung *in vivo*.

3.1.4 Studiendesign und Umsetzung

Das generelle Ziel dieser Studie, die Pathogenität von *P. acanthamoebae* im bovinen Wirt zu evaluieren, indem eine klinisch relevante Inokulationsdosis titriert und anhand dieser die der

induzierten Erkrankung zugrundeliegenden Pathomechanismen charakterisiert wurden, konnte in vollem Umfang erfüllt werden. Die Durchführung erfolgte einfach verblindet und kontrolliert. Eine Unterteilung in zwei Versuchsabschnitte war logische Konsequenz der zu erwartenden Aussagen und basierte nicht zuletzt auf den Erfahrungen aus früheren Versuchen, denen die zu untersuchende Zieltierart bzw. der Erreger zugrunde lagen (Casson *et al.*, 2008a; Ostermann, 2013; Pilloux *et al.*, 2015b; Reinhold *et al.*, 2012). Die in TV 1 untersuchten Gruppen lieferten Daten zum interindividuellen Vergleich klinischer, labor-diagnostischer, mikrobiologischer sowie pathologischer Befunde in Abhängigkeit von der jeweiligen Inokulationsdosis zu verschiedenen Zeitpunkten in der akuten Infektionsphase. In Zusammenhang mit der in TV 2 angestellten Untersuchung zum pulmonalen Gasaustausch (Parameter der arteriellen Blutgase, Study 1) konnte diejenige Inokulationsdosis (10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb) identifiziert werden, bei der die respiratorischen Dysfunktionen evident wurden. Diese standen im Fokus des Folgeversuchs (Study 2) zur Charakterisierung der pathophysiologischen Veränderungen in der Lunge mittels nichtinvasiver Lungenfunktionstests. Eine Kontrolle erfolgte dabei intraindividuell durch den Vergleich mit den a. i. gewonnenen Daten (baseline), wodurch die interindividuelle Variabilität vernachlässigt werden konnte. So entsprach das Studiendesign eher dem einer longitudinalen Verlaufskontrolle, wie sie z. B. für das IOS in der klinischen Anwendung vorgesehen ist (Smith *et al.*, 2005). Darüber hinaus favorisierten die bereits beschriebenen Vorteile des zum Einsatz gekommenen Großtiermodells den intraindividuellen Vergleich der erhobenen Lungenfunktionsdaten und trugen somit, bei einer minimal notwendigen Stichprobenanzahl zur Sicherung der statistischen Aussage, zu einer Reduktion der Anzahl genutzter Versuchstiere bei. Die in beiden Versuchsabschnitten erhobenen Daten und die daraus resultierenden Ergebnisse ermöglichten eine umfassende Analyse einzelner, pathogenetischer Mechanismen und ihrer Zusammenhänge, wie sie im murinen oder *In-vitro*-Modell nicht hätten nachvollzogen werden können.

3.1.5 Nachweis des Kausalzusammenhangs zwischen Erreger und Krankheit

Klassischerweise bedarf die Ätiologie eines infektiösen Geschehens der Notwendigkeit der Überprüfung des kausalen Zusammenhangs von Erreger und induzierten Symptomen. Traditionell gilt es dabei den vier Henle-Koch Postulaten ausnahmslos zu entsprechen (Tabelle 3–A). Mit dem kontinuierlichen Erkenntnisgewinn über die weitreichende Komplexität der mikrobiellen Pathogenese und der Implementierung molekularbiologischer Methoden musste jedoch Abstand von der stringenten Anwendung bzw. Auslegung der Postulate genommen werden. Letztendlich unterliegt die Beweisführung der Kausalität einer evidenzbasierten Evaluierung, der die Henle-Koch Postulate im weitesten Sinne als Leitfaden dienen sollten (Fredericks & Relman, 1996).

In der vorliegenden Studie konnte die Abhängigkeit verschiedener Parameter, die eine objektive Beschreibung des Infektionsverlaufs zulassen, von den Inokulationsdosen und der Lebendigkeit des Erregers reproduzierbar dargestellt werden. Durch eine kontinuierliche und umfassende Beprobung wurde die Involvement anderer respiratorischer Co-Pathogene konsequent ausgeschlossen und die Initiation der pathophysiologischen Veränderungen inklusive aller pathologischen Befunde war als Folge der *Parachlamydia*-Infektion anzusehen. Die Erfüllung der ersten beiden Postulate war insofern nicht vollumfänglich realisierbar, als dass das Vorkommen von *Parachlamydia* in starker Abhängigkeit seines intrazellulären Lebensstils und damit seines natürlichen Wirts (*Acanthamoeba* spp.) steht. Die latente Besiedelung von Wirtszellen ist demnach ebenso möglich, wie eine Persistenz in den Wirt besiedelnden Amöben, was theoretisch dazu führen kann, dass *Parachlamydia* aus diesem Wirt isoliert wird, ohne dass dieser sich jemals damit krankhaft auseinandergesetzt hat, wie es Michel *et al.* (1994) und Amann *et al.* (1997) aus gesunden Probanden gelungen ist. Außerdem erfolgte die ursprüngliche Isolierung des in dieser Studie zur Anwendung gekommenen Infektionsstammes ‚Hall’s coccus‘ nicht aus der Zieltierart Rind, sondern aus *Acanthamoeba* spp., die im Tank eines Luftbefeuchters vorkamen und im Zusammenhang mit einem humanen Krankheitsgeschehen standen (Birtles *et al.*, 1997). Generell ist es bisher noch nicht gelungen einen Stamm aus einer mit klinischer Erkrankung einhergehenden *Parachlamydia*-Feldinfektion, trotz Nachweis durch qPCR bzw. IHC, zu isolieren. Die Kombination aus diesem *Parachlamydia*-Stamm und dem beschriebenen Kälbermodell zeigt dementsprechend keine Konformität mit den Postulaten, bringt aber den Vorteil eines dualen Nutzens mit sich: (i) die Untersuchung des Infektionsgeschehens anhand eines alternativen Tiermodells zur Ergänzung bzw. Überprüfung des Mausmodells hinsichtlich der translationalen Aussagekraft sowie (ii) die Erkenntnisse bezüglich der Pneumopathogenität im bovinen Wirt. Da *P. acanthamoebae* nachgewiesenermaßen in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsgeschehen bei Rindern auftritt, kann man von der Darstellung einer nahezu natürlichen Erreger-Wirt Interaktion ausgehen.

Tabelle 3–A: Henle-Koch Postulate und ihre Umsetzbarkeit im vorliegenden Versuch

Henle-Koch Postulat	Umsetzbarkeit und Konformität
1. Identifikation eines Erregers in einem erkrankten, jedoch nicht in einem gesunden Organismus	<i>P. acanthamoebae</i> konnte nicht aus einem natürlich erkrankten Individuum isoliert werden bzw. in keinem Tier vor Inokulation und zu keinem Zeitpunkt in den Kontrolltieren nachgewiesen werden. – teilweise Übereinstimmung
2. Isolation des Erregers aus dem erkrankten Wirtsorganismus und kulturelle Anzucht	Der verwendete <i>Parachlamydia</i> -Stamm wurde ursprünglich nicht aus einem erkrankten Rind isoliert. Eine Kultivierung in zellfreiem Medium ist nicht möglich, da bisher nur die amöbiale Co-Kultivierung in Frage kommt. – keine Übereinstimmung
3. Auftreten der spezifischen Krankheitssymptome nach Inokulation eines gesunden, empfänglichen Wirts mit dem kultivierten Erreger	Jedes mit lebenden Parachlamydien inokulierte Kalb zeigte von der Dosis abhängige Symptome und pathologische Befunde, die für eine transiente Pneumonie sprachen. Innerhalb der Versuchsgruppen waren die Ergebnisse von akzeptabler Variabilität und uniform. – Übereinstimmung
4. Re-Isolation des identischen Erregers aus dem durch experimentelle Infektion erkrankten Wirtsorganismus	<i>P. acanthamoebae</i> konnte aus den infizierten Kälbern re-isoliert werden und als identisch mit dem Inokulum identifiziert werden. – Übereinstimmung

3.2 Erreger-Wirt-Interaktionen und ihre funktionellen Auswirkungen

3.2.1 Klinische Manifestation

Die meisten, untersuchten Parameter des klinischen Zustandes zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der *Parachlamydia*-Inokulationsdosis. Dementsprechend erhöhte sich der klinische Gesamtscore der Kälber in direkter Relation zur applizierten Erregermenge. Die höchste, eingesetzte Erregerdosis (10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb) war in der Lage, zwar milde, aber klinisch apparente, respiratorische Krankheitssymptome während des Beobachtungszeitraums hervorzurufen, wohingegen Symptome nach Inokulation mit 10^8 EBE *P. acanthamoebae*/Kalb eher subklinisch in Erscheinung traten. Nach einer initialen Krankheitsphase (bis zu 4 Tage p. i.) erholten sich die Kälber von den respiratorischen und kardio-

vaskulären Symptomen, zeigten aber weiterhin pathologische Befunde anderer Organsysteme (z. B. vergrößerte Mandibularlymphknoten). Diese trugen im Folgenden zu einem weiterhin, signifikant erhöhten Gesamtscore der mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten Versuchsgruppe (verglichen mit den beiden anderen Gruppen) bei. Die Kontrollgruppe zeigte in Abwesenheit spezifischer Krankheitssymptome ebenso einen leicht erhöhten klinischen Gesamtscore nach Inokulation von inaktivierten 10^8 EBE *P. acanthamoebae*/Kalb, wie sie als unspezifische Reaktion, beispielsweise auf aspiriertes Fremdmaterial, ausfallen kann. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass immunologisch wirksame Zellwandbestandteile (z. B. LPS) trotz Erregerinaktivierung im Inokulum vorhanden waren und eine entsprechende Wirtsantwort provozieren können. Zum Ausschluss einer unspezifischen Wirkung vorhandener Virulenzfaktoren hätte es letztendlich einer weiteren negativen Kontrollgruppe bedurft, welche ausschließlich mit Medium inokuliert worden wäre. Aus ethischen Gründen (Reduktion der Versuchstieranzahl) wurde auf den Einsatz dieser verzichtet, zumal bereits in einem früheren Versuch unspezifische Wirkungen von chlamydialem LPS bei mit UV-inaktivierten *C. psittaci* inokulierten Kälbern ausgeschlossen werden konnten. Unumstritten bedurfte es hier des lebendigen, replikationsfähigen Erregers, um die beobachteten Krankheitssymptome und damit einhergehenden Lungenläsionen hervorzurufen. Diese übertrafen bei einer Inokulationsdosis von 10^8 EBE *C. psittaci* je Kalb in Ausprägung und Schweregrad die durch 10^{10} EBE *P. acanthamoebae* verursachten Symptome (Reinhold *et al.*, 2012). Auch im Vergleich zur Schwere der aufgetretenen Krankheitssymptome in mit $2,5 \times 10^8$ EBE *P. acanthamoebae* infizierten Mäusen (Casson *et al.*, 2008a; Pilloux *et al.*, 2015b) stellte sich der Krankheitsverlauf im Kalb nach Inokulation mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb wesentlich abgeschwächer dar. Betrachtet man beide Spezies im Vergleich, so ist als Grund hierfür ein relatives Missverhältnis zwischen den Relationen von Körpermasse bzw. Lungenvolumen (Faktor 4×10^3) und der Inokulationsdosis (Faktor 4×10^1) anzuführen. In wie weit diese Unterschiede oder die speziesspezifisch prädispositionierte Empfindlichkeit gegenüber *P. acanthamoebae* ursächlich für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf waren, bedarf weiterer Abklärung.

Berücksichtigt man den Krankheitsverlauf nach experimenteller Infektion mit einem typischen bakteriellen Erreger der EBP beim Kalb, so ist festzustellen, dass nach Applikation von $1,5 - 2,0 \times 10^{10}$ koloniebildenden Einheiten (KBE)/Kalb bzw. 5×10^9 KBE *M. haemolytica* A1/Kalb deutlich schwerwiegendere sowohl respiratorische als auch systemische Symptome vorherrschten, die teilweise mit Anaphylaxie und perakutem Tod einhergingen (Reeve-Johnson, 2001; Schroedl *et al.*, 2001). Intratracheal infizierte Jungrinder ($4,8 \times 10^{11}$ KBE *M. haemolytica*/Kalb) zeigten ebenso signifikant höhere, klinische Scores als mock-infizierte Kontrolltiere, wobei die Krankheitssymptome am 2. Tag p. i. am stärksten ausgeprägt waren und über ca. 5 Tage anhielten (Gershwin *et al.*, 2015). Verglichen mit den Literaturangaben hinsichtlich der durch ein klassisches EBP-Co-Pathogen induzierbaren klinischen Erkrankung

stellten sich die durch die höchste *Parachlamydia*-Inokulationdosis induzierten Krankheits-symptome als deutlich weniger stark ausgeprägt dar, zeigten aber im zeitlichen Verlauf und Dauer durchaus Parallelen.

3.2.2 Pathologische Befunde und Erregernachweis

Auch die pathologischen Befunde korrelierten mit den ihnen zugrundeliegenden *Parachlamydia*-Inokulationsdosen und variierten innerhalb der Versuchsgruppen wenig. Die pathomorphologischen Veränderungen des Lungengewebes waren vorwiegend im Bereich der Applikationsstellen peribronchial lokalisiert und konnten als subakute, fibropurulente Pneumonieherde identifiziert werden. Diese Befunde stimmen mit denen aus Versuchen am murinen Infektionsmodell überein. Eine intratracheale Inokulation mit $2,5 \times 10^8$ EBE/Maus desselben *Parachlamydia*-Stamms führte bei Mäusen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch zu Veränderungen der Lunge im Sinne einer fibropurulenten und interstitiellen Pneumonie (Casson *et al.*, 2008a). In den Kälbern betrug die maximale Ausdehnung der Läsionen nach Inokulation von 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb 6,6% des gesamten Lungenparenchyms zum Zeitpunkt 2 bis 4 Tage p. i. Damit war sie im Ausmaß deutlich geringer als die maximale Ausdehnung der Lungenläsionen nach experimenteller *C. psittaci* Infektion mit 10^8 EBE/Kalb zum selben Zeitpunkt (ca. 23%; Lambertz, 2011). Ebenso zeigten vergleichbare Versuche mit den klassischen Erregern der EBP, *M. haemolytica* und *P. multocida*, deutlich schwerwiegendere Pneumonieformen. Parenchymkonsolidierungen traten hierbei typischerweise im Bereich der Spitzenlappen auf und variierten im Umfang von 14,5 bis 40% (Hanzlicek *et al.*, 2010; Reeve-Johnson, 2001; Reinhold *et al.*, 2002).

In einigen Kälbern konnten als Nebenbefunde retroperitoneale Hämatome und/oder septisch-embolische Niereninfarkte erhoben werden, deren Ursache mit hoher Wahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit der Katheterisierung der *Aorta abdominalis* steht. Auf das Risiko der Thrombenformation im Zusammenhang mit der Platzierung zentraler, arterieller Kathetersysteme beim Kalb wurde bereits durch Offinger *et al.* (2011) hingewiesen. In ihren Versuchen dazu konnten jedoch keine thrombusassoziierten Begleiterkrankungen innerhalb von 5 Tagen beobachtet werden. Ebenso waren bei den von uns in die arterielle Beprobung eingeschlossenen Kälbern keine nennenswerten klinischen Begleitsymptome im Zusammenhang mit den arteriellen Verweilkathetern zu verzeichnen.

Nach Inokulation mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae* je Kalb konnte die überwiegende Mehrheit der Parachlamydien mittels IHC intrazellulär in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im pathologisch veränderten Lungengewebe bis 10 Tage p. i. nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden *Parachlamydia*-spezifische Genomsequenzen über den gesamten Untersuchungszeitraum in isolierten BALF-Zellen und Atemwegs-assoziierten Lymphknotengewebe (*Lymphonodi mediastinales*, *tracheobronchiales* und *retropharyngeales*) detektiert. Dieser Umstand und die mit zunehmender Zeit reduzierte Quantität parachlamydiaer DNA lassen

den Schluss zu, dass insbesondere die Zellen des unspezifischen Immunsystems *Parachlamydia* internalisieren und schlussendlich eliminieren.

Das zusätzlich zur intrabronchialen Inokulation intranasal applizierte *Parachlamydia*-Inokulum führte nicht zu pathologischen Veränderung der Mukosa in den oberen Atemwegen oder den *Tonsillae pharyngeales*; weder mittels qPCR noch IHC ließ sich *Parachlamydia* in diesen Geweben nachweisen. In den tiefen Atemwegen konnte *Parachlamydia* lediglich 2 Tage p. i. im Alveolarepithel immunhistologisch markiert werden. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass *Parachlamydia* wahrscheinlich die epitheliotrope Eigenschaft von *Chalymydia* spp. teilt (Rasmussen *et al.*, 1997), jedoch nicht, wie *In-vitro*-Versuche zeigten, Pneumozyten oder Lungenfibroblasten als intrapulmonale Nische zur Persistenz bzw. Replikation nutzt (Casson *et al.*, 2006).

Der Erfolg der co-kulturellen Re-Isolation von *Parachlamydia* aus dem Lungengewebe aller mit lebendem Erreger inokulierten Versuchsgruppen zeigte erneut eine positive Abhängigkeit von der Inokulationsdosis. Die Kinetik der erfolgreichen Isolierungen bzw. Kultivierungen entsprach qualitativ und quantitativ den Ergebnissen von IHC und qPCR.

Die beobachtete Verringerung der Lungenläsionen in beiden Versuchsgruppen im Verlauf des Untersuchungszeitraums 10 bis 14 Tage p. i. und der damit einhergehende sich verringernde Erfolg aller Erregernachweismethoden legt den Schluss nahe, dass sich die durch *Parachlamydia*-Inokulation induzierte Pneumonie als transient erwies und in Spontanremission trat. Diese Annahme wird zudem durch die zeitgleich abklingenden klinischen Symptome und die Abnahme der nachgewiesenen Entzündungsmarker gestützt. Darüber hinaus konnte zu keinem Zeitpunkt weder eine hämatogene Verbreitung bzw. die Besiedelung anderer Organe noch eine Ausscheidung von *Parachlamydia* erfasst werden.

3.2.3 Labordiagnostische Parameter zur Charakterisierung der unspezifischen Immunantwort

Die labordiagnostischen Parameter, die zur Charakterisierung der lokalen sowie systemischen Entzündungsreaktion herangezogen wurden, verhielten sich weitestgehend dosisabhängig. Entsprechend der eingeschränkten klinischen Manifestation des Krankheitsbildes nach *Parachlamydia*-Infektion zeigte sich die Gesamtleukozytenzahl im Blut unverändert, was generell gegen eine starke, unspezifische Immunantwort des Organismus gegenüber dem Bakterium spricht. Das Differentialblutbild wies jedoch eine Linksverschiebung auf, die sich am deutlichsten ausgeprägt in den mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten Kälbern am 4. Tag p. i. zeigte. Zieht man ähnlich Versuche am Kalb, jedoch unter Verwendung von eindeutig pneumopathogener Erregern zum Vergleich heran, so fällt auf, dass sowohl *M. haemolytica* als auch *C. psittaci* deutlich prominentere, infektionsspezifische Verschiebungen des weißen Blutbilds hervorrufen (Hanzlicek *et al.*, 2010; Ostermann *et al.*, 2013).

Ebenso verhält es sich mit dem Akute-Phase-Protein LBP, das als vielversprechender Biomarker für respiratorische Infektionsgeschehen mit gramnegativen Bakterien im Rind angesehen wird. Nach Inokulation mit *C. psittaci* zeigt sich der Verlauf der Serum-LBP-Konzentration krankheitsbegleitend signifikant erhöht gegenüber gesunden Kontrollen (Prohl *et al.*, 2015). Die LBP-Ausschüttung infolge einer akuten Infektion mit *M. haemolytica* erfolgt unmittelbar und konnte bereits 6 Stunden p. i. im Blut nachgewiesen werden (Schroedl *et al.*, 2001). Im direkten Vergleich wird deutlich, dass die Serum-LBP-Konzentration nach Exposition mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb nur eine 2,5-fache Erhöhung im Gegensatz zu einer 7-fachen Erhöhung nach akuter *M. haemolytica* Infektion zeigt. Die Serum-LBP-Konzentrationen von mit *C. psittaci* inokulierten Kälbern zeigten ebenfalls eine Dosisabhängigkeit, wobei die Maximalwerte deutlich die der *P. acanthamoebae* infizierten Tiere übertrafen (Ostermann *et al.*, 2013). Zugleich wurde deutlich, dass inaktivierte Chlamydien ebenfalls eine LBP-Freisetzung hervorriefen, was als Antwort auf die LPS-tragenden Zellwandbestandteile, wie sie in ‚beschnittener‘ Art auch bei *P. acanthamoebae* vorkommen, zu deuten ist. Vor diesem Hintergrund kann von einer geringgradig ausgeprägten, unspezifischen Reaktion gegenüber diesen Bestandteilen, wie sie auch in dem inaktivierten Inokulum vorkommen können, ausgegangen werden. Darauf lässt der Verlauf des klinischen Gesamtscores der Kontrollgruppe (inaktivierte 10^8 EBE *P. acanthamoebae*/Kalb) schließen.

Die Serum-Lactoferrin (Lf)-Konzentration, die sich bei einem infektiösem Geschehen generell deutlich erhöht darstellt, zeigte im Fall des *Parachlamydia*-Infektionsmodells keine signifikanten Unterschiede im interindividuellen Vergleich, jedoch waren intraindividuelle Erhöhungen in allen Gruppen nach Inokulation zu verzeichnen. Sowohl die Tiere der mit 10^8 EBE als auch die der mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierte Gruppe zeigten signifikant erhöhte Serum-Lf-Konzentrationen 2-3 Tage p. i. verglichen mit den jeweiligen Ausgangswerten a. i. (baseline). Diesem Trend folgten ebenso die Serum-Lf-Konzentrationen der mit inaktivierten 10^8 EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten Tiere. Dieser Umstand kann wiederum auf das Vorhandensein von parachlamydialem LPS in allen Inokulationsdosen zurückzuführen sein. Da die Lf-Ausschüttung durch neutrophile Granulozyten nach LPS-Kontakt erfolgt, ist diese somit von der lokalen LPS-Konzentration abhängig. Die antimikrobielle Wirkung basiert auf der Bindung lokaler Eisen-Ionen oder direkter LPS-Bindung (Vogel, 2012). Eine mit zunehmender Inokulationsdosis steigende Neutrophilenfraktion ohne entsprechenden Lf-Anstieg lässt jedoch eine direkte Abhängigkeit des Lf von anderen LPS bindenden Proteine, wie z. B. dem LBP vermuten (Elass-Rochard *et al.*, 1998).

Die Erhöhung des Gehalts an neutrophilen Granulozyten in der BALF zum Zeitpunkt der akuten Entzündungsphase steht in Übereinstimmung mit dem Bild der Histologie der Lungenläsionen, vor allem bei den Tieren, die mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokuliert waren (TV 1: Table 2, Figure 5). Wider Erwarten zeigte der Gesamtproteingehalt im BALF-Überstand nach *Parachlamydia*-Exposition keine signifikante Erhöhung, wie es (neben dem

Neutrophileninflux) kennzeichnend für eine ausgeprägte pulmonale Entzündungsreaktion auf die LPS-Präsenz gewesen wäre (Thacker, 2006). Dementsprechend war, abgesehen von einer Erhöhung der 15-HETE-Konzentration im BALF-Überstand der mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten Tieren, auch keine weitere Veränderung der gemessenen Eicosanoidkonzentrationen im BALF-Überstand nach *Parachlamydia*-Inokulation zu verzeichnen (TV 1: Figure 3.). Ein Zusammenhang zwischen der Konzentrationserhöhung dieser lokalen Entzündungsmarker, die als Folgeprodukte nach Aktivierung der Cyclooxygenase-medierten Arachidonsäurekaskade auftreten, und *Chlamydia* spp.-Infektion konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden (Fukuda *et al.*, 2005; Jaeger *et al.*, 2007; Reinhold *et al.*, 2012; Stephens, 2003). Vergleichbare Daten zur BALF-Zytologie und zu Entzündungsmarkern im BALF-Überstand liegen lediglich für experimentelle *C. psittaci*- und *M. haemolytica*-Infektion beim Kalb vor. Der ausgeprägten, klinischen Manifestation folgend, korrelieren diese dabei mit der Schwere und dem akuten Charakter der induzierten, pulmonalen Entzündungsreaktion (Reinhold *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 1985). Davon abgesehen kommt der verdünnende Effekt der bronchoalveolären Lavage (120 ml 0,9% NaCl-Lösung) und das variierende Rückgewinnungsvolumen ($66,7 \pm 6,5\%$, Mittelwert \pm Standardabweichung) hinzu, die Einfluss auf die Nachweismengen der Entzündungsmarker-Proteine (ng/ml), jedoch weniger auf die relativen Fraktionen der Zellpopulationen haben.

Zusammenfassend sprechen die Veränderungen und die Kinetik der untersuchten, labor-diagnostischen Parameter für eine lokale und systemische Auseinandersetzung des Organismus mit den intrabronchial inokulierten Parachlamydien in einem geringgradigen Umfang. Eine signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung im Sinne einer Immunantwort konnte lediglich für die Serum-LBP-Konzentration und die Komposition der BALF-Zellpopulation nachgewiesen werden.

3.2.4 Parameter der arteriellen Blutgase und Hämoximetrie

Die Wirkung von *Parachlamydia* auf die durch die arteriellen Blutgase charakterisierte Effizienz des pulmonalen Gasaustauschs zeigte ebenso eine deutliche Abhängigkeit von der Inokulationsdosis. Eine Reduktion des p_aO_2 konnte nur bei den Tieren, die mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten worden waren, über die ersten beiden Tage p. i. beobachtet werden (TV 2: Figure 1A). Der gleichzeitige Abfall der Oxyhämoglobinkonzentration und der O_2 -Sättigung kann als direkte Folge des verringerten p_aO_2 angesehen werden, dessen Ursache vor allem in einer Zunahme der zu überwindenden Diffusionsstrecke der Atemgase zu suchen ist (TV 2: Table 1). Nach Erregerinokulation und lokaler Entzündungsinduktion migrierten Immunzellen (vornehmlich neutrophile Granulozyten) in das pulmonale Interstitium und verdickten somit die alveolokapilläre Membran. Die gegenüber dem CO_2 nachteiligen Diffusionseigenschaften von O_2 spiegeln sich bei der verminderten pulmonalen Diffusionskapazität schließlich in einem reduzierten p_aO_2 wider (Forster, 1957).

Der $p_a\text{CO}_2$ hingegen zeigte keine Veränderung, was (neben den vorteilhaften Diffusionseigenschaften) der erhöhten Atmungsfrequenz und der dadurch bedingten Hyperventilation geschuldet war. Der Zustand einer absoluten Hypoxämie ($p_a\text{O}_2 < 11,0$ kPa; Reinhold & Höchel, 2005) wurde dennoch zu keinem Zeitpunkt erreicht. Im Gegensatz zur mit schwerer Dyspnoe einhergehenden EBP beim Kalb oder einer fulminanten *C. psittaci*-Pneumonie waren die Abweichungen der arteriellen Blutgasparameter nach Inokulation von 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb lediglich geringgradig ausgeprägt (Ostermann *et al.*, 2013; Soltesova *et al.*, 2015). Unter Berücksichtigung der aufgetretenen respiratorischen Symptome ist von einer merklichen Veränderung der arteriellen Blutgasparameter erst nach profunden Störungen der äußeren Atmung und einer entsprechend stark ausgeprägten Dyspnoe auszugehen (Strie *et al.*, 1997), wie sie so im vorliegenden Versuch jedoch zu keinem Zeitpunkt zur Geltung kamen. Nichtsdestotrotz ist das Vorhandensein einer Hypoxämie im arteriellen Blut bei geringgradiger Dyspnoe ein wichtiger Indikator für eine pulmonale Dysfunktion. Indirekt kann durch das Ausmaß der Reduktion des $p_a\text{O}_2$ auf den Umfang des betroffenen Lungenparenchyms geschlossen werden (Ellis *et al.*, 2013). In unserem Modell korrelierte nach intrabronchialer Inokulation von 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb die Ausdehnung der Lungenläsionen in Relation zum gesamten Organvolumen (6,6%; TV 1: Table 3) zeitlich (1 bis 2 Tage p. i.) und im Ausmaß mit der Reduktion des $p_a\text{O}_2$ (6,41%; TV 2: Figure 1A). Abgesehen vom geringen Umfang dieser makroskopisch evaluierten Bereiche mit vermeintlicher Beeinträchtigung von alveolärer Ventilation und vorhandener Diffusionsbarriere, kommen sowohl pulmonale als auch hämodynamische Kompensationsmechanismen infrage, die für eine Aufrechterhaltung des Gasaustauschs verantwortlich sind. Zum einen trägt eine reflektorische Erhöhung des Atem- und Herzminutenvolumens dazu bei, dass Lungenbereiche rekrutiert werden, die zuvor wenig am Gasaustausch beteiligt waren und dass O_2 -bindungsfreudiges Hämoglobin zur Verfügung steht. Zum anderen bedingt die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion die Regulation der Perfusionsverhältnisse von Bereichen alveolärer Hypoventilation zugunsten besser ventilierter Lungenbezirke. Die Effizienz dieser Kompensationsmechanismen gewährleistet unter Ruhebedingungen die Aufrechterhaltung der O_2 -Versorgung des Gesamtorganismus trotz möglicherweise vorhandener, respiratorischer Insuffizienz (Reinhold, 1997).

Alle weiteren Abweichungen in den hämoximetrischen Parametern (z. B. Hämatokrit und Gesamthämoglobinkonzentration \uparrow) der mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten Kälber lassen sich durch die Beeinträchtigung des Allgemeinzustands und der damit zusammenhängenden Hämokonzentration durch reduzierte Flüssigkeitsaufnahme erklären. Abgesehen davon traten retroperitoneale Blutungen durch die invasive Implantation des arteriellen Katheters in die *Aorta abdominalis* auf, wodurch ebenso Abweichungen im Hämatokrit und in der Gesamthämoglobinkonzentration des Blutes der Kontrollkälber begründet sein können.

3.2.5 Differenzierende Lungenfunktionsdiagnostik

Die Induktion einer respiratorischen Dysfunktion, nachgewiesen durch eine signifikante Reduktion des p_aO_2 , war ausschließlich durch die Inokulationsdosis von 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb möglich. Dementsprechend erfolgte eine differenzierende Evaluierung der Lungenfunktion nur an Kälbern, die mit dieser *Parachlamydia*-Dosis inokuliert wurden. Da eine Signifikanz der relativen Verringerung des p_aO_2 ausschließlich für die ersten beiden Tage p. i. vorlag, war anzunehmen, dass sich die dafür ursächlichen, lungenfunktionellen Störungen im selben Zeitraum manifestieren. Neben der Erfassung der gängigen spirometrischen Daten ermöglicht das zur Anwendung gekommenen Messsystem (IOS) eine funktionelle Differenzierung der Atmungsmechanik zwischen Atemwegswiderstand (R_{rs}) und thoracopulmonaler Compliance (X_{rs}) als mögliche Ursache auftretender Ventilationsstörungen. Eine ausgeprägte Ventilationsstörung hätte neben einer Hypoxämie unweigerlich eine Hyperkapnie zur Folge, welche im vorliegenden Fall jedoch zu keinem Zeitpunkt detektierbar war. Das bedeutet, dass das Ausmaß der minderventilierten Bereiche generell als gering anzusehen ist und in etwa mit dem des makroskopisch veränderten Lungengewebes gleichgesetzt werden kann. Dafür sprechen zudem die pathohistologischen Befunde (TV 1).

Im konsolidierten Lungenparenchym wiesen terminale Bronchien und Alveolen eine Füllung mit entzündlichem Exsudat und Fibrin auf. Der entzündungsbedingte, interstitielle Neutrophileninflux führt außerdem zu einer Zunahme der Stärke der alveolokapillären Membran. Diese Ansammlung von Flüssigkeit, Zellen und Zelldebris in den tiefen Atemwegen bedingte eine Vergrößerung der für die Atemgase zu überbrückenden Diffusionsstrecke. Die damit zugleich einhergehende Verlegung der Atemwege verhindert die Ventilation dieser Bronchialabschnitte und der nachgeschalteten Alveolarbereiche. All die aufgeführten Zustände führen im Endeffekt dazu, dass der alveoloarterielle O_2 -Transfer behindert wird und ein physiologischer p_aO_2 nicht aufrechterhalten werden kann. Die bereits erwähnten, besseren Diffusionseigenschaften von CO_2 gegenüber O_2 und eine funktionierende pulmonale Ventilation erlauben hingegen eine ungestörte CO_2 -Abatmung. Dementsprechend unverändert fielen der damit in direktem Zusammenhang stehende p_aCO_2 sowie die capnometrischen Befunde aus (z. B. V_d/V_t , $ETCO_2$; TV 2: Table S2). Ähnliche Befunde würden eine Störung der pulmonalen Perfusion charakterisieren, deren Vorliegen jedoch durch den fehlenden Nachweis von infarziertem bzw. atelektatischem Lungenparenchym *post mortem* weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Anpassungen in Atmungsmuster, Distribution und Perfusion bilden die kompensatorischen Mechanismen zum Ausgleich einer auftretenden Minderventilation um das alveoläre Gasgemisch zu optimieren (Reinhold, 1997). Vor allem der reflektorische Anstieg der Atmungsfrequenz war maßgeblich für die Erhöhung von V_{min}/MBW und somit entscheidend für die Kompensation der möglicherweise weniger ventilierten Lungenareale. Wie jedoch die initial erhöhte V'_{spec} und die zeitgleich unveränderte $V'O_2$ zeigt, konnte auch die vermehrte Atemarbeit zu keiner Erhöhung der Oxygenierung des arteriellen Blutes innerhalb der ersten

beiden Tagen p. i. beitragen. Im weiteren Verlauf erhöhte sich $V'O_2$ zur Deckung des metabolischen Bedarfs aufgrund der Regeneration des entzündlich veränderten Lungengewebes (TV 2: Figure 3C).

Über die betroffenen Lungenbereiche hinausreichende Atemwegsobstruktionen konnte durch eine im Vergleich zu den baseline Daten sogar reduzierte $R_{rs\ 5Hz}/BW$ ausgeschlossen werden. Kälber mit latenter *Chlamydia* spp.-Feldinfektionen einer anderen Studie zeigten ausgeprägte, periphere Atemwegsobstruktionen, die sich im Laufe des langen Untersuchungszeitraums als resident erwiesen und sogar verschlimmerten (Jaeger *et al.*, 2007). Die dafür als Ursache benannte Proliferation des Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes konnte in der eigenen Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Die Reduzierung von $R_{rs\ 5Hz}/BW$ nach *Parachlamydia*-Inokulation entspricht hingegen einer kompensatorischen Bronchodilatation (TV 2: Figure 4A) und ist als Folge der intensivierten Atemarbeit zu sehen, welche durch einen zeitgleichen Anstieg von V_{min}/MBW und V'_{exp} am 3. Tag p. i. gekennzeichnet war (TV 2: Table S2). Die gänzlich unveränderte $X_{rs\ 5Hz}/BW$ ist ein Beleg dafür, dass die induzierte *Parachlamydia*-Infektion ohne Einfluss auf die pulmonale Compliance war. Im Unterschied dazu zeigten Kälber nach *C. psittaci*-Infektion im Zuge des maximalen Ausmaßes der induzierten Erkrankung neben der ebenso vorherrschenden Diffusionsstörung und peripherer Atemwegsobstruktion, eine verringerte pulmonale Compliance (Ostermann, 2013).

Im vorliegenden Versuch war es nicht möglich den tatsächlichen Funktionszustand der Atmungsorgane durch eine Korrelation der Impuls-Oszilloresistometriedaten zu den arteriellen Blutgaswerten darzustellen, wie es durch Strie *et al.* (1997) für Kälber mit Erkrankung des respiratorischen Systems beschrieben wurde. Da keine reine Ventilations- und Perfusionsstörungen dokumentiert werden konnten, kommt nach dem Ausschlussprinzip und in Vereinbarung mit den erhobenen, pathologischen Befunden lediglich eine Diffusions- bzw. Distributionsstörung (Ventilation/Diffusions-Mismatch) infrage, deren Ausmaß initial zu einer Verminderung des p_aO_2 führte.

3.3 Biologische Relevanz

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine deutliche Abhängigkeit aller untersuchten Parameter (Read-out Kriterien) von der Vitalität und der Inokulationsdosis von *P. acanthamoebae*. Dabei konnten ausschließlich mit der Dosis von 10^{10} EBE *P. acanthamoebae* pro Kalb apparente, respiratorische Symptome induziert werden. Der Großteil der krankhaften Befunde trat in uniformem Ausmaß und zeitlicher Kongruenz auf. Demensprechend ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass klinische Symptome, Erhöhung der entzündungsspezifischen Parameter und respiratorische Dysfunktion bedingt voneinander eintraten und sich als Folge ein konstantes Bild einer transienten, pulmonalen Entzündungsreaktion abzeichnete. Dass die aufgetretenen klinischen Symptome und die damit einhergehende Lungenpathologie durch die intrabronchiale Inokulation von *P. acanthamoebae* hervorgerufen wurden, kann durch den gleichzeitigen Ausschluss von Co-Infektion als erwiesen angesehen werden. Zudem konnte durch den molekularbiologischen Nachweis von *Parachlamydia*-spezifischer DNA sowie Erregerisolierung durch Co-Kultivierung in Proben des veränderten Lungengewebes während aller Untersuchungszeitpunkte ein kausaler Zusammenhang zwischen der *Parachlamydia*-Infektion und der klinischen Symptomatik, den pathologischen Befunden sowie den funktionellen Störungen gezogen werden. Die Abweichungen der untersuchten Lungenfunktionsparameter im Zeitraum von 1 bis 4 Tage p. i. weisen per se auf eine Störung des respiratorischen Systems der Kälber nach *Parachlamydia*-Inokulation hin, wobei die quantitativen Abweichungen lediglich ein geringgradiges Ausmaß zeigten.

Als Grund für die insgesamt schwach verlaufende Erkrankung sind (im Vergleich zu den *Chlamydiaceae*) fehlende bzw. minderpotente Virulenzfaktoren der Parachlamydien sowie die Immunkompetenz des Wirtes anzuführen. Die vornehmliche Lokalisation von *Parachlamydia* in alveolären, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen bereits zwei Tage p. i. weist auf eine schnelle Eradikation hin, wie sie auch durch eine sich reduzierende Erregerlast bestätigt wurde. Das Ausbleiben einer proinflammatorischen Cytokinantwort nach Makrophagenbesiedelung durch *Parachlamydia* (Greub *et al.*, 2005) ist mit einer abgeschwächten Entzündungsreaktion und den niedrigkonzentrierten Biomarkern (LBP, Lf, Eicosaniode), wie sie im vorliegenden Versuch auftraten, gut zu vereinen.

Die Pathogenität im Sinne einer ‚kumulativen Dissonanz‘ stellt letztendlich das summierte Spektrum aller provozierten Immunantworten dar. Diese werden neben den immunogenen Errergereigenschaften auch durch alle variablen Bedingungen des infizierten Wirts bestimmt (proinflammatorische bzw. suppressive Effektoren), die bei bestehender Imbalance zu dysfunktionellen bzw. ultimativ destruktiven Reaktionen führen (Inglis, 2007). Deutlicher als im bovinen Wirt kam dieser Umstand in den murinen Infektionsmodellen zum Tragen. Auf die möglichen Ursachen zum unterschiedlichen Ausgang einer induzierten *Parachlamydia*-Infektion im Maus- und Kälbermodell wurde bereits im Abschnitt 3.2.1 hingewiesen.

3.4 Prädisponierende Faktoren

Die Frage, ob *P. acanthamoebae* in der Lage ist, durch Monoinfektion im immunkompetenten Wirt (Kalb) eine respiratorische Erkrankung hervorzurufen, war zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Alle, auf die intrabronchiale *Parachlamydia*-Inokulation zurückzuführenden Krankheitssymptome sowie pathologischen Befunde zeigten sich noch innerhalb des Versuchszeitraums (7 bis 14 Tage p. i.) in spontaner Remission. Die direkt in den Respirationstrakt applizierten Inokula stellten eine in Bezug auf ein natürliches Vorkommen hohe Erregerlast dar, welche durch den Wirt deutlich und schnell reduziert wurde. Um diese Umstände in Einklang mit dem *Parachlamydia*-Nachweis in natürlich auftretenden Infektionsgeschehen zu bringen, erscheint die Theorie des opportunistischen Keims sehr naheliegend. Bisher konnte in noch keinem klinischen Fall *Parachlamydia* als singulärer Infektionserreger nachgewiesen, geschweige denn aus entsprechendem Probenmaterial isoliert werden. Meist traten serologische sowie molekularbiologische Hinweise in Verbindung mit Vorerkrankungen oder Begleiterscheinungen verschiedener Ursachen auf (Lamoth & Greub, 2010). All diesen ist gemein, dass sie einen immunsuppressiven Einfluss auf das betroffene Individuum hatten. Wie auch bei den bekannten Erregern atypischer Pneumonien sowie im Fall der multifaktoriell bedingten EBP des Kalbes scheint die Immunkompetenz des Wirtes eine herausragende Rolle im Prozess der Pathogenese einzunehmen. Abgesehen davon sind dynamische Veränderungen der auf den Wirt einwirkenden Umweltbedingungen, wie sie z. B. bei aktiv beatmeten, humanen Intensivpatienten (Greub *et al.*, 2003b) oder ungünstigem Herdenmanagement bei Kälbern (Kaske *et al.*, 2012) vorkommen, von besonderer Bedeutung für die Wirtssensibilität gegenüber fakultativ pathogenen Mikroorganismen. So konnte ein deutlicher Effekt des letztgenannten Faktors auf das Vorkommen und die ökonomischen Folgen chlamydialer Infektionen beim Rind identifiziert werden (Reinhold *et al.*, 2011).

4 Schlussfolgerung und Perspektiven

Mit dieser Studie wurde erstmals die Pathogenität von *P. acanthamoebae* als respiratorisches Agens und die durch es verursachten pathophysiologischen Konsequenzen in der Säugetierlunge anhand eines etablierten Großtiermodells evaluiert. Die intrabronchiale Inokulation von lebenden *P. acanthamoebae* führte dosisabhängig zu klinisch manifesten Symptomen einer Atemwegserkrankung, der eine subakute, fibropurulente Pneumonie zugrunde lag. Der milde Krankheitsverlauf, die moderaten Lungenveränderungen und die dementsprechend in geringem Umfang veränderten Lungenfunktionsparameter lassen den Schluss zu, dass der eingesetzte Erreger nur eine fakultative Pneumopathogenität von geringer Virulenz im bovinen Wirt aufweist. Verglichen mit bekannten respiratorischen Krankheitsbildern (z. B. verursacht durch *Chlamydia* spp. oder *M. haemolytica*) in ähnlichen experimentellen Modellen ist *P. acanthamoebae* mit großer Wahrscheinlichkeit als weitaus weniger pathogen einzuschätzen.

Nichtdestotrotz besteht die zukünftige Herausforderung in der Identifikation möglicher, epidemiologischer Risikofaktoren, um die Wirkung latenter sowie manifester *Parachlamydia*- (Co-)Infektionen in einem größeren Umfang bei Mensch und Tier untersuchen zu können. Abgesehen von respiratorischen Erkrankungen sind dabei vor allem urogenitale Infektionen in Zusammenhang mit abortiven Krankheitsgeschehen zu berücksichtigen. Zudem bedarf es der Einführung von Standardmethoden für die serologische und molekularbiologische Diagnostik um eine repräsentative Prävalenz als Grundlage zur Abschätzung der pathogenen Bedeutung erheben zu können. Darüber hinaus steht nach wie vor der ultimative Nachweis durch Erregerisolierung aus einem nach *Parachlamydia*-Feldinfektion erkrankten Individuum aus.

5 Zusammenfassung

Evaluierung der Pathogenität von *Parachlamydia acanthamoebae* durch experimentell induzierte, respiratorische Infektion im bovinen Wirt

Einleitung

Parachlamydia (P.) acanthamoebae ist ein den Chlamydien verwandtes, ebenso obligat intrazelluläres Bakterium, das seinem Entwicklungszyklus entsprechend in verschiedenen Zuständen vorliegen kann. Natürlicherweise kommt es als Amöben-assoziiertes Endosymbiont vor und hat sich für Mensch und Tier als potentiell pathogen erwiesen. Als möglicher Erreger steht es im Verdacht, neben abortiven urogenitalen Infektionen bei Mensch und Wiederkäuern, an der Ätiologie atypischer Pneumonien beteiligt zu sein. Erste Anzeichen dazu gaben sero-epidemiologische Untersuchungen zur ätiologischen Ursache respiratorischer Infektionen. Durch *In-vitro*-Studien und Infektionsversuche im Mausmodell ergaben sich weitere Hinweise auf eine pneumopathogene Eigenschaft von *P. acanthamoebae*. Nicht zuletzt wegen der vermeintlichen Besiedelung vieler verschiedener Spezies und des ubiquitären Vorkommens wird auf ein zoonotisches Potential hingewiesen.

Ziel

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es ein respiratorisches Infektionsmodell mit *P. acanthamoebae* im bovinen Wirt zu etablieren. Anhand einer experimentellen Infektion des Respirationstraktes von Kälbern mit *P. acanthamoebae* sollte das pneumopathogene Potential dieses Bakteriums evaluiert und die gegebenenfalls induzierten pulmonalen Dysfunktion charakterisiert werden.

Studiendesign und involvierte Tiere

Das Versuchstierkollektiv bestand aus insgesamt 42 männlichen, 3 – 7 Wochen alten, Holstein-Frisian Kälbern. Die respiratorische Challenge erfolgte durch Inokulation von drei verschiedenen *Parachlamydia*-Dosen:

- 10^8 einschlusskörperchenbildende Einheiten (EBE) hitzeinaktivierter *P. acanthamoebae*/Kalb (n=9)
- 10^8 EBE vitaler *P. acanthamoebae*/Kalb (n=12)
- 10^{10} EBE vitaler *P. acanthamoebae*/Kalb (n=21)

Im ersten Teilversuch (TV 1) wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung der drei verschiedenen *P. acanthamoebae*-Inokulationsdosen in der Kälberlung im interindividuellen Vergleich über einen Zeitraum bis 14 Tage *post inoculationem* (dpi) untersucht. Die Read-out-Kriterien zur Evaluierung der systemischen Wirtsantwort berücksichtigten dabei klinische und labor-diagnostische Parameter, deren tägliche Erhebung *in vivo* erfolgte. Eine *Ex-vivo*-Beprobung zur Erfassung der lokalen Entzündungsmechanismen sowie der pathologischen Verände-

rungen erfolgte zu den Zeitpunkten 2, 3, 4, 7, 10 und 14 dpi. Zeitgleich erfolgten Untersuchungen zum direkten Nachweis und zur Rekultivierung von *P. acanthamoebae*.

In TV 2 wurden in einem ersten Abschnitt die Kenngrößen des pulmonalen Gasaustauschs der drei Tiergruppen zur interindividuellen Untersuchung bis 7 dpi erfasst (Study 1). Im zweiten Abschnitt wurden die Auswirkungen der durch 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb induzierten Infektion auf die pulmonalen Funktionen bis 10 dpi untersucht (Study 2). Dazu wurden Parameter der differenzierenden Lungenfunktionsdiagnostik zu den Zeitpunkten 7 und 4 Tage vor Inokulation sowie 2, 3, 4, 7, 8 und 10 dpi intraindividuell als longitudinale Verlaufskontrolle quantifiziert. Während der beiden Teilversuche wurden zum Ausschluss von Co-Infektionen begleitende Analysen zur mikrobiologischen Beurteilung des Atmungsapparates durchgeführt.

Material und Methoden

Die Inokulation eines jeden Kalbes erfolgte intrabronchial mit 6 ml des insgesamt 8 ml umfassenden Inokulums, das die jeweilige *Parachlamydia*-Dosis in Suspension enthielt. Die verbleibenden 2 ml des Inokulums wurden zusätzlich intranasal appliziert.

In TV 1 erfolgte die Evaluierung der systemischen Wirtsantwort anhand des klinischen Gesamtscores, der Blut-Leukozytendifferenzierung sowie der Serumkonzentration der beiden Akute-Phase-Proteine Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP) und Lactoferrin. Die lokalen Entzündungsmechanismen wurden anhand inflammatorischer Marker (Zytologie und Gesamtprotein-/Eicosanoidkonzentration) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) sowie mittels pathologischer und histologischer Untersuchungen charakterisiert. Zur Quantifizierung der Erregerlast im Gewebe sowie der Erregerausscheidung kam ein direkter Erregernachweis durch quantitative real-time PCR zum Einsatz. Darüber hinaus sollte mittels Immunhistologie und amöbialer Co-Kultivierung die Kausalität von Erreger und Wirkung geklärt werden.

In Study 1 des TV 2 wurden die Parameter der arteriellen Blutgase und Hämoximetrie zur Beurteilung herangezogen. Dazu wurde diesen Tieren über einen zuvor implantierten Verweilkatheter in der *Aorta abdominalis* täglich arterielles Blut entnommen und analysiert. In Study 2 des TV 2 wurden ausschließlich die mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten Tiere ($n=9$) nichtinvasiven Lungenfunktionstests (Impuls-Oszilloresistometrie, volumetrische Kapnometrie, Helium-Dilution) unterzogen.

Ergebnisse

Die experimentelle *Parachlamydia*-Infektion resultierte in einer reproduzierbaren Beziehung zwischen Erregerdosis und Wirtsreaktion, welche nur nach Inokulation mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb und bis 5 dpi ein apparentes Ausmaß respiratorischer Symptome induzierte. Der Median des klinischen Gesamtscores der mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten Tiere kulminierte 1 dpi bei 3/49 Punkten und war bis 4 dpi (im Vergleich zu den mit inaktivierten 10^8 EBE und vitalen 10^8 EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierten Gruppen) signifikant erhöht. Die mit einem subklinischen Krankheitsbild einhergehende Chal-

lenge mit 10^8 EBE *P. acanthamoebae*/Kalb mündete, ebenso wie die Inokulation mit dem inaktivierten Erreger aufgrund unspezifischer Symptome, lediglich in einem medianen klinischen Gesamtscore von 1/49 Punkten. Sowohl das Ausmaß der systemischen als auch der lokalen Entzündungsmarker korrelierten mit dem beobachteten Krankheitsverlauf. Dementsprechend zeigte dabei ausschließlich die mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb inokulierte Versuchsgruppe von Signifikanz geprägte Erhöhungen der Serum-LBP-Konzentration sowie in der Zellzahl neutrophiler Granulozyten und der 15-Hydroxyeicosatetraensäure-Konzentration in BALF gegenüber den Kälbern, die mit 10^8 EBE inaktivierten und 10^8 EBE vitalen *P. acanthamoebae*/Kalb inokuliert worden waren. Die pathologischen und histologischen Befunde ergaben eine subakute, fibropurulenten Pneumonie mit deutlichster Ausprägung nach Inokulation von 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb im Zeitraum von 2 – 4 dpi, deren Ausmaß ebenso dem klinischen Bild entsprach. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums traten alle entzündungsbedingten, pulmonalen Veränderungen in spontane Remission. Ein Erregernachweis war in allen mit lebensfähigen Parachlamydien infizierten Gruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum in Atemwegs-assoziierten Gewebe möglich. Die Erregerlast nahm jedoch über die Zeit ab. Eine Erregerausscheidung konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

Die Parameter der arteriellen Blutgase zeigten ausschließlich bei den mit 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb infizierten Kälbern 1 – 2 dpi eine geringgradige Hypoxämie. Die kompensatorisch erhöhte Atemarbeit war durch eine Zunahme von Atemfrequenz, Atemminutenvolumen sowie spezifischer Ventilation 2 – 3 dpi gegenüber der Ausgangswerte vor Inokulation gekennzeichnet. Aufgrund der pathohistologischen Befunde ist von einer O_2 -Diffusionsstörung als Folge der transient verlaufenden, pulmonalen Entzündungsreaktion nach Inokulation von 10^{10} EBE *P. acanthamoebae*/Kalb auszugehen, die zu einer temporären Reduktion des transmembranösen O_2 -Transfers führte.

Schlussfolgerungen

Die als Hauptziel deklarierte Etablierung eines respiratorischen *Parachlamydia*-Infektionsmodells im bovinen Wirt wurde erreicht. Die durch die Umsetzung des Versuchsvorhabens erlangten Ergebnisse leisten einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese sowie der Pathophysiologie von *P. acanthamoebae* in der Säugerylunge. Die daraus abschätzbare Pathogenität in der Kälberlunge ist, verglichen mit anderen chlamydialen Erregern, als gering anzusehen. Es bleibt weiterhin zu klären welche Rolle *Parachlamydia* als opportunistisches Pathogen bei Atemwegserkrankungen sowie im Rahmen der Infektion anderer Organsysteme zukommt.

6 Summary

Evaluation of the pathogenicity of *Parachlamydia acanthamoebae* in an experimentally induced, respiratory infection in the bovine host

Background

Parachlamydia (P.) acanthamoebae is a *Chlamydia*-related bacterium, that exhibits an intracellular lifestyle. Its state of presence is depending on the stage of its developmental cycle. Naturally, it occurs as amoeba associated endocytobiont with a pathogenic potential being hypothesised towards humans as well as animals. Besides urogenital infection leading to miscarriage in humans and ruminants, suspicion was raised about the aetiological involvement of *Parachlamydia* in atypical pneumonia. Seroepidemiologic studies substantiated the parachlamydial engagement in respiratory tract infections, which was finally confirmed by *in vitro* studies and infection trials in a murine model. Not only the colonisation of a vast spectrum of species, but also its ubiquitous dispersal contributes to the assumption of harbouring a zoonotic potential.

Objective

The primary objective of this study was to establish a bovine model of a respiratory *P. acanthamoebae* infection. By this means, the pneumopathogenic potential of *P. acanthamoebae* was to be evaluated after its inoculation with the respiratory tract of calves. Furthermore, the underlying pathophysiology of a possible respiratory dysfunction was to be characterized.

Study design and involved animals

A total of 42 male Holstein-Frisian calves at the age of 3 – 7 weeks were enrolled in this study. The respiratory challenge was performed by inoculation of three different *Parachlamydia* doses:

- 10^8 inclusion-forming units (IFU) of heat inactivated *P. acanthamoebae*/calf (n=9)
- 10^8 IFU of live *P. acanthamoebae*/calf (n=12)
- 10^{10} IFU of live *P. acanthamoebae*/calf (n=21)

For reasons of implementation, the investigation was subdivided into two consecutive trials (TV). In TV 1, the dose-response relationship of three different challenge doses of *P. acanthamoebae* were examined in interindividual comparison over a period of 14 days *post inoculationem* (dpi). The read-out criteria for evaluating the systemic host response comprised clinical and laboratory parameters assessed *in vivo* on a daily basis. *Ex vivo* samplings distinguishing local inflammation and pathology were captured 2, 3, 4, 7, 10, and 14 dpi. Relating to this, pathogen detection and parachlamydial reisolation were purposed.

TV 2 was intended to investigate the host-pathogen interaction on a functional level. Therefore, in a first part the effects of the three different *Parachlamydia* inoculation doses on the calves' pulmonary gas exchange were analyzed and compared interindividually until 7 dpi (Study 1). In the second part, the effect of a parachlamydial challenge of 10^{10} IFU *P. acanthamoebae* /calf on the respiratory system on a functional basis was studied by differential pulmonary function testing (Study 2). The corresponding data were assessed intraindividually in a longitudinal sequence at 7 and 4 days before inoculation as well as 2, 3, 4, 7, 8 and 10 dpi. During both trials, the exclusion of respiratory coinfection was confirmed by microbiological assessment.

Material and methods

The inoculation of each calf was carried out intrabronchial using 6 ml of a total of 8 ml inoculum containing the particular parachlamydial challenge dose. The remaining 2 ml were applied intranasally.

In TV 1, the assessment of the systemic host response comprised the total clinical score (determined by physical examination), white blood cell count and the serum concentrations of the two acute phase reactants lipopolysaccharide binding protein (LBP) and lactoferrin. The local inflammatory reaction was characterized using markers of inflammation (cytology and concentration of total protein and eicosanoids) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) as well as findings of gross pathology and histopathology. Quantitative real-time PCR was employed to detect and quantify the pathogen load and -excretion. Moreover, immunohistochemistry and amoebal coculture were to contribute to prove the causality of pathogen-host reaction.

In Study 1 of TV 2, parameters of the arterial blood gases and haemoximetry were assessed. Therefore, the involved calves received an aortic catheter to facilitate daily collection of arterial blood. In Study 2 of TV 2, only calves (n=9) challenged with 10^{10} IFU *P. acanthamoebae*/calf were subjected to non-invasive pulmonary function testing (impuls-oscillometry, volumetric capnometry and Helium dilution).

Results

The experimental *Parachlamydia* infection resulted in a reproducible, challenge dose-dependent host reaction, which was exhibited in individuals receiving live 10^{10} IFU *P. acanthamoebae*/calf, only. The apparent respiratory illness lasted until 5 dpi. The median of the total clinical score of calves challenged with 10^{10} IFU *P. acanthamoebae*/calf culminated 1 dpi at 3/49 points and was significantly elevated until 4 dpi (compared to the groups inoculated with inactivated or live 10^8 IFU *P. acanthamoebae*/calf). In contrast, individuals receiving 10^8 IFU of live *P. acanthamoebae*/calf were affected subclinically and exhibited, likewise calves challenged with inactive *Parachlamydia*, a median of the total clinical score of 1/49 points due to mild, unspecific symptoms, that resolved instantly. The increase in both systemic and local inflammatory markers correlated well with the observed course of the total clinical score. Accordingly, significance was stated for the calves challenged with 10^{10} IFU

P. acanthamoebae/calf concerning the increase in serum LBP concentration as well as in the neutrophil fraction and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid concentration in BALF compared to the groups inoculated with inactivated or live 10^8 IFU *P. acanthamoebae*/calf. The pathological and histological findings yielded a subacute, fibropurulent pneumonia with the greatest extent in animals exposed to 10^{10} IFU *P. acanthamoebae*/calf each occurring at 2 – 4 dpi. All signs of inflammation as well as pulmonary lesions befell remission until the end of the study. Parachlamydial detection was possible in respiratory tract associated tissues in both, with live inoculum exposed groups at all investigated time points. However, the pathogen load decreased over time indicating its eradication. There was no parachlamydial excretion detectable at any time point.

Only in calves inoculated with 10^{10} IFU *P. acanthamoebae*/calf, the parameters of arterial blood gases indicated a mild hypoxaemia at 1 – 2 dpi. In these calves, an increase in respiratory rate, volume of minute ventilation and specific ventilation compared to baseline values before parachlamydial challenge indicated an increase in breathing effort to compensate for a dysfunctional O_2 diffusion at 2 – 3 dpi. In accordance with these findings as well as pathohistology, a transient, pulmonary inflammation in calves due to inoculation with 10^{10} IFU *P. acanthamoebae*/calf resulted in a temporary decrease of transmembrane O_2 transfer.

Conclusion

The primary objective of establishing a bovine model of a respiratory *P. acanthamoebae* infection was successfully accomplished. The results gained by the implementation advance the understanding of the potential pathogenic role of *P. acanthamoebae* in the bovine host. Furthermore, the intraindividual study type provides insight into the pathogen-host interaction and the pathophysiologic consequences within the bovine lung. Compared to the known chlamydial pathogens, the pathogenicity of *P. acanthamoebae* towards the bovine respiratory system seems to be limited. However, it still remains unclear which importance is attached to *Parachlamydia* in terms of being an opportunistic respiratory (co)pathogen and of infecting other organ systems.

7 Literaturverzeichnis

- Amann, R., Springer, N., Schönhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E.N., Muller, K.D., Michel, R., 1997. Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. *Appl Environ Microbiol* 63, 115-121.
- Angen, Ø., Thomsen, J., Larsen, L.E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P.M.H., Enemark, J.M.D., 2009. Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet Microbiol* 137, 165-171.
- Ballard-Croft, C., Wang, D., Sumpter, L.R., Zhou, X., Zwischenberger, J.B., 2012. Large-animal models of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Ann Thorac Surg* 93, 1331-1339.
- Barkallah, M., Gharbi, Y., Hassena, A.B., Slima, A.B., Mallek, Z., Gautier, M., Greub, G., Gdoura, R., Fendri, I., 2014. Survey of infectious etiologies of bovine abortion during mid- to late gestation in dairy herds. *PLoS One* 9, e91549.
- Baud, D., Greub, G., 2011. Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. *Clin Microbiol Infect* 17, 1312-1322.
- Baud, D., Kebbi, C., Kulling, J.P., Greub, G., 2009. Seroprevalence of different *Chlamydia*-like organisms in an asymptomatic population. *Clin Microbiol Infect* 15, 213-215.
- Birtles, R.J., Rowbotham, T.J., Storey, C., Marrie, T.J., Raoult, D., 1997. *Chlamydia*-like obligate parasite of free-living amoebae. *Lancet* 349, 925-926.
- Blumer, S., Greub, G., Waldvogel, A., Hassig, M., Thoma, R., Tschuor, A., Pospischil, A., Borel, N., 2011. *Waddlia*, *Parachlamydia* and *Chlamydiaceae* in bovine abortion. *Vet Microbiol* 152, 385-393.
- Borel, N., Pospischil, A., Greub, G., 2010. *Parachlamydia acanthamoebae* and its zoonotic risk. *Clin Microbiol Newsletter* 32, 185-191.
- Borel, N., Ruhl, S., Casson, N., Kaiser, C., Pospischil, A., Greub, G., 2007. *Parachlamydia* spp. and related *Chlamydia*-like organisms and bovine abortion. *Emer Infect Dis* 13, 1904-1907.
- Bousbia, S., Papazian, L., Saux, P., Forel, J.-M., Auffray, J.-P., Martin, C., Raoult, D., La Scola, B., 2013. Serologic prevalence of amoeba-associated microorganisms in intensive care unit pneumonia patients. *PLoS One* 8, e58111.
- Brindley, N., Matin, A., Khan, N.A., 2009. *Acanthamoeba castellanii*: High antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. *Exp Parasitol* 121, 254-256.
- Bureau, F., Dettileux, J., Dorts, T., Uystepuyst, C., Coghe, J., Leroy, P.L., Lekeux, P., 2001. Spirometric performance in Belgian Blue calves: I. Effects on economic losses due to the bovine respiratory disease complex. *J Anim Sci* 79, 1301-1304.

- Casson, N., Entenza, J.M., Borel, N., Pospischil, A., Greub, G., 2008a. Murine model of pneumonia caused by *Parachlamydia acanthamoebae*. *Microb Pathog* 45, 92-97.
- Casson, N., Entenza, J.M., Greub, G., 2007. Serological cross-reactivity between different *Chlamydia*-like organisms. *J Clin Microbiol* 45, 234-236.
- Casson, N., Greub, G., 2006. Resistance of different *Chlamydia*-like organisms to quinolones and mutations in the quinoline resistance-determining region of the DNA gyrase A- and topoisomerase-encoding genes. *Int J Antimicrob Agents* 27, 541-544.
- Casson, N., Medico, N., Bille, J., Greub, G., 2006. *Parachlamydia acanthamoebae* enters and multiplies within pneumocytes and lung fibroblasts. *Microbes Infect* 8, 1294-1300.
- Casson, N., Posfay-Barbe, K.M., Gervaix, A., Greub, G., 2008b. New diagnostic real-time PCR for specific detection of *Parachlamydia acanthamoebae* DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* 46, 1491-1493.
- Castleman, W.L., Lay, J.C., 1990. Morphometric and ultrastructural study of postnatal lung growth and development in calves. *Am J Vet Res* 51, 789-795.
- Caswell, J.L., Archambault, M., 2007. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. *Anim Health Res Rev* 8, 161-186.
- Caswell, J.L., Williams, K.J., 2015. Respiratory system, In: Maxie, M.G. (Ed.) *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Vol. 2, 6th ed., Elsevier Saunders, St. Louis, USA.
- Chappell, C.L., Wright, J.A., Coletta, M., Newsome, A.L., 2001. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 724-730.
- Cilloniz, C., Ewig, S., Polverino, E., Marcos, M.A., Esquinas, C., Gabarrus, A., Mensa, J., Torres, A., 2011. Microbial aetiology of community-acquired pneumonia and its relation to severity. *Thorax* 66, 340-346.
- Cilloniz, C., Ewig, S., Polverino, E., Marcos, M.A., Prina, E., Sellares, J., Ferrer, M., Ortega, M., Gabarrus, A., Mensa, J., Torres, A., 2012. Community-acquired pneumonia in outpatients: aetiology and outcomes. *Eur Respir J* 40, 931-938.
- Collingro, A., Poppert, S., Heinz, E., Schmitz-Esser, S., Essig, A., Schweikert, M., Wagner, M., Horn, M., 2005. Recovery of an environmental *Chlamydia* strain from activated sludge by co-cultivation with *Acanthamoeba* sp. *Microbiology* 151, 301-309.
- Collingro, A., Tischler, P., Weinmaier, T., Penz, T., Heinz, E., Brunham, R.C., Read, T.D., Bavoil, P.M., Sachse, K., Kahane, S., Friedman, M.G., Rattei, T., Myers, G.S., Horn, M., 2011. Unity in variety--the pan-genome of the Chlamydiae. *Mol Biol Evol* 28, 3253-3270.

- Coulon, C., Eterpi, M., Greub, G., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V., 2012. Amoebal host range, host-free survival and disinfection susceptibility of environmental *Chlamydiae* as compared to *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64, 364-373.
- Croxatto, A., Murset, V., Chassot, B., Greub, G., 2013. Early expression of the type III secretion system of *Parachlamydia acanthamoebae* during a replicative cycle within its natural host cell *Acanthamoeba castellanii*. *Pathog Dis* 69, 159-175.
- Elass-Rochard, E., Legrand, D., Salmon, V., Roseanu, A., Trif, M., Tobias, P.S., Mazurier, J., Spik, G., 1998. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the Lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 66, 486-491.
- Ellis, J., Waldner, C., Gow, S., Jackson, M., 2013. Relationship of the extent of pulmonary lesions to the partial pressure of oxygen and the lactate concentration in arterial blood in calves experimentally infected with bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res* 77, 205-210.
- Elmer, S., 1999. Auswirkungen der Umgebungstemperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit auf den Organismus des Kalbes. Dissertation. Universität Leipzig.
- Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A., 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 2, 415-440.
- Forster, R.E., 1957. Exchange of gases between alveolar air and pulmonary capillary blood: pulmonary diffusing capacity. *Physiol Rev* 37, 391-452.
- Fredericks, D.N., Relman, D.A., 1996. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev* 9, 18-33.
- Fritsche, T.R., Horn, M., Wagner, M., Herwig, R.P., Schleifer, K.H., Gautom, R.K., 2000. Phylogenetic diversity among geographically dispersed *Chlamydiales* endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 66, 2613-2619.
- Fukuda, E.Y., Lad, S.P., Mikolon, D.P., Iacobelli-Martinez, M., Li, E., 2005. Activation of lipid metabolism contributes to Interleukin-8 production during *Chlamydia trachomatis* infection of cervical epithelial cells. *Infect Immun* 73, 4017-4024.
- Gershwin, L.J., Van Eenennaam, A.L., Anderson, M.L., McEligot, H.A., Shao, M.X., Toaff-Rosenstein, R., Taylor, J.F., Neibergs, H.L., Womack, J., Bovine Respiratory Disease Complex Coordinated Agricultural Project Research, T., 2015. Single pathogen challenge with agents of the Bovine respiratory disease complex. *PLoS ONE* 10, e0142479.

- Greub, G., 2009. *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia. Clin Microbiol Infect 15, 18-28.
- Greub, G., Berger, P., Papazian, L., Raoult, D., 2003a. *Parachlamydiaceae* as rare agents of pneumonia. Emerg Infect Dis 9, 755-756.
- Greub, G., Boyadjiev, I., La Scola, B., Raoult, D., Martin, C., 2003b. Serological hint suggesting that *Parachlamydiaceae* are agents of pneumonia in polytraumatized intensive care patients. Ann N Y Acad Sci 990, 311-319.
- Greub, G., Desnues, B., Raoult, D., Mege, J.L., 2005. Lack of microbicidal response in human macrophages infected with *Parachlamydia acanthamoebae*. Microbes Infect 7, 714-719.
- Greub, G., La Scola, B., Raoult, D., 2003c. *Parachlamydia acanthamoeba* is endosymbiotic or lytic for *Acanthamoeba polyphaga* depending on the incubation temperature. Ann N Y Acad Sci 990, 628-634.
- Greub, G., Mege, J.L., Raoult, D., 2003d. *Parachlamydia acanthamoebae* enters and multiplies within human macrophages and induces their apoptosis. Infect Immun 71, 5979-5985.
- Greub, G., Raoult, D., 2002. Crescent bodies of *Parachlamydia acanthamoeba* and its life cycle within *Acanthamoeba polyphaga*: an electron micrograph study. Appl Environ Microbiol 68, 3076-3084.
- Grissett, G.P., White, B.J., Larson, R.L., 2015. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing Bovine respiratory disease complex. J Vet Intern Med 29, 770-780.
- Gustin, P., Bakima, M., Art, T., Lekeux, P., Lomba, F., van de Woestijne, K.P., 1988. Pulmonary function values and growth in Belgian white and blue double-muscling cattle. Res Vet Sci 45, 405-410.
- Haider, S., Collingro, A., Walochnik, J., Wagner, M., Horn, M., 2008. *Chlamydia*-like bacteria in respiratory samples of community-acquired pneumonia patients. FEMS Microbiol Lett 281, 198-202.
- Hanzlicek, G.A., White, B.J., Mosier, D., Renter, D.G., Anderson, D.E., 2010. Serial evaluation of physiologic, pathological, and behavioral changes related to disease progression of experimentally induced *Mannheimia haemolytica* pneumonia in postweaned calves. Am J Vet Res 71, 359-369.
- Hayashi, Y., Nakamura, S., Matsuo, J., Fukumoto, T., Yoshida, M., Takahashi, K., Mizutani, Y., Yao, T., Yamaguchi, H., 2010. Host range of obligate intracellular bacterium *Parachlamydia acanthamoebae*. Microbiol Immunol 54, 707-713.
- Höchel, P., 2004. Auswirkungen motorischer Belastungen auf den Atemgasaustausch bei klinisch gesunden und respiratorisch erkrankten Kälbern. Dissertation. Freie Universität Berlin.

- Horn, M., 2008. Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* 62, 113-131.
- Horn, M., Collingro, A., Schmitz-Esser, S., Beier, C.L., Purkhold, U., Fartmann, B., Brandt, P., Nyakatura, G.J., Droege, M., Frishman, D., Rattei, T., Mewes, H.-W., Wagner, M., 2004. Illuminating the evolutionary history of Chlamydiae. *Science* 304, 728-730.
- Inglis, T.J.J., 2007. Principia ætiologica: taking causality beyond Koch's postulates. *J Med Microbiol* 56, 1419-1422.
- Jacquier, N., Aeby, S., Lienard, J., Greub, G., 2013. Discovery of new intracellular pathogens by amoebal coculture and amoebal enrichment approaches. *J Vis Exp*, e51055.
- Jaeger, J., Liebler-Tenorio, E., Kirschvink, N., Sachse, K., Reinhold, P., 2007. A clinically silent respiratory infection with *Chlamydophila* spp. in calves is associated with airway obstruction and pulmonary inflammation. *Vet Res* 38, 711-728.
- Jäger, J., 2006. Bewertung von Chlamydien-assoziierten Veränderungen der Lungenfunktion bei Kalb und Schwein mittels Impuls-Oszillometrie und der Software FAMOS. Dissertation. Freie Universität Berlin.
- Kaske, M., Kunz, H.J., Reinhold, P., 2012. Die Enzootische Bronchopneumonie des Kalbes – ein Update. *Prakt Tierarzt* 93, 232-245.
- Kirschvink, N., Reinhold, P., 2008. Use of alternative animals as asthma models. *Current Drug Targets* 9, 470-484.
- Kneucker, A., 2009. Funktionelle Residualkapazität und Diffusionskapazität der Lunge bei Kalb und Schwein: Physiologische Werte und Einfluss respiratorischer Infektionen. Dissertation. Freie Universität Berlin.
- Lambertz, J., 2011. Untersuchung zur Pathologie und Pathogenese der experimentellen aerogenen Infektion von Kälbern mit *Chlamydia psittaci* (nicht aviärer Herkunft). Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover,
- Lamoth, F., Greub, G., 2010. Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. *FEMS Microbiol Rev* 34, 260-280.
- Lekeux, P., Hajer, R., Breukink, H.J., 1984. Effect of somatic growth on pulmonary function values in healthy Friesian cattle. *Am J Vet Res* 45, 2003-2007.
- Lewis, M.D., Dutkiewicz, J., Sorenson, W.G., Mamolen, M., Hall, J.E., 1990. Microbiological and serological studies of an outbreak of 'humidifier fever' in a print shop. *Biodeterioration Res* 3, 467-477.
- Lienard, J., Croxatto, A., Aeby, S., Jatou, K., Posfay-Barbe, K., Gervaix, A., Greub, G., 2011. Development of a new *Chlamydiales*-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *J Clin Microbiol* 49, 2637-2642.
- Marrie, T.J., Peeling, R.W., Fine, M.J., Singer, D.E., Coley, C.M., Kapoor, W.N., 1996. Ambulatory patients with community-acquired pneumonia: the frequency of atypical agents and clinical course. *Am J Med* 101, 508-515.

- Marrie, T.J., Raoult, D., La Scola, B., Birtles, R.J., de Carolis, E., 2001. *Legionella*-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. *Emerg Infect Dis* 7, 1026-1029.
- Maurin, M., Bryskier, A., Raoult, D., 2002. Antibiotic susceptibilities of *Parachlamydia acanthamoeba* in amoebae. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3065-3067.
- McLaughlin, R.F., Tyler, W.S., Canada, R.O., 1961. A study of the subgross pulmonary anatomy in various mammals. *Am J Anat* 108, 149-165.
- Michel, R., 2011. Umweltchlamydien mit medizinischer Bedeutung. *Dtsch Med Wochenschr* 136, 2100-2105.
- Michel, R., Hauröderphilippczyk, B., Müller, K.D., Weishaar, I., 1994. *Acanthamoeba* from human nasal mucosa infected with an obligate intracellular parasite. *Eur J Protistol* 30, 104-110.
- Nagy, O., Kovac, G., Seidel, H., Paulikova, I., 2002. Selection of arteries for blood sampling and evaluation of blood gases and acid-base balance in cattle. *Acta Vet Brno* 71, 289-296.
- Offinger, J., Fischer, J., Rehage, J., Meyer, H., 2011. Percutaneous, ultrasonographically guided technique of catheterization of the abdominal aorta in calves for serial blood sampling and continuous arterial blood pressure measurement. *Res Vet Sci* 90, 521-525.
- Ostermann, C., 2013. Evaluation and pathophysiological characterisation of a bovine model of respiratory *Chlamydia psittaci* infection. PhD Thesis. Freie Universität Berlin.
- Ostermann, C., Linde, S., Siegling-Vlitakis, C., Reinhold, P., 2014. Evaluation of pulmonary dysfunctions and acid-base imbalances induced by *Chlamydia psittaci* in a bovine model of respiratory infection. *Multidiscip Respir Med* 9, 10.
- Ostermann, C., Schroedl, W., Schubert, E., Sachse, K., Reinhold, P., 2013. Dose-dependent effects of *Chlamydia psittaci* infection on pulmonary gas exchange, innate immunity and acute-phase reaction in a bovine respiratory model. *Vet J* 196, 351-359.
- Pilloux, L., Aeby, S., Gaumann, R., Burri, C., Beuret, C., Greub, G., 2015a. The high prevalence and diversity of *Chlamydiales* DNA within *Ixodes ricinus* ticks suggest a role for ticks as reservoirs and vectors of *Chlamydia*-related bacteria. *Appl Environ Microbiol* 81, 8177-8182.
- Pilloux, L., Casson, N., Sommer, K., Klos, A., Stehle, J.C., Pusztaszeri, M., Greub, G., 2015b. Severe pneumonia due to *Parachlamydia acanthamoebae* following intranasal inoculation: a mice model. *Microbes Infect.*
- Potgieter, L.N., McCracken, M.D., Hopkins, F.M., Walker, R.D., Guy, J.S., 1984. Use of fiberoptic bronchoscopy in experimental production of bovine respiratory tract disease. *Am J Vet Res* 45, 1015-1019.

- Prohl, A., Schroedl, W., Rhode, H., Reinhold, P., 2015. Acute phase proteins as local biomarkers of respiratory infection in calves. *BMC Vet Res* 11.
- Rasmussen, S.J., Eckmann, L., Quayle, A.J., Shen, L., Zhang, Y.X., Anderson, D.J., Fierer, J., Stephens, R.S., Kagnoff, M.F., 1997. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest* 99, 77-87.
- Reeve-Johnson, L., 2001. Relationships between clinical and pathological signs of disease in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* type A1. *Vet Rec* 149, 549-552.
- Reinhold, P., 1997. Grundlagen und Besonderheiten der Lungenfunktion beim Rind. *Tierärztl Umsch* 52, 584-592.
- Reinhold, P., 2007. Struktur und Funktion der sich entwickelnden bovinen Lunge. *Pneumologie* 61, 482-483.
- Reinhold, P., Födisch, G., 1993. Lungenfunktionsdiagnostik bei gesunden und an Pneumonie erkrankten Kälbern. *Monatsh Veterinärmed* 48, 113-117.
- Reinhold, P., Höchel, P., 2005. Pathophysiologische Reaktionen des pulmonalen Kreislaufsystems auf Atemwegs- und Lungenerkrankungen. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 118, 52-66.
- Reinhold, P., Jaeger, J., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Bachmann, R., Schubert, E., Melzer, F., Elschner, M., Sachse, K., 2008. Impact of latent infections with *Chlamydophila* species in young cattle. *Vet J* 175, 202-211.
- Reinhold, P., Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Vogel, A., Lambertz, J., Rothe, M., Ruttger, A., Schubert, E., Sachse, K., 2012. A bovine model of respiratory *Chlamydia psittaci* infection: challenge dose titration. *PLoS One* 7, e30125.
- Reinhold, P., Rabeling, B., Günther, H., Schimmel, D., 2002. Comparative evaluation of ultrasonography and lung function testing with the clinical signs and pathology of calves inoculated experimentally with *Pasteurella multocida*. *Vet Rec* 150, 109-114.
- Reinhold, P., Reissig, S., Jaeger, J., Langenberg, A., Smith, H.J., 2007. Capnovolumetry is a useful technique to detect peripheral airway obstruction [abstract]. *Eur Respir J* 58 (Suppl 51), 233.
- Reinhold, P., Sachse, K., Kaltenboeck, B., 2011. *Chlamydiaceae* in cattle: commensals, trigger organisms, or pathogens? *Vet J* 189, 257-267.
- Reinhold, P., Smith, H.J., Close, R., Genicot, B., Lekeux, P., 1998a. Validation of impulse oscillometry in Friesian and Blue Belgian calves with respect to changes in extrathoracic upper airway resistance. *Res Vet Sci* 65, 93-101.
- Reinhold, P., Smith, H.J., Langenberg, A., Lekeux, P., 1998b. Measurement of respiratory impedance in healthy calves using the impulse oscillation technique--physiological and methodological aspects. *Vet J* 155, 27-38.

- Reissig, S., 2008. Validierung der volumetrischen Kapnographie zur Erfassung klinisch inapparenter Lungenfunktionsstörungen beim Kalb. Dissertation. Freie Universität Berlin.
- Robinson, N.E., 2012. Respiratory Function, In: Klein, B.G. (Eds.) Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology. 5th ed., Elsevier Saunders, St. Louis, USA.
- Rowbotham, T.J., 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol 33, 1179-1183.
- Ruhl, S., Casson, N., Kaiser, C., Thoma, R., Pospischil, A., Greub, G., Borel, N., 2009. Evidence for *Parachlamydia* in bovine abortion. Vet Microbiol 135, 169-174.
- Ruhl, S., Goy, G., Casson, N., Thoma, R., Pospischil, A., Greub, G., Borel, N., 2008. *Parachlamydia acanthamoebae* infection and abortion in small ruminants. Emer Infect Dis 14, 1966-1968.
- Rusconi, B., Greub, G., 2013. Discovery of catalases in members of the *Chlamydiales* order. J Bacteriol 195, 3543-3551.
- Rusconi, B., Lienard, J., Aeby, S., Croxatto, A., Bertelli, C., Greub, G., 2013. Crescent and star shapes of members of the *Chlamydiales* order: impact of fixative methods. Antonie van Leeuwenhoek 104, 521-532.
- Schäfer, M., Paentzer, S., Uhlig, A., 1992. Klinische Formen der enzootischen Pneumonie bei Kälbern und ihre Auswirkungen auf die Atmung. Dtsch Tierärztl Wochenschr 99, 200-204.
- Schaffer, A.P., Larson, R.L., Cernicchiaro, N., Hanzlicek, G.A., Bartle, S.J., Thomson, D.U., 2016. The association between calfhood bovine respiratory disease complex and subsequent departure from the herd, milk production, and reproduction in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 248, 1157-1164.
- Scholz, H., Curle, M., Fischer, W., 1987. Untersuchungen zur Bronchopneumonie des Rindes 2. Mitteilung: Endoskopische, Tracheobronchialsekret- und Blutgasuntersuchungen. Tierärztl Umsch 42, 371-378.
- Schroedl, W., Fuerll, B., Reinhold, P., Krueger, M., Schuett, C., 2001. A novel acute phase marker in cattle: lipopolysaccharide binding protein (LBP). J Endotoxin Res 7, 49-52.
- Smith, H.J., Reinhold, P., Goldman, M.D., 2005. Forced oscillation technique and impulse oscillometry. Eur Respir Mon 31, 72-105.
- Soltesova, H., Nagy, O., Tothova, C., Paulikova, I., Seidel, H., 2015. Blood gases, acid-base status and plasma lactate concentrations in calves with respiratory diseases. Acta Vet-Beograd 65, 111-124.
- Stephens, R.S., 2003. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. Trends Microbiol 11, 44-51.

- Strie, R., Doll, K., Pottmann, B., Scholz, H., 1997. Einfluß verschiedener Faktoren auf die Ergebnisse der Lungenfunktionsprüfung mittels multifrequenter Impuls-Oszillometrie bei Kälbern und Jungrindern. Dtsch Tierärztl Wochenschr 104, 286-290.
- Taylor-Brown, A., Vaughan, L., Greub, G., Timms, P., Polkinghorne, A., 2015. Twenty years of research into *Chlamydia*-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae*. Pathog Dis 73, 1-15.
- Thacker, E.L., 2006. Lung inflammatory responses. Vet Res 37, 469-486.
- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, J.-Y., 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. FEMS Microbiol Rev 34, 231-259.
- Thompson, P.N., Stone, A., Schultheiss, W.A., 2006. Use of treatment records and lung lesion scoring to estimate the effect of respiratory disease on growth during early and late finishing periods in South African feedlot cattle. J Anim Sci 84, 488-498.
- Twomey, D.F., Griffiths, P.C., Horigan, M.W., Hignett, B.C., Martin, T.P., 2006. An investigation into the role of *Chlamydophila* spp. in bovine upper respiratory tract disease. Vet J 171, 574-576.
- Uhlig, A., Gorzny, O., 1993. Blutgasanalytische Untersuchungen bei lungengesunden Mastkälbern unterschiedlichen Alters. Monatsh Veterinärmed 48, 255-259.
- van Bömmel, C., 2000. Untersuchungen an Kälbern mit enzootischer Bronchopneumonie: klinische, labordiagnostische und impulsoszillometrische Ergebnisse. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Vogel, H.J., 2012. Lactoferrin, a bird's eye view. Biochem Cell Biol 90, 233-244.
- Vouga, M., Diabi, H., Boulos, A., Baud, D., Raoult, D., Greub, G., 2015. Antibiotic susceptibility of *Neochlamydia hartmanellae* and *Parachlamydia acanthamoebae* in amoebae. Microbes Infect 17, 761-765.
- Waibl, H., 2004. Atmungsapparat, *Apparatus respiratorius*, In: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (Hrsg.) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. 9. Auflage, Parey Verlag, Stuttgart.
- Walker, R.D., Hopkins, F.M., Schultz, T.W., McCracken, M.D., Moore, R.N., 1985. Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. Am J Vet Res 46, 2429-2433.
- Wheelhouse, N., Howie, F., Gidlow, J., Greub, G., Dagleish, M., Longbottom, D., 2012. Involvement of *Parachlamydia* in bovine abortions in Scotland. Vet J 193, 586-588.
- Wheelhouse, N., Longbottom, D., 2012. Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications. Transbound Emerg Dis 59, 283-291.
- Wheelhouse, N., Longbottom, D., Willoughby, K., 2013. *Chlamydia* in cases of cattle pneumonia in Scotland. Vet Rec 172, 110.

- Wheelhouse, N., Mearns, R., Willoughby, K., Wright, E., Turnbull, D., Longbottom, D., 2015. Evidence of members of the *Chlamydiales* in bovine abortions in England and Wales. *Vet Rec* 176, 465.
- Wheelhouse, N., Sait, M., Gidlow, J., Deuchande, R., Borel, N., Baily, J., Caldow, G., Longbottom, D., 2011. Molecular detection of *Chlamydia*-like organisms in cattle drinking water. *Vet Microbiol* 152, 196-199.

8 Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abbildung 1–A: Intrabronchiales Inokulationsschema (modifiziert nach Prohl *et al.*, 2014) ...21

Teilversuch 1

Figure S1. Graphical abstract TV 1.....	23
Figure 1. Study design	26
Figure 2. Development of total clinical score over time.....	29
Figure 3. 15-HETE concentration assessed in BALF supernatant.....	31
Figure 4. Distribution and extent of macroscopic pulmonary lesions 2 dpi in a calf inoculated with 10^{10} IFU of viable <i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	31
Figure 5. Histology of pulmonary tissue in a calf at 2 dpi.....	32
Figure 6. Immunohistochemistry of pulmonary tissue in a calf at 2 dpi	33
Figure 7. Genomic copy numbers of <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> detected in tissue according to challenge and time point of sampling	34

Teilversuch 2

Figure S1. Graphical abstract TV 2.....	39
Figure 1. Challenge-dose dependency of relative changes in partial pressure of oxygen in arterial blood (PaO_2) and respiratory rate	42
Figure 2. Respiratory parameters in calves inoculated with a parachlamydial challenge dose of 10^{10} inclusion-forming units before and after inoculation.....	43
Figure 3. Alveolar ventilation and gas exchange of calves inoculated with 10^{10} inclusion- forming units of <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> over time	44
Figure 4. Respiratory impedance represented by respiratory resistance and respiratory reactance at 5 Hz, respectively, measured in calves inoculated with 10^{10} inclusion-forming units of <i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	44
Figure S2. General study design	47

9 Tabellenverzeichnis

Einleitung

Tabelle 1–A: Übersicht über die Familien und Spezies der potentiell pathogenen ‚ <i>Chlamydia</i> -like organisms‘ in Bezug auf terrestrische und aquatische Wirte (modifiziert nach Taylor-Brown <i>et al.</i> , 2015).....	4
Tabelle 1–B: Auswahl validierter Methoden zur Quantifizierung von Ventilationsgrößen und Atmungswiderständen beim Kalb unter Spontanatmung (modifiziert nach Ostermann, 2013).....	15
Tabelle 1–C: Ursachen von Ventilationsstörungen (modifiziert nach Reinhold, 1997).....	17
Tabelle 1–D: Studiendesign und Anzahl verwendeter Tiere.....	20
Tabelle 1–E: Sektionszeitpunkte und Anzahl der <i>ex vivo</i> untersuchten Tiere	20

Teilversuch 1

Table 1. Tissues sampled during necropsy according to type of preservation and further examinations	27
Table 2. Cytological differentiation and quantities of cell populations present in BALF at 2-4 dpi	30
Table 3. Extent of lung lesions according to challenge dose and time point	31
Table 4. Genomic copy numbers and corresponding C_t values according to challenge dose and time point.....	35
Table S1. Incidence of clinical signs according to challenge dose and time point	38

Teilversuch 2

Table 1. Results of haemoximetry assessed in arterial blood before and at 2 days after intrabronchial challenge with <i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	42
Table 2. Respiratory rates (/min) before and after intrabronchial challenge with <i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	42
Table S1. Investigated parameters of pulmonary function testing	48
Table S2. Results of pulmonary function testing in calves challenged with 10^{10} inclusion-forming units of <i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	49
Table S3. Acid-base balance in venous blood from calves (n=9) inoculated with a challenge dose of 10^{10} inclusion-forming units of <i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	50

Diskussion

Tabelle 3–A: Henle-Koch Postulate und ihre Umsetzbarkeit im vorliegenden Versuch	57
--	----

10 Publikationsliste

Publikationen in Zeitschriften mit Gutachtersystem (peer-reviewed)

- Prohl, A., Ostermann, C., **Lohr, M.**, Reinhold, P., 2014. The bovine lung in biomedical research: visually guided bronchoscopy, intrabronchial inoculation and in vivo sampling techniques. *J Vis Exp* 89, e51557.
- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Schroedl, W., Aeby, S., Greub, G., Reinhold, P., 2015. A bovine model of a respiratory *Parachlamydia acanthamoebae* infection. *Pathog Dis* 73, 1-14.
- Prohl, A., **Lohr, M.**, Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Schroedl, W., Rothe, M., Schubert, E., Sachse, K., Reinhold, P., 2015. Evaluation of antimicrobial treatment in a bovine model of acute *Chlamydia psittaci* infection: tetracycline versus tetracycline plus rifampicin. *Pathog Dis* 73, 1-12.
- Prohl, A., **Lohr, M.**, Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Schroedl, W., Rothe, M., Schubert, E., Sachse, K., Reinhold, P., 2015. Enrofloxacin and macrolides alone or in combination with rifampicin as antimicrobial treatment in a bovine model of acute *Chlamydia psittaci* infection. *PLoS One* 10, e0119736.
- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Diller, R., Greub, G., Reinhold, P., 2016. Effect of *Parachlamydia acanthamoebae* on pulmonary function parameters in a bovine respiratory model. *Vet J* 213, 9-15.

Tagungsbeiträge (Abstracts)

- Prohl, A., **Lohr, M.**, Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Sachse, K., Reinhold, P., Bernd, A., 2012. Does doxycycline alter the proportion of blood lymphocyte subpopulations in acute respiratory *Chlamydia psittaci* infection? Proceedings of the 10th International Veterinary Immunology Symposium, August 28 - September 1, 2013, Milan, Italy, 122.
- Prohl, A., Ostermann, C., **Lohr, M.**, Berndt, A., Sachse, K., Reinhold, P., 2012. Etablierung von in vivo Techniken zur Evaluierung der Effekte von antimikrobiellen Behandlungen einer *Chlamydia psittaci*-Infektion im Kalb. Proceedings ,2. Infektionsmedizinisches Symposium Mitteldeutschland – Nachwuchs forscht', September 10, 2012, Leipzig, Germany, ISBN: 978-3-86541-505-9, 48
- Prohl, A., Ostermann, C., **Lohr, M.**, Berndt, A., Sachse, K., Reinhold, P., 2012. Introduction of in vivo techniques to evaluate the effects of antimicrobial treatment of *Chlamydia psittaci* infections in calves. Proceedings of the National Symposium on Zoonoses Research, October 11-12, 2012, Berlin, Germany, 193.
- Prohl, A., Ostermann, C., **Lohr, M.**, Berndt, A., Kühnert, C., Sachse, K., Reinhold, P., 2012. Introduction of in vivo techniques to evaluate the effects of antimicrobial treatment of

- Chlamydia psittaci* infections in calves. Proceedings of the 30th Annual Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society, October 22-25, 2012, Columbia, Missouri, USA, 48.
- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Schrödl, W., Greub, G., Reinhold, P., 2013. Die Bedeutung von *Parachlamydia acanthamoebae* als Pneumonieerreger - erste Untersuchungen am Infektionsmodell Kalb. Pneumologie 67, A14.
- Prohl, A., Ostermann, C., **Lohr, M.**, Berndt, A., Liebler-Tenorio, E., Rothe, M., Sachse, K., Reinhold, P., 2013. Der Einfluss einer Behandlung mit Doxzyzyklin auf den Verlauf einer experimentellen *Chlamydia psittaci* Infektion beim Kalb. Pneumologie 67, A15.
- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Schroedl, W., Greub, G., Reinhold, P., 2013. A bovine model of *Parachlamydia acanthamoebae* lung infection. Proceedings of the Junior Scientist Zoonoses Meeting, June 3-5, 2013, Leipzig, Germany.
- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Schroedl, W., Greub, G., Reinhold, P., 2013. Bedeutung von ‚*Chlamydia*-like organisms‘ als Erreger – Bovines Modell für *Parachlamydia acanthamoebae*. ‚6. Arbeitstagung des Nationalen Referenzlabors für Chlamydiosen‘ In: Proceedings of the 2nd European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications, June 13-14, 2013, Jena, Germany, 101.
- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Schroedl, W., Greub, G., Reinhold, P., 2013. The relevance of *Parachlamydia acanthamoebae* as a causative agent of pneumonia assessed by the use of a large animal model. Proceedings of the 2nd European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications, June 13-14, 2013, Jena, Germany, 79.
- Prohl, A., Ostermann, C., **Lohr, M.**, Berndt, A., Liebler-Tenorio, E., Rothe, M., Sachse, K., Reinhold, P., 2013. Effects of antimicrobial treatment using doxycycline +/- rifampicine in a bovine model of *Chlamydia psittaci* infection. Proceedings of the 2nd European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications, June 13-14, 2013, Jena, Germany, 53.
- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Schroedl, W., Greub, G., Reinhold, P., 2013. The relevance of *Parachlamydia acanthamoebae* as a causative agent of pneumonia assessed by the use of a large animal model. Proceedings of the 31st Annual Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society and the 5th World Equine Airway Symposium, July 15-17, 2013, Calgary, Canada, 47.
- Prohl, A., Ostermann, C., **Lohr, M.**, Berndt, A., Liebler-Tenorio, E., Rothe, M., Sachse, K., Reinhold, P., 2013. Is doxycycline a good choice to treat an acute respiratory *Chlamydia psittaci* infection? Proceedings of the 31st Annual Symposium of the Veterinary Comparative Respiratory Society and the 5th World Equine Airway symposium, July 15-17, 2013, Calgary, Canada, 54.

- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Greub, G., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Reinhold, P., 2013. The relevance of *Parachlamydia acantamoebae* as a causative agent of pneumonia assessed by the use of a large animal model. Proceedings of the 2nd Junior Scientist Symposium of the 'Friedrich-Loeffler-Institute', August 21-24, 2013, Jena, Germany, 9.
- Prohl, A., **Lohr, M.**, Ostermann, C., Berndt, A., Liebler-Tenorio, E., Rothe, M., Sachse, K., Reinhold, P., 2013. Is doxycycline the right choice to treat an acute respiratory *Chlamydia psittaci* infection? Proceedings of the 2nd Junior Scientist Symposium of the 'Friedrich-Loeffler-Institute', August 21-24, 2013, Jena, Germany, 24.
- Prohl, A., Ostermann, C., **Lohr, M.**, Berndt, A., Liebler-Tenorio, E., Rothe, M., Sachse, K., Reinhold, P., 2013. Is doxycycline the right choice to treat an acute respiratory *Chlamydia psittaci* infection? Eur Resp J 42, Suppl 57, P5050.
- Prohl, A., **Lohr, M.**, Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Sachse, K., Reinhold, P., Berndt, A., 2013. Proportions of bovine blood lymphocyte subpopulations in an acute respiratory *Chlamydia psittaci* infection with and without doxycycline treatment. Proceedings of the National Symposium on Zoonoses Research, September 19-20, 2013, Berlin, 156.
- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Greub, G., Reinhold, P., 2014. Respiratorische Dysfunktion bei Kälbern nach experimenteller *Parachlamydia acanthamoebae* Infektion. Pneumologie 68, A11.
- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Schroedl, W., Liebler-Tenorio, E., Greub, G., Reinhold, P., 2014. *Parachlamydia acanthamoebae* as a respiratory pathogen: Challenge dose titration in a bovine model. Eur Resp J 44, Suppl 58, P2539.
- Prohl, A., **Lohr, M.**, Ostermann, C., Berndt, A., Liebler-Tenorio, E., Rothe, M., Schubert, E., Sachse, K., Reinhold, P., 2014. Die Behandlung einer experimentellen respiratorischen *Chlamydia psittaci* Infektion beim Kalb mit Enrofloxacin ± Rifampicin. Pneumologie 68, A12.
- Prohl, A., Ostermann, C., **Lohr, M.**, Berndt, A., Liebler-Tenorio, E., Rothe, M., Schubert, E., Sachse, K., Reinhold, P., 2014. Der Einfluss einer Behandlung mit Doxyzyklin ± Rifampicin auf den Verlauf einer experimentellen *Chlamydia psittaci* Infektion beim Kalb. Pneumologie 68, A42.
- Lohr, M.**, Prohl, A., Ostermann, C., Schroedl, W., Liebler-Tenorio, E., Greub, G., Reinhold, P., 2014. A bovine model of *Parachlamydia acanthamoebae* lung infection. Proceedings 'Deutscher Chlamydien Workshop', April 02-04, 2014, Berlin, Germany.

- Prohl, A., **Lohr, M.**, Ostermann, C., Berndt, A., Liebler-Tenorio, E., Schubert, E., Sachse, K., Reinhold, P., 2014. Die antibiotische Behandlung einer experimentellen respiratorischen *Chlamydia psittaci* Infektion beim Kalb mit Doxycyclin, Enrofloxacin oder Erythromycin. Proceedings ‚Gemeinsamen Arbeitstagung des Nationalen Referenzlabors für Q-Fieber und der DVG-Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie‘, October 9-10, 2014, Jena, Germany, 9-10.
- Espina, M., **Lohr, M.**, Dorenberg, M., Jung, A.-T., Berner, D., Mageed, M., Brehm, W., 2016. A randomised, vehicle-controlled, double-blind, parallel study on the effects of intravenous WF10 in horses with recurrent airway obstruction (RAO). Proceedings of the GEVA-GPM 2nd International Congress, October 28-29, 2016, Berlin, Germany, 168.

11 Danksagung

Meiner Betreuerin, **Prof. Dr. Petra Reinhold, PhD** bin ich für die Überlassung des interessanten Themas, die umfassende Unterstützung sowohl bei der Umsetzung der Versuche als auch während der Verfassung der Publikationen und dieser Dissertation zum allergrößten Dank verpflichtet. Es war mir stets eine große Freude und eine ganz besondere Ehre unter ihrer hochqualifizierten Anleitung arbeiten und lernen zu dürfen. Neben den fachlichen Inhalten kamen auch nie die zwischenmenschlichen Aspekte zu kurz. Dafür gebührt ihr meine allergrößte Anerkennung.

Meinen **Co-Autoren** und ihren **Mitarbeitern** bin ich für die hervorragende, unkomplizierte, produktive und stets wohlwollende Zusammenarbeit dankbar. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei **Prof. Gilbert Greub, PhD** vom Institut für Mikrobiologie der Universität Lausanne. Ohne seine Expertise und sein Engagement wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Er und sein Laborteam bereiteten mir den Forschungsaufenthalt in Lausanne so angenehm, wie nur möglich. Besonders **Sébastien Abey** war mir fortwährend eine sehr große Hilfe bei der Untersuchung der unzähligen Proben und unterstützte mich nach allen Kräften.

Darüber hinaus bin ich unendlich dankbar für die Zuarbeit und die Unterstützung durch **Annelie Langenberg, Ines Lemser** und **Sylke Stahlberg** sowie durch das gesamte Team der **Tierpfleger**. Sowohl in der Versuchsphase als auch im Anschluss daran standen sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Abgesehen von ihrer tatkräftigen Unterstützung in allen Belangen, waren meine Mitdoktorandinnen **Carola, Annette** und **Sina** stets eine Bereicherung des Arbeitsalltags und immer für einen Spaß zu haben. Dafür danke ich euch vielmals.

Zu guter Letzt danke ich **meiner Familie** von ganzem Herzen für den Rückhalt, die größtmögliche Unterstützung und ihr Verständnis während der gesamten Zeit, die diese Arbeit in Anspruch genommen hat.

12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Leipzig, den 10.07.2017 Markus Lohr